

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Análisis de SNPs del gen *MMP9* en pacientes pediátricos
con asma.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

QFB. ROBERTO GAMBOA BECERRA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco
Profesora Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México
Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

CODIRECTORA

Dra. Silvia Jiménez Morales
Investigadora en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

ASESORES

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Yolanda Saldaña Álvarez
Investigadora en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Luis Del Pozo Yauner
Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Medicina Genómica

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección de las Dras. Lorena Orozco Orozco y Silvia Jiménez Morales, bajo la asesoría de la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y el Dr. Luis Del Pozo Yauner.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por su apoyo académico y económico, así como también al CONACYT por la beca otorgada con No. 330966.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM que contribuyeron a mi formación académica, mil gracias por su enseñanza.

A mis lectores de tesis, Dra. Mavil López Casamichana, Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, Al Dr. Luis del Pozo Yauner, Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón, gracias por sus comentarios y el enriquecimiento de esta tesis.

A mis asesores de tesis, la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, la Dra. Yolanda Saldaña Álvarez y el Dr. Luis del Pozo Yauner, gracias por apoyarme en el desarrollo de esta tesis y sus opiniones constructivas.

A los integrantes y compañeros del Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades metabólicas donde desarrollé mi trabajo experimental, gracias por compartir su espacio y aguantarnos este tiempo junto a ellos.

A mis directoras de tesis y guías de mi formación, la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco y la Dra. Silvia Jiménez Morales, les agradezco siempre los consejos tan profesionales, la confianza y el apoyo mostrado para que pudiera finalizar y superar esta etapa de mi formación profesional.

A la Dra. Silvia, Dra. Lupita, Ing. Juan Luis, Dra. Yolanda, Dr Julián, Dra. Nora, Dr. Juanjo, por hacer tan amena la estadía en el laboratorio, por su apoyo, consejos y amistad, y los momentos tan felices que hemos pasado juntos, les agradezco mucho y saben que los estimo muchísimo.

A almita, Bere, Nicté, Alí, Dany, José Luis, Marcos y Miguelón: mi segunda familia, muchas gracias por ser los mejores compañeros y amigos de la maestría, saben que los llevo en el corazón, el haber conocido personas como ustedes es una de las cosas tan maravillosas que no cambiaría por nada.

A mis tíos, primos y a mi familia entera, que aún estando lejos me han deseado siempre lo mejor y por enviarme siempre todas sus buenas vibras, porque los he sentido siempre tan cerca de mí, los quiero mucho.

DEDICATORIAS

A las dos mujeres tan admirables que desde antes que existiera me han amado y que se empeñaron en hacer de mí una persona de bien, que con amor y cariño me han alentado siempre para lograr mis objetivos de la vida, por su incondicional apoyo esperando siempre tan sólo que yo sea feliz, les ofrezco y les dedico humildemente este nuestro logro, siempre estaré en deuda con ustedes, mami y abuelita, saben que las amo y las adoro.

A mi bella sombra día tras día desde que la conocí, a la personita que me ha proporcionado la fuerza de seguir adelante cuando todo parece adverso, a la mujer que admiro personal y profesionalmente, al amor de mi vida que ha llenado un lugar muy especial en mi corazón, a ti Dianita, gracias por lo que hoy hemos logrado.

A quien siempre has alumbrado mi camino en la oscuridad y que has puesto en mi vida todo lo necesario para que crezca y logre lo que me proponga, a ti te lo debo todo, Gracias Dios.!!!!

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESÚMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes Generales.....	2
1.1 Definición.....	2
1.2 Diagnóstico.....	2
1.3 Clasificación.....	3
1.4 Fisiopatología.....	5
1.5 Etiopatogenia del asma.....	8
1.5.1 Factores ambientales.....	9
1.5.2 Factores intrínsecos.....	11
1.5.3 Factores genéticos.....	12
2. Antecedentes Particulares.....	16
2.1 Metaloproteasas.....	16
2.1.1 Metaloproteasa de matriz 9.....	18
2.1.1.1 Metaloproteasa de matriz 9 y asma.....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	22
III. HIPÓTESIS.....	23

IV. OBJETIVOS.....	23
1. Objetivo general.....	23
2. Objetivos específicos.....	23
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
VI. METODOLOGÍA.....	25
1. Población de estudio.....	25
1.1 Criterios de inclusión y de exclusión.....	25
2. Muestras biológicas	26
2.1 Extracción de ADN genómico.....	26
3. Análisis de genotipificación.....	27
3.1 Método fluorescente de la 5' exonucleasa (TaqMan).....	27
3.2 Análisis de RFLPs.....	30
3.3 Mutagénesis Dirigida.....	33
4. Validación de resultados.....	35
5. Análisis <i>in silico</i> de SNPs asociados a asma.....	36
6. Análisis estadístico.....	36
VII. RESULTADOS.....	37
1. Población analizada.....	37
2. Análisis de genotipificación.....	37
2.1 Polimorfismos que no mostraron evidencia de asociación.....	38
2.2 Polimorfismos con evidencia de asociación.....	46
3. Análisis de distribución de Haplotipos.....	52
4. Significancia biológica de SNPs asociados a asma.....	56

4.1 Análisis del SNP rs2274755.....	56
4.2 Análisis del SNP rs17577.....	59
VIII. DISCUSIÓN.....	62
IX. CONCLUSIONES.....	70
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ABREVIATURAS

FEV 1	Volumen espiratorio forzado en un segundo
Th2	Linfocitos T cooperadores 2
IgE	Inmunoglobulina E
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
Treg	Células T reguladoras
IL-1β	Interleucina 1 beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alpha
TNF-β	Factor de crecimiento transformante beta
IL-10	Interleucina 10
TLR	Receptor tipo toll
CD14	Grupo de diferenciación 14
CARD15	Miembro 15 de la familia de dominio de reclutamiento de caspasa
ADRB2	Receptor beta 2 adrenérgico
CFTR	Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis Quística.
SPINK5	Inhibidor de serín proteasa tipo kazal 5
FLG	Filagrina
GSTM1	Glutación S-transferasa μ 1
GSTP1	Glutación P-transferasa 1
Th1	Linfocitos T colaboradores 1

IL-4	Interleucina 4
IL4Rα	Receptor alpha de interleucina 4
IFN-γ	Interferón gamma
IFNγR1	Receptor 1 de interferón gamma
STAT6	Transductor de señales y activador de la transcripción 6
GATA3	Factor de transcripción específico de células T actuando en trans 3.
TBX21	Factor de transcripción específico de células Th1
Th0	Linfocito T nativo
IL-9	Interleucina 9
IL-13	Interleucina 13
IL-5	Interleucina 5
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
PAF	Factor activador de plaquetas
T-bet	Factor de transcripción caja T expresado en células T
ICAM 1	Molécula de adhesión intercelular 1
VCAM 1	Molécula de adhesión celular vascular 1
MEC	Matriz extracelular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidermal
MMP	Metaloproteasa de matriz
CXCL	Quimiocina

TIMP	Inhibidor de tejido de metaloproteasa
RFLPs	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GINA	Iniciativa Global para el Asma
LD	Desequilibrio de ligamiento
pb	Pares de bases
HWE	Equilibrio de Hardy Weinberg
OR	Razón de momios

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fisiopatología del asma.....	7
Figura 2. Características de la remodelación de vías aéreas en asma.....	10
Figura 3. Genes asociados a asma y enfermedades alérgicas.....	14
Figura 4. Mecanismos de señalización celular mediado por las MMPs.....	17
Figura 5. Estructura de MMP9.....	18
Figura 6. Fundamento de la 5' exonucleasa mediante sondas Taqman.....	29
Figura 7. Fundamento de la técnica de RFLPs.....	32
Figura 8. Localización de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) incluidos en este estudio.....	34
Figura 9. Amplificación del fragmento que contiene el polimorfismo rs3918242.....	40
Figura 10. Análisis del SNP rs3918242 con la enzima <i>SphI</i>	41

Figura 11.	Producto de PCR para el análisis del SNP rs2250889.	43
Figura 12.	Análisis por restricción del polimorfismo rs2250889 con la enzima <i>Bam</i> HI.....	44
Figura 13.	Frecuencias alélicas del SNP rs3818245 en diferentes poblaciones.....	45
Figura 14.	Esquema de desequilibrio de ligamiento en la población de estudio.....	53
Figura 15.	Sitios de <i>splicing</i> entre los exones 4 y 5 y localización del SNP rs227475.....	57
Figura 16.	Predicción de pérdida de <i>splicing</i> en presencia del alelo de riesgo (T) del SNP rs227475.....	58
Figura 17.	Localización del aminoácido Arg 668 en la proteína MMP9.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cromosomas y regiones asociadas a asma y fenotipos asociados.....	15
Tabla 2. Condiciones de reacción de TaqMan.....	28
Tabla 3. Lista de primers para la secuenciación de los SNPs del polimorfismos del gen <i>MMP9</i>	35
Tabla 4. Frecuencias alélicas de SNPs que no presentaron asociación.....	38
Tabla 5. Frecuencias genotípicas de SNPs que no presentaron asociación.....	39
Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3918249 en la población total.....	47
Tabla 7. Análisis de las Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3918249 estratificando por género.....	48
Tabla 8. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs rs2274755 y rs17577 en población total.....	50
Tabla 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs rs2274755 y rs17577 en pacientes con asma atópica...	51
Tabla 10. Tabla general de la distribución de haplotipos en población total.	54
Tabla 11. Distribución de haplotipos estratificando por género....	55
Tabla 12. Cambios en la estructura de MMP9 predichas por SNPs3D.....	61

RESÚMEN

Introducción: El asma es una de las enfermedades crónicas más comunes en México y a nivel mundial, de hecho se estima que alrededor de 300 millones de personas en el mundo la padece. Esta entidad se caracteriza por inflamación crónica, hiperrespuesta bronquial y remodelación de las vías aéreas, este último con implicaciones importantes en la respuesta al tratamiento. Existen muchas evidencias que sugieren que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen de la metaloproteínasa 9 (*MMP9*) pueden alterar los niveles de la proteína o su actividad y ello incrementar el proceso de remodelación y la gravedad de la enfermedad.

Objetivo: Determinar si polimorfismos en el gen *MMP9* confieren riesgo para desarrollar asma en la población mexicana. **Material y métodos:** En un estudio de asociación de casos y controles se incluyeron 403 niños asmáticos de los cuales el 69% cuentan con datos de atopia (263 atópicos y 16 no atópicos), y 426 individuos sanos no relacionados del banco de ADN del INMEGEN. A partir de ADN y mediante la técnica fluorescente 5' exonucleasa, mutagénesis dirigida y fragmentos de restricción de longitud polimórfica, se genotipificaron 9 SNPs del gen *MMP9*. El análisis estadístico se realizó con los programas FINETTI, EPIINFO, HAPLOVIEW y QUANTO. La evaluación del efecto biológico de los SNPs asociados se llevó a cabo *in silico* mediante los programas Human-Transcriptome DataBase for Alternative Splicing, SplicePort: An Interactive Splice Site Analysis Tool, Pmut Pathogenicity y SNP3D. **Resultados:** Todos los SNPs evaluados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. El análisis comparativo entre casos y controles mostró diferencias

estadísticamente significativas en la distribución de los SNPs rs2274755 y rs17577, los cuales se encontraron en 100% de LD (OR= 2.10 [IC 95% 1.31-3.39], $p=0.0017$). La estratificación por tipo de asma, mostró asociación de ambos SNPs con asma atópica ($p=0.0005$). En ambos casos, la significancia estadística se mantuvo después de 100000 permutaciones. El análisis *in silico* de estos SNPs sugiere que el rs2274755 afecta el mecanismo de splicing, mientras que el rs17577 elimina un sitio de interacción salina entre el aa 544 y 668 de la MMP9. El rs3918249 mostró asociación únicamente con el género femenino OR= 1.66 (IC 95% 1.14-2.43, $p=0.0077$). Los SNPs rs3918242, rs17576, rs2250889 y rs9509 no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Los SNPs rs3918245, rs41427445 no fueron informativos para nuestra población. Los SNP rs2274755, rs3918249 y rs17576 mostraron asociación con asma en forma de haplotipo OR= 2.14 (IC 95% 1.28-3.60, $p=0.001$). **Conclusiones:** Los SNPs rs2274755, rs1577 rs3918249 se asocian con el riesgo a padecer asma y podrían tener efectos funcionales en la estructura o actividad de la MMP9. Este es el primer estudio donde se documenta asociación entre asma y el SNP. Los SNP rs2274755, rs3918249 y rs17576 confieren 2 veces de riesgo a padecer asma en forma de haplotipo. Es necesario determinar el mecanismo mediante el cual estos polimorfismos alteran el funcionamiento de MMP9 y el mecanismo molecular involucrado en la patogénesis del asma.

I. INTRODUCCIÓN

El asma es una de las enfermedades crónicas más comunes en México y en todo el mundo, de hecho a nivel mundial se estima que alrededor de 300 millones de personas la padecen; sin embargo su prevalencia, morbilidad y mortalidad varía entre las naciones (GINA, 2009; Hunninghake y cols., 2006). A pesar de que se han hecho importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de esta patología, existe una tendencia al incremento de su prevalencia, que junto con el elevado costo de atención, hacen de ella un verdadero problema de salud pública (Gallardo Martínez y cols., 2007). En México, se han realizado pocos estudios relacionados con los costos de atención por asma, sin embargo, el año 2007, en un estudio realizado en una institución de salud de segundo nivel se estimó un costo directo anual por atención de entre 32 a 35 millones de dólares a nivel nacional (Gallardo Martínez y cols., 2007).

La mayor prevalencia de esta enfermedad se presenta en la población infantil; en México, los estudios epidemiológicos documentan prevalencias que van desde el 4.7-27% en la población infantil, y revelan que esta entidad ocupa del primer al tercer lugar de las urgencias pediátricas (Lara Pérez, 2001; Vargas Becerra, 2009).

El asma es una enfermedad de etiología multifactorial, resultado de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. Las bases genéticas del asma han sido exploradas en la última década a través de estudios de ligamiento y asociación de genes candidato donde alrededor de 200 genes han sido asociados con la enfermedad (Wu y cols., 2010), sin embargo, estos resultados no han sido reproducibles en todas las poblaciones.

Considerando la gran complejidad genética del asma, la identificación de los factores genéticos propios de cada población que se encuentran asociados con el curso clínico de la enfermedad o que están relacionados con la respuesta al tratamiento, podría ser una alternativa para entender mejor su patogénesis y puede conducir a mejorar las estrategias de diagnóstico y de tratamiento para disminuir su impacto social y económico.

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Definición

El asma es una enfermedad crónica de las vías aéreas que se caracteriza por obstrucción reversible (espontánea o con broncodilatadores) del flujo aéreo, inflamación de vías aéreas, hiperreactividad persistente y broncoespasmo. En estadios crónicos de la enfermedad se presenta también remodelación de las vías aéreas. Estos procesos conducen a síntomas clínicos como sibilancias, disnea, tos y sensación de opresión torácica (Mathur, 2010; Subrahmanyam y cols., 2011; Buc y cols., 2009).

1.2 Diagnóstico

El asma es diagnosticado tomando en cuenta tres aspectos importantes: 1) historia clínica del paciente: permite obtener información acerca de la presencia de manifestaciones clínicas como episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, síntomas que empeoran por la noche o madrugada que puede deberse a la presencia de uno o más agentes desencadenantes del cuadro asmático; 2) exploración física: permite documentar la sintomatología y los signos relacionados con el asma, los cuales dependen del estado en el que se encuentre el paciente en el

momento de la exploración y 3) evaluación de función pulmonar mediante espirometría. Esta prueba se basa principalmente en la medición del volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1), donde un FEV1 mayor de 80% es considerado como normal. Para el diagnóstico de asma en niños, un aumento de más de 12% en el FEV1 después de un tratamiento con salbutamol o albuterol es considerado como positivo (GINA, 2009; Buc y cols., 2009; Ortega Martell y Fernández vega, 2009).

1.3 Clasificación

El asma se puede clasificar de acuerdo a su etiología en: extrínseca o atópica e intrínseca o no atópica. El asma atópica se presenta en la mayoría de los pacientes y es más común en la población infantil (hasta un 63%), se caracteriza por una respuesta exacerbada tipo Th2 con producción de niveles elevados de IgE total y específica de alérgeno en suero de pacientes asmáticos (Moncayo y cols., 2010; Pearce y cols., 1999; Fan, 2006).

A diferencia del asma atópica donde existen niveles elevados de IgE y los tipos celulares que participan son principalmente eosinófilos y linfocitos T, en el asma intrínseca o no atópica, existe un gran número de neutrófilos y mastocitos, los pacientes resultan negativos a las pruebas cutáneas a alérgenos comunes y no hay evidencia de IgE en suero. Este tipo de asma suele comenzar en la vida adulta, en muchos casos se asocia con pólipos nasales, sinusitis maxilar, ingesta de aspirina u otros anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y ejercicio; además, presenta un curso crónico que puede requerir de esteroides orales para su control (GINA, 2009; Jiménez Morales, 2009; Kraneveld y cols., 2002; Weinmayr y cols., 2007).

Por otra parte, de acuerdo a la frecuencia con que se presentan los síntomas y el grado de obstrucción bronquial, el asma también puede ser clasificada por su gravedad de la siguiente manera:

Intermitente: La tos y las sibilancias se presentan menos de 2 veces por semana, con síntomas nocturnos dos veces o menos al mes, los valores de FEV son $\geq 80\%$ del predicho y no necesita tratamiento de prehospitización ni hospitalización.

Persistente leve: Se presenta con exacerbación de tos y sibilancias al menos una vez por semana, pero no diariamente, puede limitar la actividad cotidiana, los síntomas nocturnos se presentan menos de 2 veces al mes y con valores de FEV $\geq 80\%$ del predicho.

Persistente moderada: Se caracteriza por exacerbación de tos y sibilancias más de dos veces por semana, actividad limitada, tos nocturna menos de 3 veces por semana, prehospitización menos de 3 veces al año y hospitalización menos de 2 veces al año, se presentan valores de FEV $> 60\%$ del predicho.

Persistente severa: Se presenta tos y sibilancias todos los días, tos nocturna persistente, actividad física limitada, recaídas frecuentes que requieren prehospitización más de 3 veces al año y hospitalización más de 2 veces al año, los valores de FEV son $\leq 60\%$ del predicho) (GINA, 2009; Stone Aguilar y cols., 2005; Huerta Hernández y cols., 2007).

1.4 Fisiopatología

Los factores desencadenantes o los alérgenos inhalados inducen la activación de macrófagos y células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, las cuales procesan y presentan los antígenos a los linfocitos Th0, induciendo la producción de IL-4 que conduce hacia la diferenciación de células Th2. En este proceso de diferenciación es crucial el factor de transcripción GATA3 cuya expresión a su vez es regulada por STAT6 (Fig. 1) (Buc y cols., 2009; Stone Aguilar y cols., 2005).

Las células Th2 tienen un papel crucial en el proceso inflamatorio mediante la producción de interleucinas involucradas en la inducción de la síntesis de IgE (IL-4 e IL-13), el reclutamiento de mastocitos (IL-4, IL-9 e IL-13) y la maduración de eosinófilos (IL-13, IL-5 y GM-CSF) y basófilos (IL-13 e IL-4). Éstas son las principales células efectoras, secretan mediadores proinflamatorios como factor activador de plaquetas (PAF), leucotrienos, histamina, proteasas y prostaglandinas D2, los cuales conducen a un incremento en la permeabilidad y dilatación de vasos sanguíneos, broncoconstricción y secreción de moco en las vías aéreas (Buc y cols., 2009; Holgate, 2008).

Es bien sabido que la respuesta inflamatoria alérgica en el asma no es controlada únicamente por una respuesta de tipo Th2, sino que también de manera importante las células Th1 contribuyen en su fisiopatología. En la diferenciación celular hacia la respuesta Th1 el factor de transcripción determinante es T-bet, el cual es subexpresado en las vías aéreas de asmáticos (Zheng y Flavell, 1997) y se ha visto que ratones T-bet^{-/-} tienen defectos graves en la diferenciación celular Th1 (Liu y cols., 2004). Las células

Th1 preferencialmente producen interleucinas pleiotrópicas como IFN- γ , IL-12, TNF- α y linfotoxina, activadoras potentes de actividad microbicida de macrófagos y antagonistas del desarrollo de respuesta Th2 (Murdoch y Lloyd, 2010; Lanzavecchia y Mackay, 1998; Bianchi 1998).

Las citocinas Th1 además, activan células endoteliales, aumentando la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM 1 y VCAM 1, lo que permite la infiltración de células proinflamatorias a la mucosa de las vías aéreas. Así como la activación de células efectoras (células cebadas y eosinófilos) que son capaces de sintetizar citocinas, promueven un incremento en el proceso inflamatorio y la evolución hacia la inflamación crónica, casi siempre se acompaña de remodelación de las vías aéreas (Holgate, 2008).

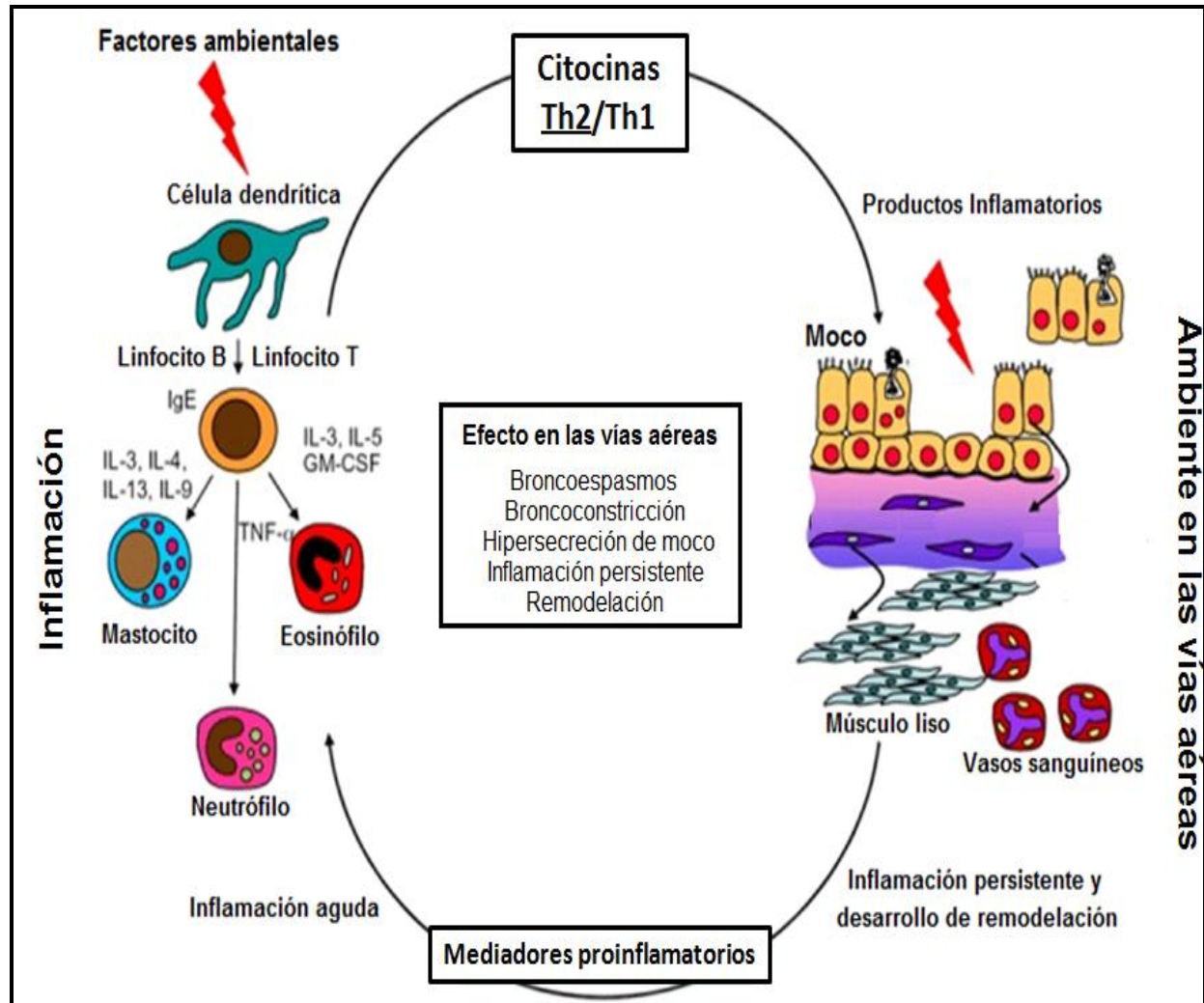


Figura 1. Fisiopatología del asma. Varios tipos celulares son reclutados y activados en las vías aéreas, liberando una variedad de mediadores inflamatorios que conducen a un proceso inflamatorio persistente y contribuye a que se generen cambios estructurales en las vías aéreas. IgE: inmunoglobulina E; IL: interleucina; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; TNF- α : factor de necrosis tumoral alpha. Tomado y modificado de Gagliardo y cols., (2001).

La remodelación es un proceso patológico característico de los estados graves del asma y en el cual se producen cambios estructurales que generan hipertrofia e hiperplasia de músculo liso, rigidez de la pared bronquial, fibrosis subepitelial, aumento en la producción de moco y disminución de la luz de la vía aérea por el engrosamiento de la matriz extracelular (MEC), lo que resulta en obstrucción del flujo aéreo permanente e hiperrespuesta bronquial persistente (Fig. 2) (Gagliardo y cols., 2001; Makino y Sagara, 2010; Broide, 2008).

En el fenómeno de remodelación además de los factores de transcripción como TGF- β (considerado como el regulador maestro de este proceso), participan también factores de crecimiento (PDGF, VEGF, EGFR, GM-CSF) y metaloproteasas de matriz liberadas de células estructurales e inflamatorias que crean el complejo microambiente que conduce a remodelación de las vías aéreas (Murdoch y Lloyd, 2010; Gu y cols., 2007; Chen y Khalil, 2006; Goldsmith y cols., 2006).

1.5 Etiopatogenia del asma

El asma es una enfermedad heterogénea de origen multifactorial que presenta diferentes fenotipos y manifestaciones clínicas que dependen de la predisposición genética, factores ambientales y factores intrínsecos como la edad y el género (Lee Chung, 2011).

1.5.1 Factores Ambientales

Existen múltiples factores ambientales desencadenantes de las manifestaciones clínicas del estado asmático, dentro de éstas se incluyen: infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), exposición a agentes domésticos (humo de tabaco, humo de leña, alérgenos animales, ácaros, cucarachas, polen, etc.), contaminantes atmosféricos provenientes de autos o industrias (isocianatos o ácidos anhídricos), además de otros factores que pueden agravar los síntomas como ejercicio, rinitis, sinusitis y sensibilidad a medicamentos como aspirina o antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Stone Aguilar y cols., 2005; Oyarzún, 2004; Yawna, 2008; Martínez Aguilar, 2009).

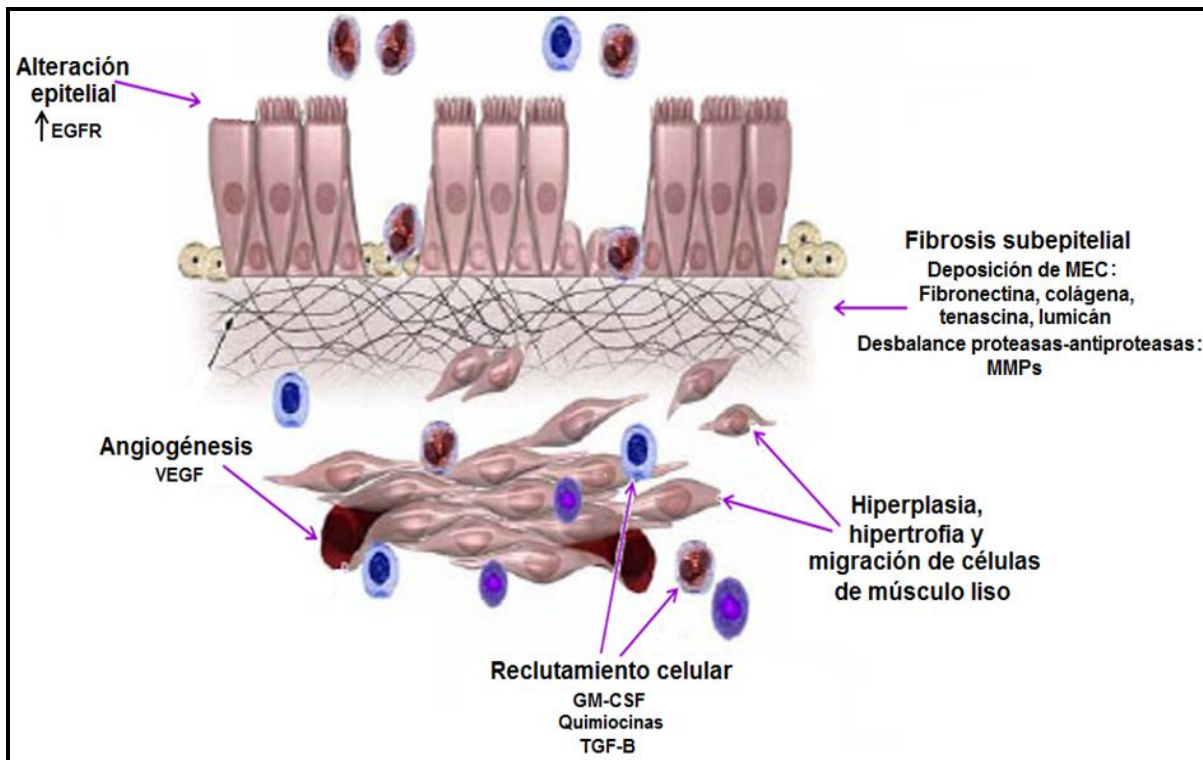


Figura 2. Características de la remodelación de vías aéreas en asma. Los cambios en la remodelación de las vías aéreas incluyen daño a epitelio y aumento en la producción de moco, así como de varios mediadores producidos por células que son reclutadas en el sitio de la inflamación, incluyendo TGF- β , quimiocinas, EGF, GM-CSF, etc. Los cambios estructurales incluyen aumento en la deposición de componentes de la MEC (colágeno y proteoglicanos) que contribuyen a cambios fibróticos en las vías aéreas, el aumento en número y tamaño de vasos sanguíneos bronquiales y células de músculo liso, que conducen a engrosamiento de las vías aéreas. EGFR: receptor de factor de crecimiento epidermal; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; MEC: matriz extracelular; MMPs: metaloproteasas de matriz. Tomado y modificado de (Lloyd y Robinson, 2007).

1.5.2 Factores Intrínsecos

Se sabe que el género, la edad y el origen de la población pueden contribuir al riesgo de padecer asma. Antes de la pubertad su incidencia es más alta en niños que en niñas y después de esta etapa el patrón se invierte, de tal manera que la prevalencia de la enfermedad en la adultez es hasta de un 50% más alto en mujeres que en hombres. Esto sugiere que las hormonas sexuales desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y progresión del asma (Vrieze y cols., 2003; Jeon y cols., 2009).

Se ha documentado en ratones, que las hormonas femeninas regulan negativamente la producción de células T reguladoras (Treg), las cuales a su vez participan en la regulación de la respuesta tipo Th2 (Melgert y cols., 2005; Tam y cols., 2011). Hormonas como el estradiol inducen la expresión tanto de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) como de citocinas antiinflamatorias (IL-10). La progesterona aumenta la expresión de IL-10, IL-1 β y TNF- α en pulmones. La existencia de este efecto dual del estradiol y la progesterona puede ser crítico en la respuesta del hospedero ante los alérgenos ambientales (Haggerty y cols., 2003; De Oliveira y cols., 2007).

Las diferencias interraciales en la susceptibilidad al asma se han investigado ampliamente y la población afroamericana tiene una de las tasas de incidencia más altas (105.5 por cada 1000) que se han reportado, de hecho esta alcanza 35% más que la población caucásica (78.2 por cada 1000) (GINA, 2009; Shalowitz y cols., 2007).

Estas diferencias interracialas también se ven reflejadas en la tasa de mortalidad, es decir, en la población afroamericana también ésta es mayor (2.9 por cada 100,000), que la de la población caucásica (0.9 por cada 100,000) (NCHS, 2009; Haselkorm y cols., 2008).

1.5.3 Factores Genéticos

El asma tiene un importante componente genético, con un patrón de herencia complejo. La heredabilidad del asma, es decir el porcentaje de la enfermedad que puede ser atribuible o explicado por el componente genético, se ha estimado entre 36 y 79% a través de estudios realizados en gemelos monocigotos y dicigotos (Pinto y cols., 2008).

Como en la mayoría de las enfermedades multifactoriales, la identificación de los genes involucrados en el desarrollo de asma se ha realizado a través de estudios de asociación con genes candidato (Himes y cols., 2010).

El análisis de genes candidato, se basa en el estudio de polimorfismos de genes cuya función sugiere una participación en la fisiopatología de la entidad, que se localizan en loci ligados a ésta o que se haya documentado asociación con la enfermedad en modelos animales.

Los estudios de asociación determinan la coocurrencia de una variante genética o polimorfismo con la enfermedad. En un diseño de casos y controles, si hay predominio de alguna de estas variantes en el grupo de los casos, se puede inferir que ésta

confiere riesgo para padecer la enfermedad, mientras que si el predominio se encuentra en los controles, entonces la variante se relaciona con la protección para padecer la enfermedad (Pinto y cols., 2008).

A la fecha, existen más de 10000 publicaciones que han identificado a más de 200 genes asociados con asma y fenotipos relacionados, mostrando un efecto diferencial entre las poblaciones (Wu y cols., 2010). Entre los genes más replicados se encuentran genes de receptores de reconocimiento de microorganismos (*TLRs*, *CD14*, *CARD15*); genes implicados en la función pulmonar, (*ADRB2*, *CFTR*, *SPINK5*); genes de la barrera epitelial y la inmunidad innata (*FLG* y *DEF1*); genes importantes en la interacción con el medio ambiente (*GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*) y genes involucrados en la diferenciación Th1-Th2 (*IL4*, *IL4RA*, *IFNG*, *IFNGR1*, *STAT6*, *GATA3*, *TBX21*) (Fig. 3) (March y cols., 2011; Meng y cols., 2010).

Los estudios de ligamiento han mostrado que la mayoría de los cromosomas contienen genes (Tabla 1) que confieren riesgo para desarrollar asma o que regulan la expresión o gravedad de la enfermedad (Schwartz, 2009; Martínez Aguilar, 2009; Ming-liang y Jing, 2011). Dentro de este último grupo se encuentran genes que codifican para moléculas involucradas en la remodelación de las vías aéreas incluyendo metaloproteasas (como MMP9), sus inhibidores y otras proteínas que degradan la matriz extracelular.

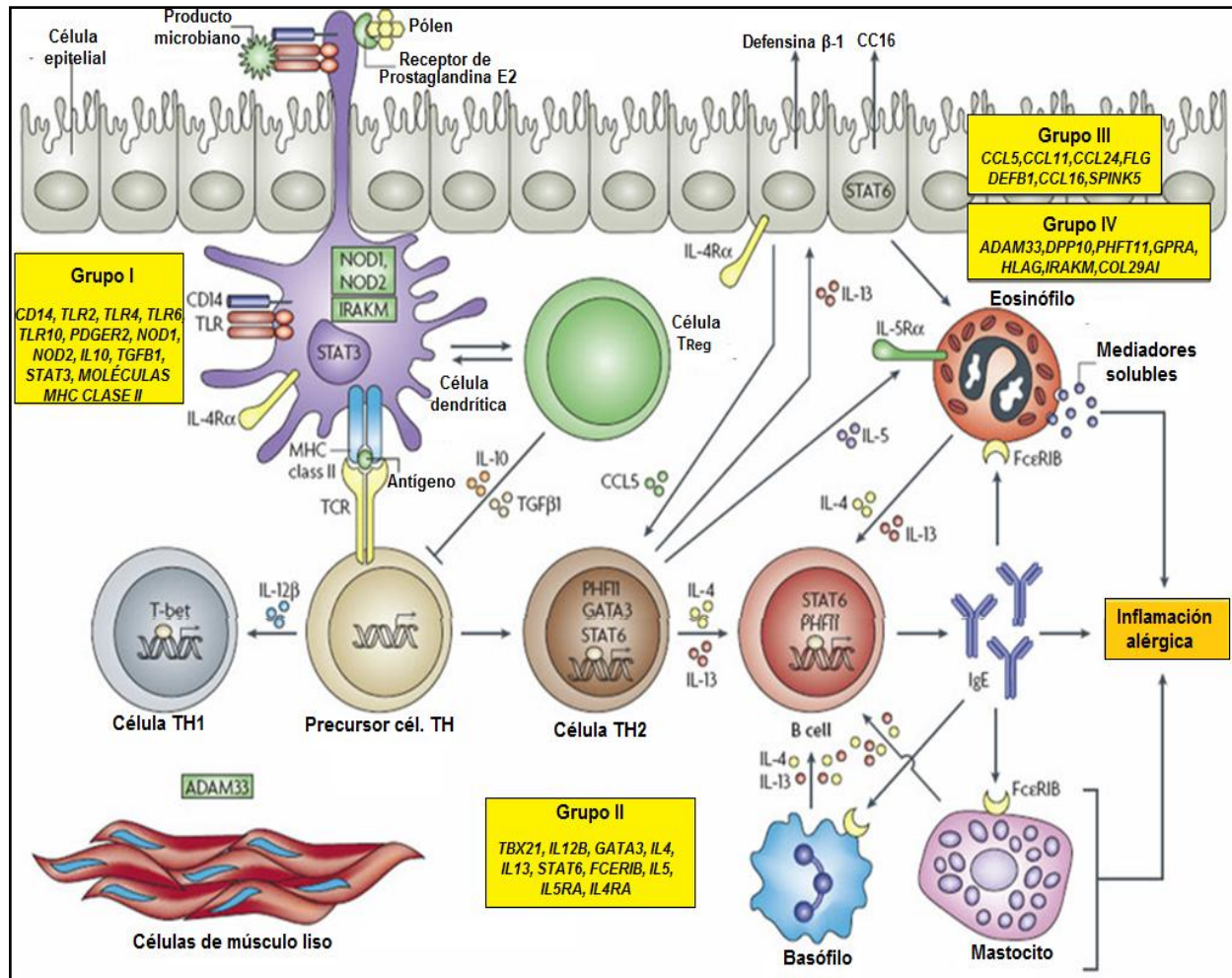


Figura 3. Genes asociados a asma y alergia. Entre los genes descubiertos a través de estudios de asociación se encuentra 4 grupos principales: Grupo I: de la respuesta inmune y diferenciación celular Th, se encuentran genes de receptores como *CD14, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, NOD1, NOD2*, citocinas inmunoreguladoras (*IL10 Y TGFB1*) y moléculas involucradas en la presentación de antígenos (*HLA-DR, HLA-DQ Y HLA-DP*). En el grupo II se incluyen genes que regulan las funciones efectoras y diferenciación celular TH2 como *GATA3, TBX21, IL4, IL13, IL4RA, FCER1B, IL5, IL5RA, STAT6 e IL12B*. El tercer grupo está formado por genes expresados en células epiteliales e incluye quimiocinas como *CCL5, CCL11, CCL24 y CCL26, DEFB1, CC16* y factores involucrados en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular epitelial (*SPINK5 y FLG*). En el Grupo IV se encuentran genes expresados en el epitelio o músculo liso: *ADAM33, CC16, SCGB1A1, CCL, CD14, COL29A1, DEFB1, defensina β1, DPP10, FCER1B, FLG, GATA3, GPRA, NPSR1 and GPRA154*; *IL4RA, IL5RA, IRAKM, NOD, PDGER2, PHF11, SPINK5, STAT, TBX21, TCR*. Tomado y modificado de Vercelli (2008).

Tabla 1.-Cromosomas y genes asociados a asma y fenotipos relacionados.

Cromosoma	Loci	Genes candidato
1	1p36,1qter,1q23	<i>FCER1A,OPN3, CHML, IL10</i>
2	2q14,2q32,2q33,2p	<i>DPP10,IL18R1, CTLA4, CD28</i>
3	3q21-q22,3q21.3,3p	<i>TLR9</i>
5	5q31-q33,5q31,5p13,5p15,5q23.3	<i>IL-4,IL-9,ZFR3,LIFR, PTGER4,ADAMTS12,IL7R</i>
6	6p21,6q24-q25,6q25.3	<i>HLA-G, ESR1,TNF-α</i>
7	7p14-p15,7q	<i>TCRG, GPR154</i>
8	8p23.3-23.2	<i>NAT2</i>
9	9p1,9p21,9p22	<i>TLE4,IFN-α</i>
11	11q13,11q21,11q,11p14	<i>FCRE1B,GSTP1</i>
12	12q13.12-q23.3,12q13-12q24,12q21,12q24.31,12q24.33	<i>SFRS8,CD45,IFN-γ, IRAK-3,VDR</i>
13	13q14,13q	<i>PHF11,CYSLTR2</i>
14	14q11.2,14q13-q23,14q24,14q23	<i>TCR,ACT</i>
17	17q21	<i>ORMDL3</i>
19	19q13,19q13.3	<i>FCER2</i>
20	20q13,20p12	<i>DAM33,JAG1,ANKRD</i>
21	21p21	-
X	Xp,Xq	-

Tomada de Ming-liang y Jing (2011).

2. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Metaloproteasas

La MEC y las quimiocinas se regulan en gran medida por la acción de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteasas de matriz (MMPs). Éstas tienen la capacidad de degradar colágenas, lamininas, fibronectina y proteoglicanos, principalmente y de activar a las quimiocinas (CXCL), moléculas involucradas en la quimiotaxis (Fig. 4) (MacMillan y cols., 2004; Atkinson y Senior, 2003; Mott y Werb, 2004). La activación de las CXCL, generalmente ocurre cuando las MMPs cortan una secuencia de aminoácidos (variable en su número) y dependiendo de la MMP que actúa sobre la quimiocina, ésta puede tener una actividad quimiotáctica aumentada o disminuida (Wolf y cols, 2008). Además, las MMPs también procesan proteínas circulantes y de superficie celular, por lo que su función alterada puede influir en el diferentes procesos celulares (Fig. 4) (MacMillan y cols., 2004).

Las MMPs se secretan como proenzimas inactivas y su actividad proteolítica se regula mediante la interacción con sus inhibidores (TIMPs: inhibidores de metaloproteasas de tejido) o al unirse con proteínas plasmáticas como la α_2 - macroglobulina. En desórdenes caracterizados por destrucción de tejido como artritis reumatoide y enfisema pulmonar, o en procesos inflamatorios como asma, las MMPs se encuentran desreguladas y frecuentemente con actividad aumentada, por lo que se cree que desempeñan un papel muy importante en etiopatogénesis de estas entidades (Van Lint y Libert, 2007).

De las MMPs conocidas en asma, las MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, y MMP9, se han encontrado aumentadas en pacientes asmáticos; sin embargo, la proteasa predominante y con mayor actividad es MMP9 (Demedts y cols., 2005).

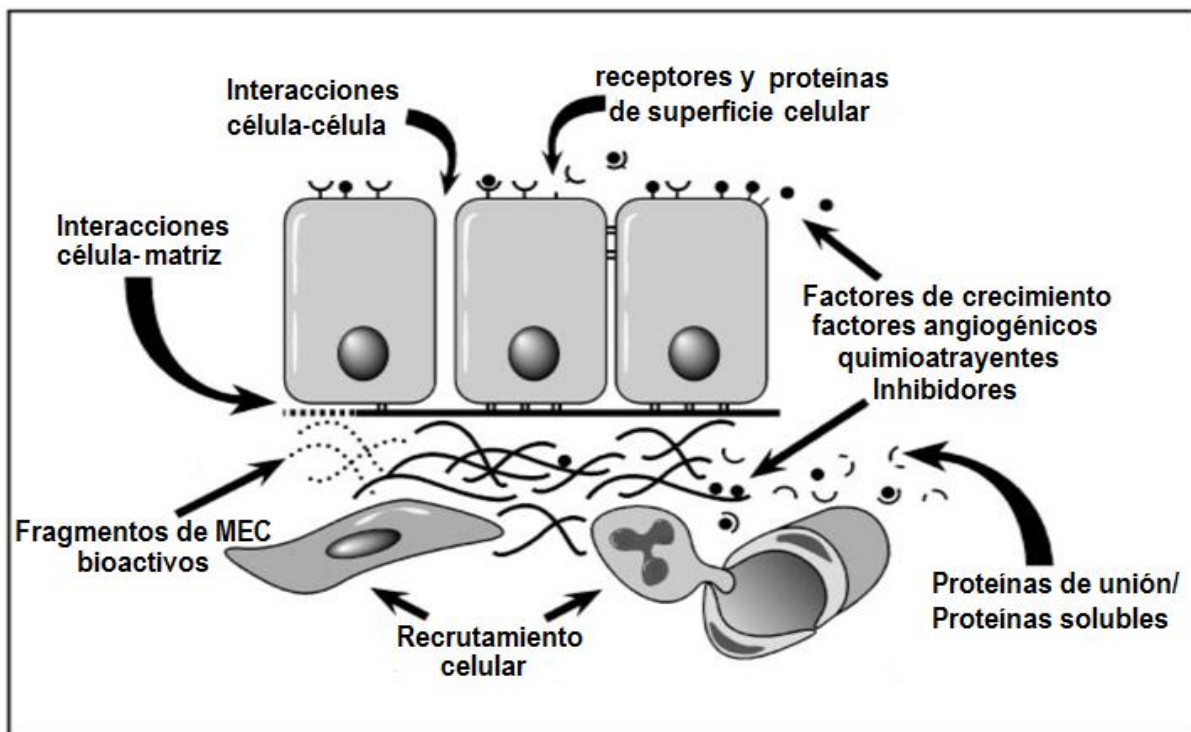


Figura 4.- Mecanismos de señalización celular mediado por las MMPs. Las MMPs regulan el comportamiento celular mediante varios mecanismos: a) alteración de interacciones célula-matriz y célula-célula; b) liberación, activación o inactivación de moléculas señalización; c) la activación o inactivación de receptores de superficie celular. Tomado y modificado de Sternlicht y cols. (2001).

2.1.1 Metaloproteasa 9

La enzima MMP9 es una colagenasa tipo IV de 92 KDa que se secreta como una proenzima de 707 aminoácidos, incluyendo el péptido señal de 19 aminoácidos. El zimógeno MMP9 está formado por 5 dominios: el propéptido amino-terminal, el dominio catalítico de unión a zinc, el dominio hemopexina carboxilo-terminal, el dominio tipo fibronectina y el dominio tipo colágena rico en prolinas (Fig. 5) (Sternlicht y cols., 2001). El dominio de hemopexina juega un papel relevante en la regulación de esta proteína, ya que es a través de él que la MMP9 se une a TIMP-1, su inhibidor (Wallon y Overall, 1997).

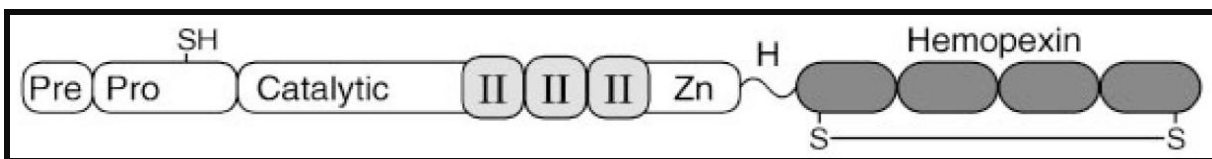


Figura 5. Estructura de MMP9. Pre, secuencia señal. Pro, propéptido con un grupo tiol (SH) de unión a zinc. Zn, sitio de unión a zinc; II, insertos tipo fibronectina de unión a colágena; H, región bisagra.

La MMP9 es producida principalmente por monocitos, neutrófilos y eosinófilos y tiene como substratos a componentes de la MEC (colágena tipo IV, V, VII y X, elastina, fibrina y fibrinógeno, fibronectina), interleucina (IL)-1 y el inhibidor alfa-proteinasa (Murdoch y Lloyd, 2010). Además, está implicada en la activación de las quimiocinas

CXCL5, CXCL6, CXCL8 y CXCL12 e inactivación de CXCL9 y CXCL10, en un mecanismo donde la MMP9 elimina de estas moléculas una secuencia de aminoácidos (Wolf y cols., 2008; Van Lint y Libert, 2007; Li y cols., 2010).

2.1.1.1 MMP9 y Asma

La MMP-9 es la principal metaloproteasa detectada en fluidos de lavado broncoalveolar, en suero, en esputo y en biopsias obtenidas de pacientes con asma (Cundall y cols., 2003; Oshita y cols., 2003; Calikoglu y cols., 2006; Zhang y cols., 2007). En un estudio donde se emplearon 14 pacientes asmáticos y 10 controles sanos, las concentraciones de MMP9 y TIMP1 en esputo inducido fueron más altas en pacientes que en controles y los niveles de la enzima correlacionaron con el número de eosinófilos y neutrófilos presentes (Xin y cols., 2007). Por otro lado, se ha reportado también que la actividad gelatinolítica de MMP9, presente en esputo de pacientes con asma severa, es mucho mayor que la que se observa en el grupo control y esta actividad se incrementa aún más cuando los pacientes son retados con alérgenos (Kelly y cols., 2000).

Los estudios en modelos murinos knockout *MMP9*^(-/-) también han dado evidencia de la importante participación de la MMP9 en la patogénesis de entidades inflamatorias. Por ejemplo se ha observado que en estos ratones, cuando son retados a alérgenos se detecta una menor infiltración peribronquial de monocitos y una menor cantidad de linfocitos en lavados broncoalveolares comparados con los ratones silvestres (Cataldo y cols., 2006). En el contexto de asma alérgica, en ratones las dosis repetidas de

ovoalbúmina resultan en un incremento significativo en la expresión de MMP9 en el epitelio de las vías aéreas y un aumento en su expresión y el de su inhibidor (TIMP1) en células inflamatorias peribronquiales (Cho y cols., 2006).

Existen evidencias que apuntan a que la sobreexpresión de la MMP9 o alteraciones en su actividad pueden ser resultado de cambios en su secuencia. En cultivos de células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos el alelo T de la variante ubicada en el promotor del gen (rs3918242) aumentó 3.48 veces la actividad transcripcional de *MMP9* (Nakashima y cols., 2006).

Los análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *MMP9* y asma son escasos y los resultados controversiales (Nakashima y cols., 2006; Ganter y cols., 2005). Nakashima y cols. (2006) reportaron una asociación entre los SNPs rs3918242, rs2274755 y rs17577 de *MMP9*, con la susceptibilidad a padecer asma en población japonesa, mientras que Ganter y cols. (2005) no lograron documentar la asociación del gen estudiando los polimorfismos -1702T/A, 6C/T, rs3918242 y rs17576 del mismo gen en niños alemanes con asma.

De este gen, únicamente el polimorfismo rs17577 se ha analizado en varias poblaciones, pero sólo se ha observado asociación con asma en población japonesa (Nakashima y cols., 2006). En México, un estudio preliminar realizado en niños asmáticos, donde se incluyeron los SNPs rs26650, rs6017725, rs6104428, rs3918274, rs2274755 rs17576 y rs17577, se documentó una asociación entre los SNP rs3918274, rs2274755 y rs17577 y el riesgo a padecer la enfermedad (Jiménez Morales, 2009).

Las divergencias entre las poblaciones en los resultados de asociación puede ser un reflejo real de su heterogeneidad genética, aunque no se pueden descartar errores

en el diseño de los estudios como un bajo poder estadístico por el tamaño de la muestra, mala selección de la muestra, estratificación poblacional, etc.. Por ello es necesario, replicar los hallazgos de estos análisis e incrementar el tamaño de la población estudiada. Además, es importante correlacionar los resultados de estudios de asociación con estudios funcionales para incrementar nuestro entendimiento de los mecanismos patogénicos del asma y otras entidades donde la MMP9 tenga una participación importante.

II. JUSTIFICACIÓN

En el último reporte de la Organización Mundial de la Salud se declaró que 300 millones de personas en el mundo padecen asma, que su prevalencia va en aumento y que durante el año 2005, hubo 255,000 fallecimientos por esta causa, de los cuales el 80 % ocurrieron en países de bajos ingresos, como el nuestro.

En México existen más de 10 millones de pacientes con asma y dado que ésta es una entidad crónica de importancia creciente, tanto en los países desarrollados como en las naciones en vías de desarrollo, la atención de los pacientes tiene un alto impacto socioeconómico para el país, convirtiéndola en un importante problema de salud pública.

Uno de los principales objetivos de la medicina es encontrar blancos terapéuticos que contribuyan a la reducción de los costos del tratamiento de esta entidad, para lo cual se deben esclarecer los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

La remodelación de las vías aéreas en pacientes asmáticos es un proceso característico de estados graves de la enfermedad y es causa principal de mortalidad. En el proceso de remodelación, las MMPs juegan un papel importante y, dentro de éstas, la MMP9 es la más predominantemente encontrada en vías aéreas de pacientes asmáticos. Existen evidencias de que los polimorfismos en el gen *MMP9* confieren susceptibilidad a padecer asma, sin embargo, no se conoce su efecto sobre los niveles de expresión de la proteína o en su actividad.

Sin duda el entendimiento del papel de esta proteína en la fisiopatología del asma podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas.

III. HIPÓTESIS

Polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos y de región reguladora del gen *MMP9*, se asocian con la susceptibilidad a desarrollar asma en población pediátrica mexicana

IV. OBJETIVOS

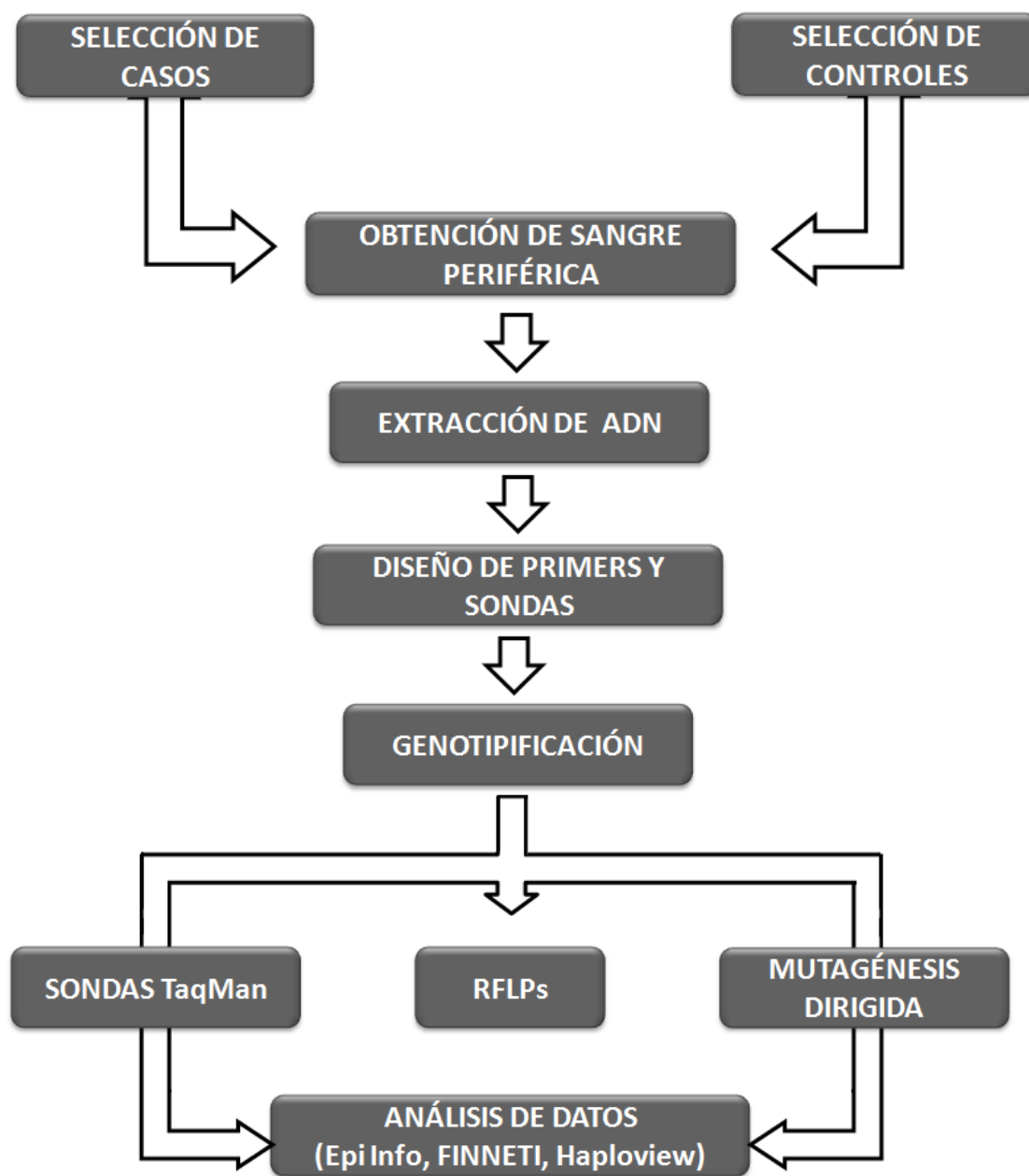
1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si polimorfismos en el gen *MMP9* confieren riesgo para desarrollar asma en la población mexicana.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Conocer si existen SNPs o haplotipos del gen *MMP9* de susceptibilidad a asma.
- ❖ Identificar Tag SNPs en la población mexicana.
- ❖ Evaluar *in silico* el efecto funcional de los SNPs asociados a asma.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. METODOLOGÍA

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

En un estudio de asociación de casos y controles se incluyeron 403 pacientes asmáticos pediátricos y 426 individuos sanos no relacionados del banco de ADN del Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, INMEGEN. Los pacientes fueron reclutados de 4 Instituciones de tercer nivel de la Cd. de México. Cada paciente fue evaluado por un médico Neumólogo o Alergólogo quienes llenaron la hoja de captación de datos.

Los controles fueron obtenidos del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría. Se captaron controles mayores de 18 años para disminuir la probabilidad de seleccionar individuos con susceptibilidad a padecer asma u otra enfermedad atópica. Todos los controles nacieron en México, al igual que sus padres, abuelos y bisabuelos (mexicanos-mestizos). El estudio contó con la aprobación de los comités de ética de las Instituciones participantes.

En el estudio se utilizó el programa QUANTO para determinar el tamaño de muestra necesaria asumiendo un modelo de riesgo aditivo, con la finalidad de alcanzar un poder estadístico del estudio mayor al 80%.

1.1 Criterios de inclusión y de exclusión

➤ Pacientes

Los pacientes incluidos fueron individuos mexicanos de entre 5 y 17 años y con diagnóstico clínico y funcional de asma (espirometría). Fueron excluidos los

pacientes con diagnóstico de cualquier otra enfermedad crónica concomitante (Fibrosis Quística, Tuberculosis, Fibrosis pulmonar, etc.).

➤ **Controles**

Se incluyeron individuos sanos, sin antecedentes de asma o alergia, mayores de 18 años y se excluyeron a los individuos con antecedentes de asma, atopia o cualquier otro tipo de enfermedad crónica de vías respiratorias.

Por otra parte fueron eliminados del estudio pacientes y controles con enfermedades infectocontagiosas y aquellos que una vez tomada la muestra decidieron alejarse del estudio.

2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez que los participantes aceptaron firmar la carta de consentimiento informado, de cada individuo se tomaron 10 ml de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante.

2.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico de cada muestra fue realizada a partir de los leucocitos, empleando el kit QIAgen Blood (QIAGEN, GmbH D-40724, Hilden Germany) y bajo las especificaciones establecidas por el proveedor.

3. ANÁLISIS DE GENOTIPIFICACIÓN

La genotipificación de los polimorfismos del gen *MMP9* se realizó empleando 3 metodologías diferentes: 5' exonucleasa (sondas Taqman), mutagénesis dirigida y RFLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). La selección de la técnica fue en función de las características de las secuencias que rodean a los SNPs incluidos en este estudio.

3.1 Discriminación alélica a través del método fluorescente de la 5' exonucleasa (TaqMan).

Siete de los polimorfismos (rs3918245, rs41427445, rs3918249, rs2274755, rs17576, rs17577, rs9509) fueron genotipificados mediante la técnica fluorescente de discriminación alélica 5' exonucleasa, usando sondas Taqman (Applied biosystem Foster City, CA, USA). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones establecidas por el proveedor Applied Biosystem (Tabla 2) en termocicladores 9700 HT (Applied Biosystem). La lectura de fluorescencia para la determinación de los genotipos se llevó a cabo en el equipo de tiempo real.

Tabla 2. Condiciones de reacción de TaqMan

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 seg	45
60 °C	1 min	
4 °C	α	1

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas contenían en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR, los primers hibridan con una secuencia específica del templado de ADN. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda TaqMan también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de ADN polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. Esto nos permite diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (Macweeney y cols., 2000) (Fig. 6).

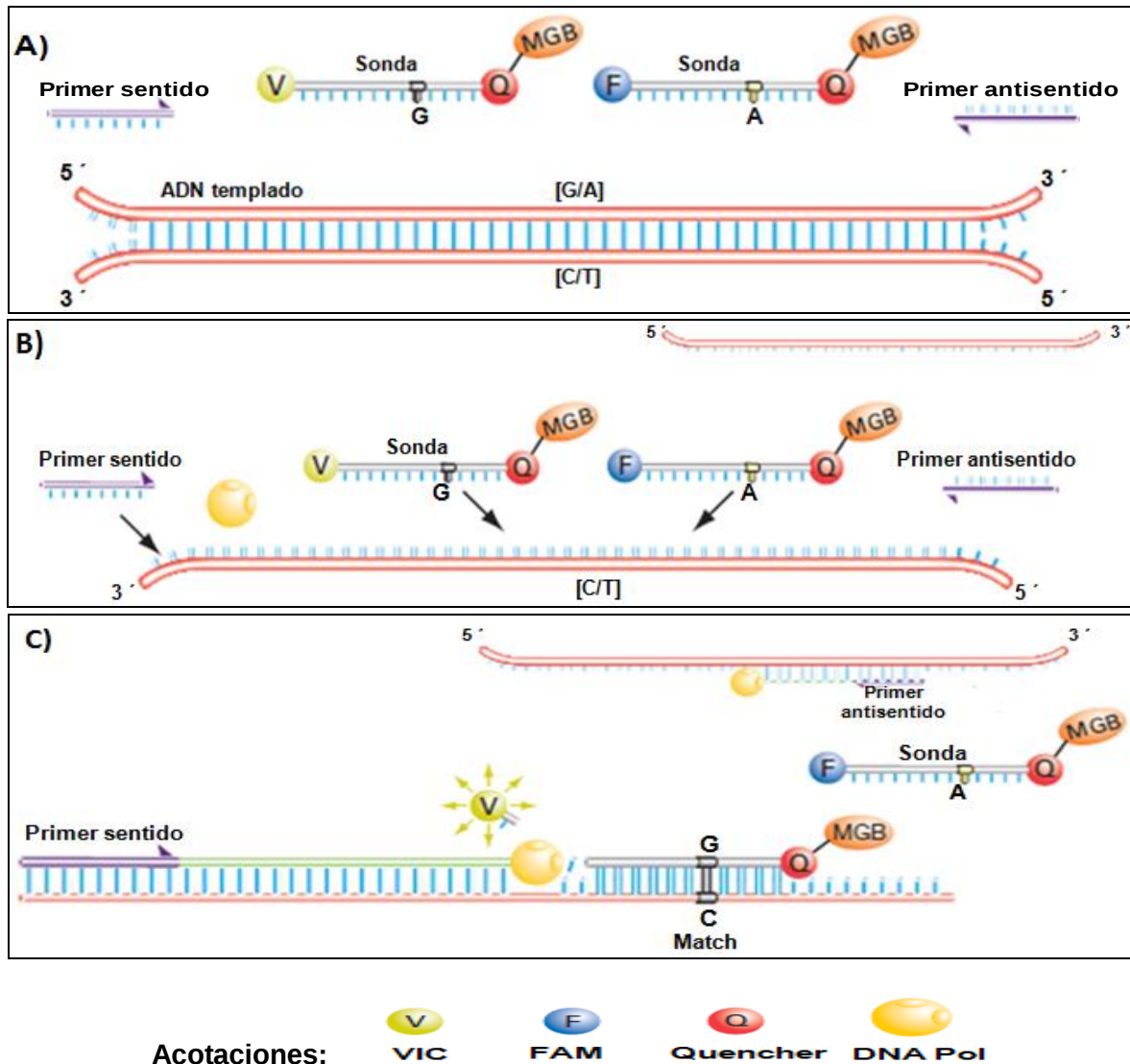


Figura 6. Fundamento de la discriminación alélica a través del método fluorescente de la 5' exonucleasa (TaqMan). A) Elementos necesarios para que se lleve a cabo la discriminación alélica. B) Desnaturalización del templado, alineamiento de los primers y la sonda. De acuerdo al genotipo del ADN templado una o ambas sondas pueden hibridar con su secuencia complementaria. C) Proceso de polimerización y emisión de la señal fluorescente. Las sondas. Durante la polimerización la sonda hibridada es hidrolizada por la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa siendo liberado el reportero (VIC ó FAM, ó ambos) lo que resulta en la emisión de una señal fluorescente.

3.2 Método RFLPs

Para la identificación de los alelos de polimorfismos tipo SNP es necesario que esta variación elimine o cree un sitio de restricción para una endonucleasa determinada (RFLPs) (Fig. 7) (Hayashida y cols., 2010) . Uno de los polimorfismos localizado en el gen *MMP9* (rs3918242) fue genotipificado mediante RFLPs.

Para el análisis mediante RFLPs, inicialmente el fragmento de ADN fue amplificado usando la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador 9700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) empleando un par de oligos específicos para la secuencia de interés descritos por Sadeghi y cols. (2009) (primer F: 5´ GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC 3´; primer R: 5´ CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC 3´) obteniéndose un fragmento de 460 pares de bases. La reacción se realizó con 50 ng de ADN, 2nM de dNTPs, 2.5 pmoles de cada primer, 2U de AmpliTaq Gold polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂ y 1X de buffer (Applied Biosystem Foster City, CA, USA) en un volumen final de 25µl.

El programa de PCR consistió de 1 ciclo a 95°C durante 10 min, 30 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 60°C y 30 seg a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C. Posteriormente, los productos de PCR se sometieron a digestión con 5U de la enzima *SphI* (Biolabs, New England) la cual permitió la discriminación del polimorfismo rs3918242 (-1562 C/T) a una temperatura de incubación de 37°C durante 12 hrs.

Posteriormente, se realizó una electroforesis con los productos de la digestión en geles de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio para visualizar el ADN, durante 90 min a 100 V. Después del corrimiento, se realizó finalmente la visualización de los productos derivados de la restricción y el registro fotográfico en un fotodocumentador (Upland, CA. USA).

De esta manera se identificaron los patrones electroforéticos correspondientes al homocigoto CC (460 pb) con ausencia de sitios de restricción en ambos alelos, al homocigoto para el alelo T (258 y 202 pb) el cual ganó un sitio de restricción en el alelo mutado en ambos alelos y el heterocigoto CT (460, 258 y 202 pb) quien porta un alelo con el sitio de restricción y el otro sin el sitio.

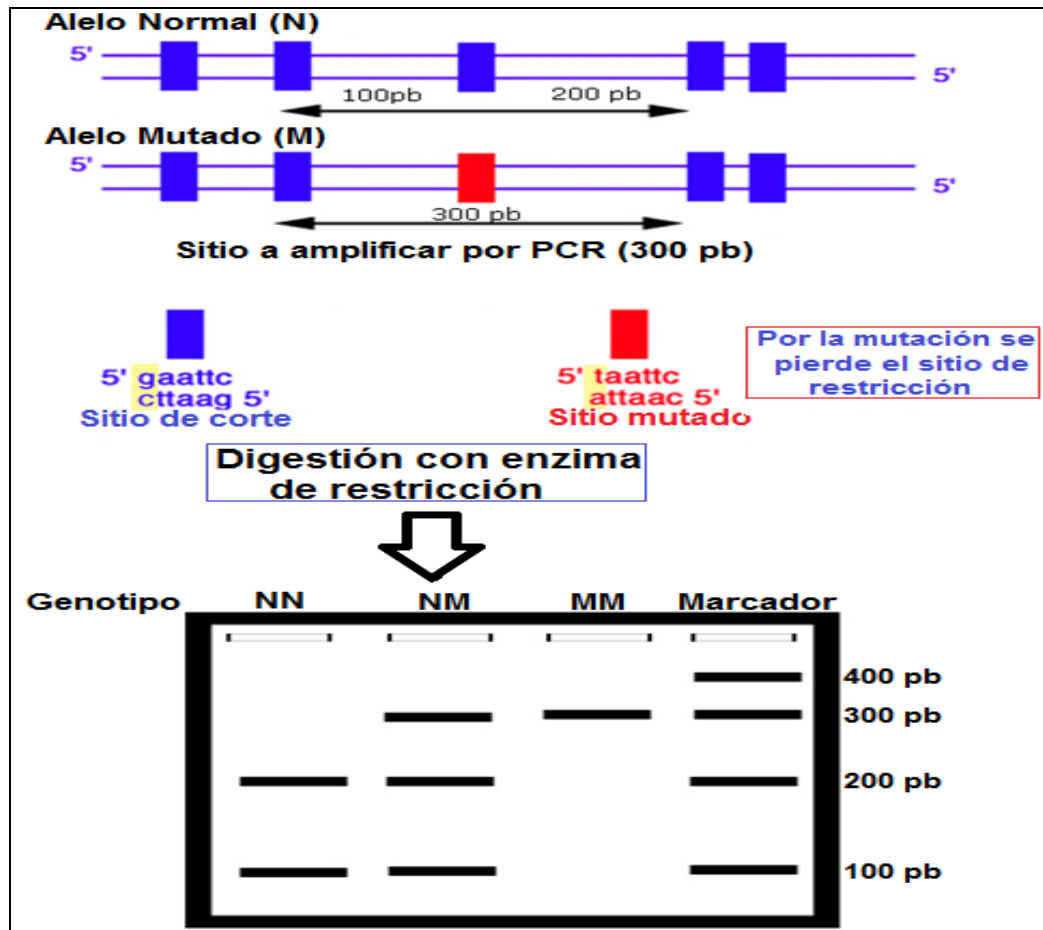


Figura 7. Fundamento de la técnica de RFLPs. Se amplifica por PCR el fragmento que contiene el polimorfismo. El amplicón es sometido a restricción con una endonucleasa específica que permite discriminar entre el alelo normal y el mutado mediante el reconocimiento de un sitio de corte específico ya sea en el alelo normal o en el mutado, de esta manera se genera un patrón de bandeo específico para cada genotipo.

3.3 Método de Mutagénesis Dirigida

El principio de la mutagénesis dirigida toma como ventaja que la variación polimórfica crea una secuencia propicia para generar o eliminar un sitio de restricción para una enzima, con la simple introducción de una mutación puntual dentro de uno de los oligonucleótidos empleados como cebadores para la amplificación. De manera similar a la técnica de RFLPs, los fragmentos amplificados son digeridos con enzimas de restricción y visualizados en geles de agarosa (Allemandou y cols., 2003).

La amplificación de la región genética que contiene el polimorfismo rs2250889 G/C se llevó a cabo mediante PCR en un termociclador 9700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) empleando los primers descritos por Cong y cols. (2009) (primer F: 5' GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC 3'; primer R: 5' CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC 3') obteniéndose un fragmento de 112 pb . El primer Forward inserta una mutación a -2pb de donde se ubica la variante analizada creando el sitio de restricción para la enzima *BamH I*. La reacción se realizó con 50 ng de ADN, 2nM de dNTPs, 2.5 pmoles de cada primer, 2U de AmpliTaq Gold polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂ y 1X de buffer (Applied Biosystem Foster City, CA, USA) en un volumen final de 25µl. El programa de PCR consistió de 1 ciclo a 95°C durante 10 min, 30 ciclos de 20 seg a 95°C, 20 seg a 60°C y 30 seg a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C. Posteriormente, los productos de PCR se sometieron a digestión con 5U de la enzima (*BamH I*), a una temperatura de incubación de 37°C durante 12 hrs.

Los productos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó durante 90 min a 100 V.

De esta manera se lograron observar los patrones de bandeo correspondientes a cada genotipo para el SNP rs2250889. En el gel de agarosa para homocigoto GG que no contiene el sitio de corte para BamH I se observa una banda de 112 pb, el homocigoto CC que sí genera un sitio de corte se observa a 93 pb y para el heterocigoto GC se observan ambas bandas (112 pb 93 pb) .

En este análisis se incluyeron 9 SNPs: 2 localizados en región promotora, 2 en región intrónica, 4 en región codificante, y 1 en 3'UTR del gen *MMP9* (Fig. 8).

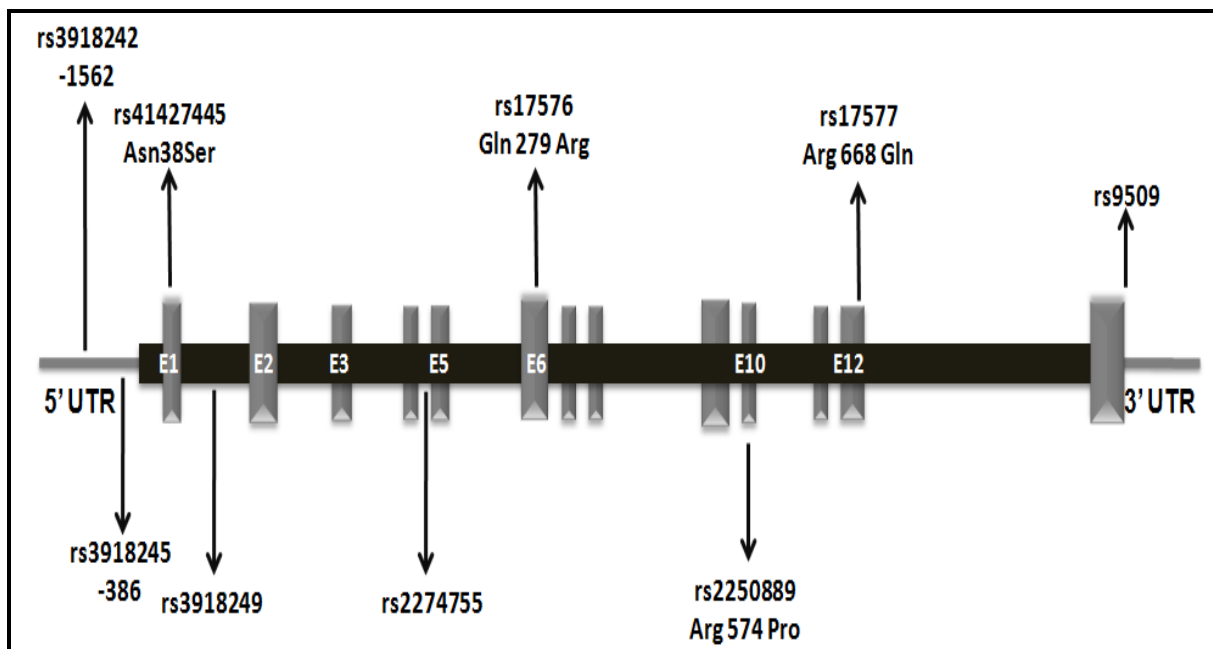


Figura 8. Localización de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) incluidos en este estudio. Los cuadros en gris representan los exones.

4. VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de genotipificación fueron validados mediante secuenciación al azar cada uno de los genotipos de los SNPs incluidos. De igual manera, usando primers específicos para cada SNP (Tabla 3), se secuenciaron 15 individuos: 5 homocigotos para el alelo ancestral, 5 heterocigotos y 5 homocigotos del alelo menos común.

Tabla 3. Lista de primers para la secuenciación de los polimorfismos del gen MMP9.

SNP	Primer	Secuencia (5' - 3')	Temperatura de Alineamiento (°C)	Producto (pb)
rs3918242	1MMP9-F	GCA TGG TAC ATA GTA GGC CTG	59	412
	1MMP9-R	CAC CTG CCG TCC TGT ACT GAA	60	
rs3918245	2MMP9-F	GTT CCA GCT GAC GAC ACG GA	61	322
	2MMP9-R	ACT CTG GAC GCA GCA TAC CA	59	
rs41427445	3MMP9-F	GAT GAC TCA ACG CGC ACA GTG	60	355
	3MMP9-R	CAG GAT ACG CTG AGG TCA GC	58	
rs3918249	4MMP9-F	AAT GGG CAA TGG GGC TTT CCT A	61	255
	4MMP9-R	CAT CAC TGT GCC TGG CTA TTT C	59	
rs2274755	5MMP9-F	CAAGCT ACC CAG CCG GCA CGA	59	421
	5MMP9-R	CGT CAAGCT ACC ACC CAG CCT G	61	
rs17576	6MMP9-F	CAAGCT ACC CGT CAG CCA GG	59	312
	6MMP9-R	CCTAGC CCG GCA TCG CTT AGA C	61	
rs2250889	7MMP9-F	GCC CCT TCC TTA TCG CCG ACA	60	303
	7MMP9-R	TTG AGC CTC CTT GAC TGA TGG G	62	
rs17577	8MMP9-F	GCT AGC CGG CTC AGC ACC TGT G	58	401
	8MMP9-R	TAC AAA CCA CCT GCC GTC CTG TAC	60	
rs9509	9MMP9-F	CGG ACT TAC GCA TGC CGG ACG T	57	325
	9MMP9-R	ACC CGG TAC GTA GCA TGC CGC AG	58	

5. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL EFECTO DE SNPS ASOCIADOS A ASMA.

Mediante las herramientas bioinformáticas disponibles públicamente “SNP Function Prediction” y “Fast SNP” se predijo el posible efecto de los SNPs que se asociaron con la susceptibilidad a padecer asma. Además para un análisis más detallado, se emplearon los algoritmos “Human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing”, “SplicePort: An Interactive Splice Site Analysis Tool” y “SNPs3D”.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las diferencias en la distribución de alelos y genotipos entre casos y controles fue evaluada mediante la prueba de χ^2 incluida en el programa Epi Info v. 6.02 (CDC Atlanta USA). Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados como significativos. La evaluación de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó a través del programa FINNETI (<http://ihg2.helmholtzmuenchen-de/cgi-bin/hw/hwa1>). Los haplotipos se generaron y analizaron mediante el programa HAPLOVIEW 3.32 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/contact.php>). El poder estadístico del estudio se estimó mediante el programa QUANTO.

VII. RESULTADOS

1. POBLACIÓN ANALIZADA

Se estudiaron un total de 403 pacientes asmáticos diagnosticados con base en los criterios clínicos establecidos por la American Thoracic Society e iniciativa Global para el Asma (GINA). De éstos, 246 (61%) fueron del género masculino y 157 (39%) femeninos, con una edad promedio de 11.5 ± 3.3 años. La población control estuvo conformada por 426 individuos sanos no relacionados: 251 (59%) masculinos y 175 (41%) femeninos.

2. Análisis de genotipificación

Para todos los polimorfismos la distribución de los genotipos en los casos y controles se encontró en HWE [rs3918242 $p=0.3408$; rs41427445 (no informativo); rs3918245 (no informativo); rs3918249 $p=0.2291$; rs2274755 $p=0.3663$; rs17576 $p=0.1485$; rs2250889 $p=0.7735$; rs17577 $p=0.3663$; rs9509 $p=0.3011$].

2.1 Polimorfismos que no mostraron evidencia de asociación

Al comparar la distribución tanto de las frecuencias alélicas como genotípicas entre los casos y los controles, en 4 de los SNPs analizados (rs3918242, rs17576, rs2250889, rs9509) no se observaron diferencias estadísticamente significativas y 2 de los SNPs analizados (rs3918245, rs41427445) fueron no informativos para nuestra población (Tabla 4 y 5).

Tabla 4.- Frecuencias alélicas de SNPs que no presentaron asociación con asma.

SNP	Alelo Menor	Frecuencia alelo menor		OR	p
		Controles (%)	Casos (%)		
rs3918245	G	0	0	---	---
rs41427445	G	0	0	---	---
rs3918242	T	3.2	4.1	1.27[0.751-2.16]	0.3673
rs17576	G	18.6	20.7	1.38[0.930-2.05]	0.0992
rs2250889	G	27.2	27.1	0.99 [0.79-1.23]	0.9477
rs9509	T	22.4	20.7	0.90 [0.71-1.14]	0.4022

OR: Razón de momios

Tabla 5.- Frecuencias genotípicas de SNPs que no presentaron asociación con asma.

SNP		Controles n(%)	Casos n(%)	OR	p
rs3918242		N=381	N=398		
	CC	357(93.7)	368(92.5)		0.3910
	CT	23(6.0)	27(5.8)		
	TT	1(0.3)	3(1.7)		
	CC vs CT			1.13[0.64-2.02]	0.6574
	CC vs TT			2.91[0.30-28.1]	0.3334
	CC vs CT + TT			1.21[0.69-2.11]	0.4963
rs17576		N=419	N=400		
	CC	282(67.3)	252(63.0)		0.2870
	CG	118(28.2)	130(32.5)		
	GG	19(4.5)	18(4.5)		
	CC vs CG			1.23[0.91-1.66]	0.1734
	CC vs GG			1.06[0.54-2.06]	0.8636
	CC vs CG + GG			1.20[0.90-1.67]	0.1962
rs2250889		N=403	403		
	CC	212(36)	212(49)		0.8638
	CG	163(42)	166(41)		
	GG	28(22)	25(10)		
	CC vs CG			1.01[0.76-1.35]	0.9012
	CC vs GG			0.89[0.50-1.58]	0.6976
rs9509		N=410	N=391		
	CC	243(59.3)	242(61.9)		0.3890
	CT	150(36.6)	136(34.8)		
	TT	17(4.1)	13(3.3)		
	CC vs CT			0.91[0.68-1.22]	0.5293
	CC vs TT			0.76[0.36-1.61]	0.4853
	CC vs CT + TT			0.89[0.67-1.19]	0.4474

El rs3918242 fue determinado mediante la metodología RFLPs, amplificándose primero el fragmento de 460 pb (Fig. 9) y mediante restricción con la enzima *SphI* se lograron de terminar los genotipos (Fig. 10); el homocigoto CC se observa a 460 pb, para el homocigoto TT se genera un sitio de restricción para *SphI* (258 y 202 pb) y el patrón de bandas para el heterocigoto CT es 460, 258 y 202 pb (Fig. 9).

Se lograron identificar para el genotipo CC 357 (93.7%) individuos en controles y 368 (92.5%) en los casos; se identificaron 23 (6%) heterocigotos CT en controles y 27 (5.8%) en los casos; y del homocigoto TT en controles se observó únicamente un individuo (0.3%) y 3 (1.7%) en los casos.

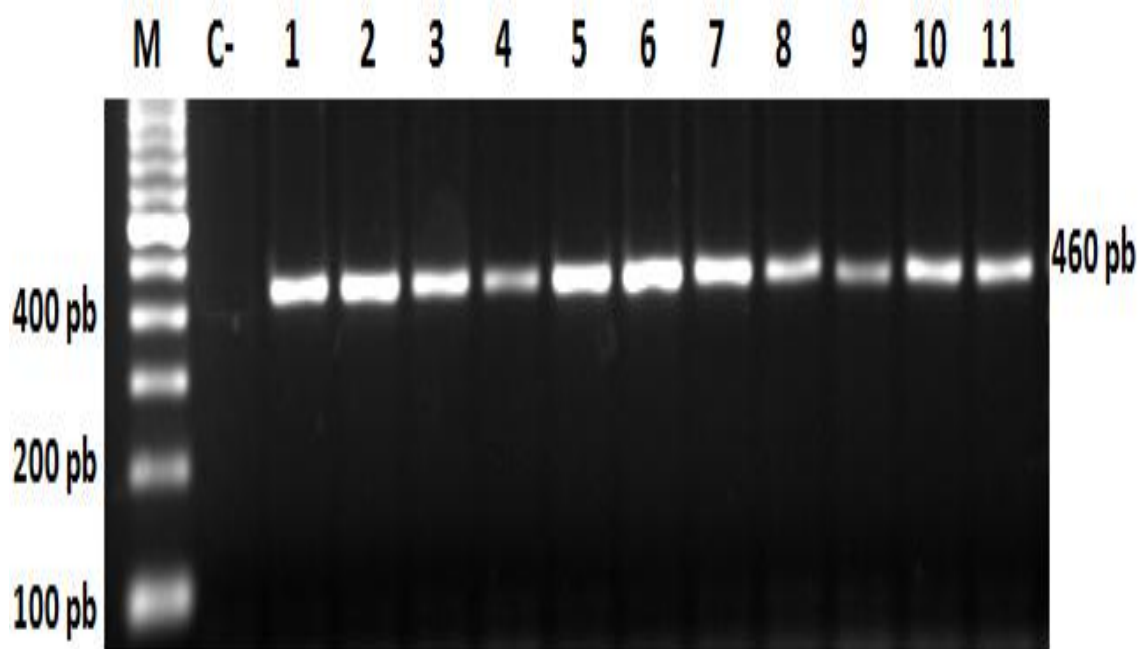


Figura 9.-Amplificación del fragmento que contiene el polimorfismo rs3918242. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador ADN 100 pb; C- : control sin ADN; carriles 1-8: ADN de pacientes.

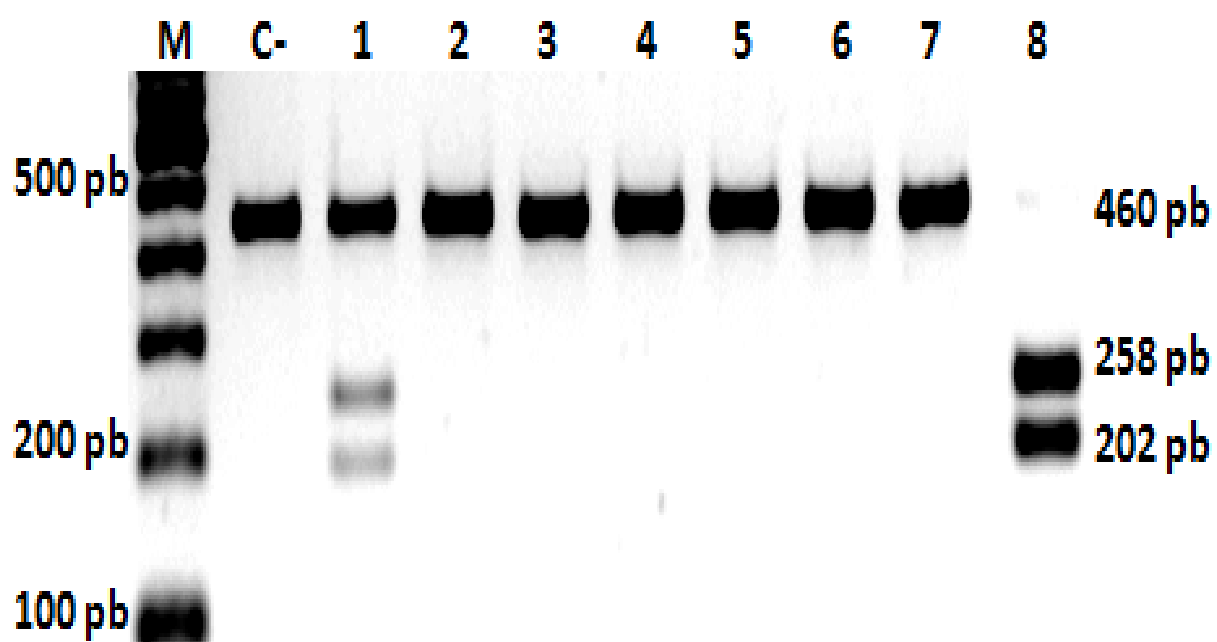


Figura 10. *Análisis del SNP rs3918242 con la enzima SpH I.* Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. M: marcador ADN 100 pb; C- : muestra sin restringir; carril 1: individuo heterocigoto CT; carriles 2-7: individuos homocigotos CC; y carril 8: individuo homocigoto TT.

El análisis de rs2250889 fue realizado a través de la técnica de mutagénesis dirigida. Se amplificó un fragmento de 112 pb (Fig. 11) y posteriormente fue sometido a restricción con la enzima *BamH I* para la determinación de los genotipos.

En el gel de agarosa para el homocigoto GG se observa una banda de 112 pb, en el caso del homocigoto CC que sí genera un sitio de corte para *BamH I* se observa una banda 93 pb y para el heterocigoto GC se observan ambas bandas (112 pb y 93 pb) (Fig. 12).

Se lograron identificar 212 individuos homocigotos para el alelo C tanto en los controles (52.6%) como en los casos (49%); en los controles se observaron 163 (40.4%) individuos heterocigotos y 166 (41%) en los casos, mientras que homocigotos para el alelo G, se identificaron 28 (7%) individuos en controles y 25 (10%).

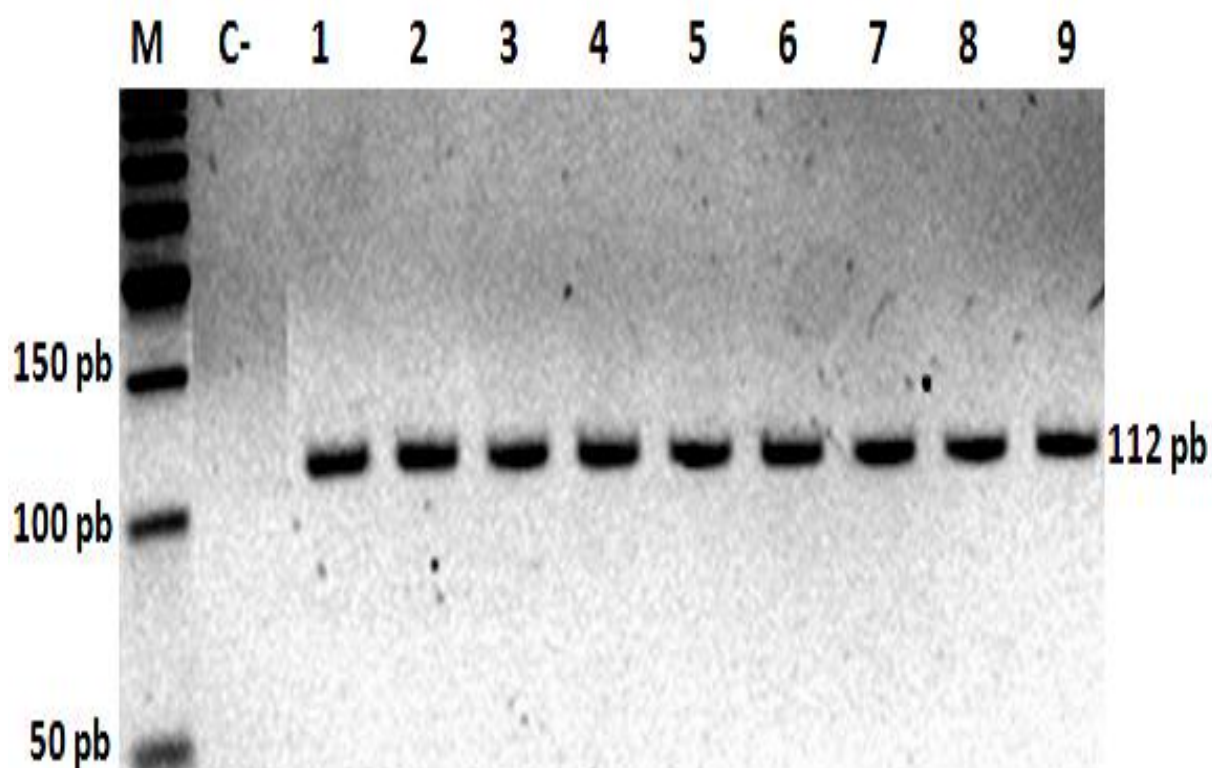


Figura 11.-Producto de PCR para el análisis del SNP rs2250889. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. M: marcador ADN 50 pb; C- : control negativo; carriles 1-9: amplicón de 112 pares de bases amplificado a partir de ADN de pacientes.

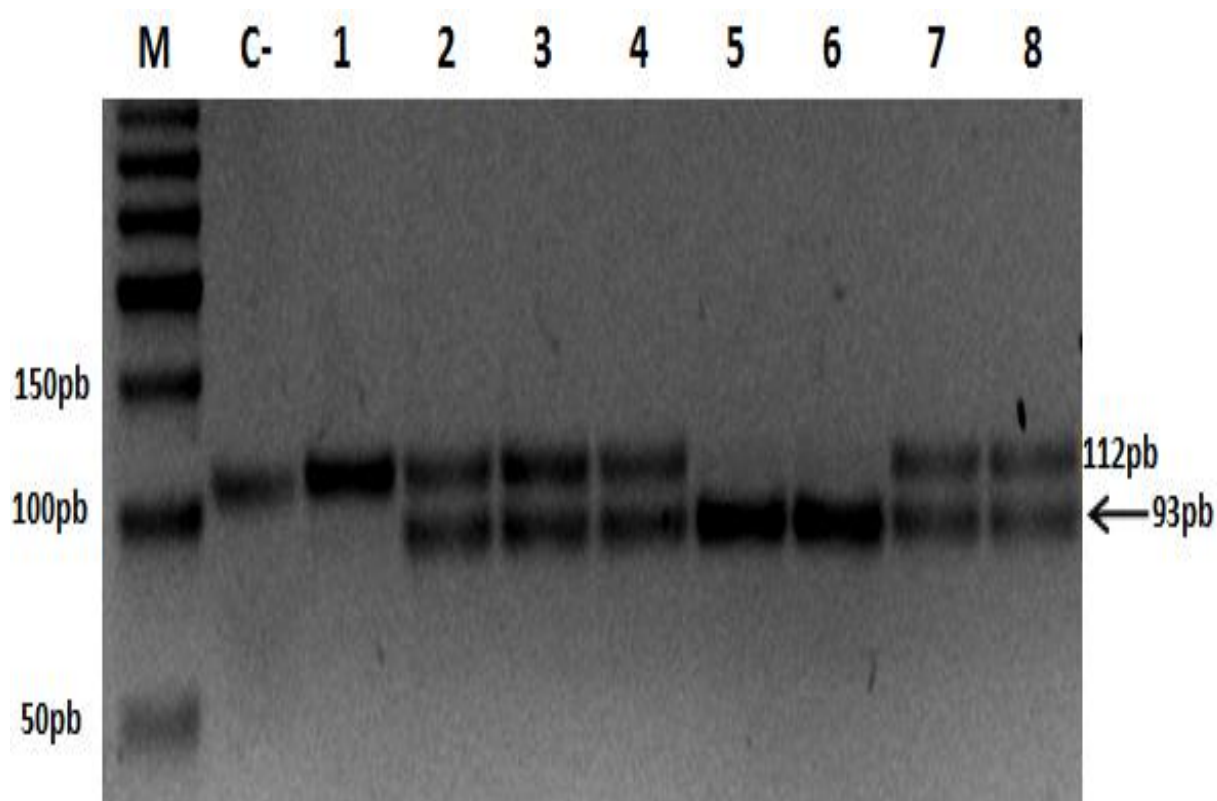


Figura 12. Análisis por restricción del polimorfismo rs2250889 con la enzima BamH I: Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. M: marcador ADN 50 pb; C- : control (muestra sin restringir); carril 1: individuo homocigoto GG; carriles 2-4,7,8: individuos heterocigotos GC; y carriles 5 y 6: individuos homocigotos CC.

Para el alelo menor del SNP rs3918245 (no informativo en nuestra población) se realizó un análisis comparativo con las frecuencias reportadas en otras poblaciones y éstos datos fueron graficados (Fig. 13).

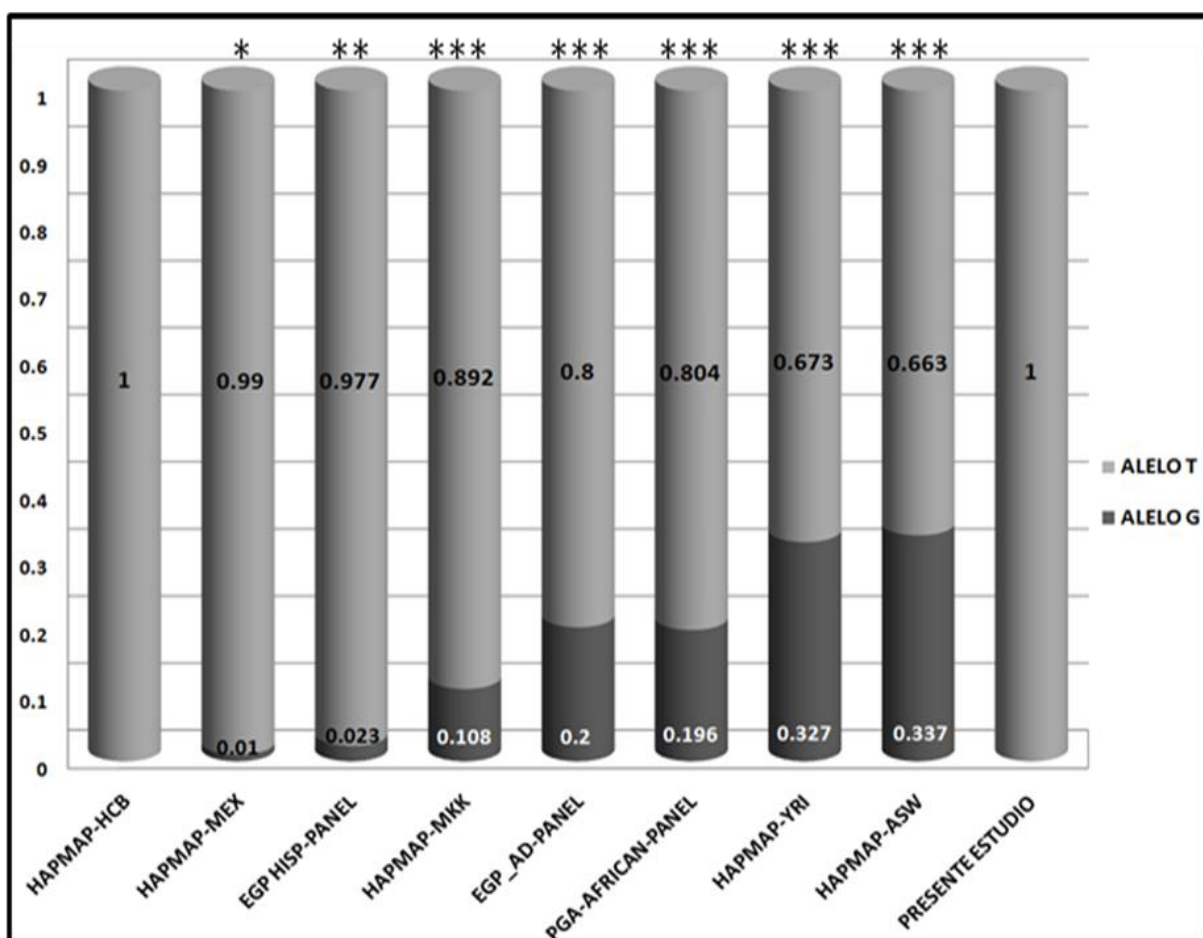


Figura 13. Frecuencias alélicas del SNP rs3918245 en diferentes poblaciones.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.00005$. HAPMAP-HCB: Chinos; HAPMAP-MEX: individuos con ancestría mexicana residentes de los Ángeles, California; EGP HISP-PANEL: españoles; HAPMAP-MKK: Maasai de Kinyawa, Kenia; EGP_AD-PANEL: afroamericanos; PGA-AFRICAN-PANEL: afroamericanos; HAPMAP-YRI: Yorubas de Nigeria; HAPMAP-ASW: individuos con ancestría africana residentes del sur de Estados Unidos.

2.2 Polimorfismos con evidencia de asociación

En el análisis del SNP rs3918249, las distribuciones alélica y genotípica entre casos y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6). Sin embargo al estratificar por género se documentó una asociación dependiente del sexo femenino, donde la frecuencia del alelo C fue mayor en pacientes que en los controles (25.7% vs 17.1%, respectivamente), siendo este un alelo de riesgo: OR=1.66 (IC 95% 1.14 – 2.43; p= 0.0077). En estado homocigoto, el alelo C presentó cerca de dos veces mayor del valor del OR= 3.01 (IC 95% 1.10 – 8.23; p= 0.0254) que en estado heterocigoto, sugiriendo un efecto aditivo (Tabla 7).

Tabla 6.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3918249 del gen MMP9 en población total.

rs3918249		Controles	Casos	OR	p
		n (%)	n (%)		
Alelos		N=842	N=794		
	T	682(81.0)	616(77.6)		
	C	160(19.0)	178(22.4)	1.23[0.96-1.56]	0.0881
Genotipos		N=421	N=397		
	TT	280(66.5)	239(60.2)		
	TC	122(29)	138(34.8)		0.0929
	CC	19(4.5)	20(5.0)		
	TT vs TC			1.32[0.98-1.78]	0.0642
	TT vs CC			1.23[0.64-2.36]	0.5274
	TT vs CT + CC			1.31[0.98-1.74]	0.0612

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3918249 del gen MMP9 estratificando por género.

POBLACIÓN		Controles n(%)	Casos n(%)	OR	p
MASCULINA		N=492	N=490		
	Alelos				
	T	392(79.7)	390(79.6)		
	C	100(20.3)	100(20.4)	1.00[0.73-1.37]	0.9742
	Genotipos				
	TT	N=246 159(64.6)	N=245 152(62.0.)		
	TC	74(30.1)	86(35.1.)		0.09741
	CC	13(5.3)	7(2.9)		
	TT vs TC			1.21[0.83-1.78]	0.3162
	TT vs CC			0.56[0.21-1.45]	0.2286
	TT vs TC + CC			1.11[0.77-1.61]	0.5510
FEMENINA		N= 350	N=304		
	Alelos				
	T	290(82.9)	226(74.3)		
	C	60(17.1)	78(25.7)	1.66[1.14-2.43]	0.0077
	Genotipos				
	TT	N=175 121(69.1)	N=152 87(57.2)		
	TC	48(27.5)	52(34.2)		0.0104
	CC	6(3.4)	13(8.6)		
	TT vs TC			1.50[0.93-2.43]	0.0929
	TT vs CC			3.01[1.10-8.23]	0.0254
	TT vs TC + CC			1.67[1.06-2.63]	0.0256

La distribución alélica entre casos y controles de los SNPs rs2274755 (intrón 4) y rs17577 (exón 12: Arg668Gln) presentó diferencias estadísticamente significativas. Los alelos de menor frecuencia T y A de los SNPs rs2274755 y rs17577, respectivamente se presentaron en 6.5% de los casos y en el 3.2% de los controles, se obtuvo un OR de 2.10 (IC 95% 1.31-3.39, $p=0.0017$).

La frecuencias idénticas de ambos alelos observadas tanto en casos como en controles sugiere desequilibrio de ligamiento. También se observaron diferencias genotípicas ($p=0.0020$) (Tabla 8)

Dado que la población analizada de pacientes está conformada mayoritariamente por casos con atopia, se estratificó tomando en cuenta este parámetro, los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en la población total, observándose diferencias estadísticamente significativas tanto alélica como genotípicamente ($p=0.0005$ y $p=0.0007$), sin embargo los valores de p aumentaron un orden de magnitud en ambos caso. Los alelos de menor frecuencia T y A de los rs2274755 y rs17577, respectivamente confieren un OR de riesgo a padecer asma OR=2.38 (IC 95% 1.44-3.96, $p=0.0005$), éstos mismos alelos en estado homocigoto (TT y AA) comparado con el heterocigoto (GT y GA) mostraron diferencias estadísticamente significativas en población atópica ($p=0.001$) con un OR= 2.4 (IC 95% 1.25 – 3.45) (Tabla 9).

Tabla 8.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2274755 y rs17577 del gen *MMP9* en población total.

SNP		Controles <i>n</i> (%)	Casos <i>n</i> (%)	OR	<i>p</i>
rs2274755		<i>N</i> =852	<i>N</i> =806		
Alelos	G	825(96.8)	754(93.5)	2.10[1.31-3.39]	0.0017
	T	27(3.2)	52(6.5)		
Genotipos		<i>N</i> =426	<i>N</i> =403		
	GG	400(93.9)	354(87.8)	2.07[1.25-3.45]	0.0020
	GT	25(5.9)	46(11.5)		
	TT	1(0.2)	3(0.7)		
	GG vs TT			3.39[0.35-32.7]	0.2623
	GG vs GT			2.07[1.25-3.45]	0.0040
	GG vs GT+TT			2.13[1.29-3.49]	0.0023
rs17577		<i>N</i> =852	<i>N</i> =806		
Alelos	G	825(96.8)	754(93.5)	2.10[1.31-3.39]	0.0017
	A	27(3.2)	52(6.5)		
Genotipos		<i>N</i> =426	<i>N</i> =403		
	GG	400(93.9)	354(87.8)	2.07[1.25-3.45]	0.0020
	GA	25(5.9)	46(11.5)		
	AA	1(0.2)	3(0.7)		
	GG vs AA			3.39[0.35-32.7]	0.2623
	GG vs GA			2.07[1.25-3.45]	0.0040
	GG vs GA+AA			2.17[1.29-3.49]	0.0023

Tabla 9.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2274755 y rs17577 del gen MMP9 en población atópica.

SNP		Controles n (%)	Casos n (%)	OR	p
rs2274755		N=852	N=524		
	Alelos				
	G	825(96.8)	486(92.7)	2.38[1.44-3.96]	0.0005
	T	27(3.2)	38(7.3)		
	Genotipos				
	GG	N=426	N=263		
rs17577					
	Alelos				
	G	825(96.8)	486(92.7)	2.38[1.44-3.96]	0.0005
	A	27(3.2)	38(7.3)		
	Genotipos				
	GG	N=426	N=263		
	GA	400(93.9)	226(86.2)		
	AA	25(5.9)	34(13.0)		0.0007
		1(0.2)	2(0.8)		
	GG vs TT			3.54[0.31-39.2]	0.2719
	GG vs GT			2.40[1.40-4.13]	0.0010
	GG vs GT+TT			2.45[1.44-4.16]	0.0006
	GG vs TT			3.54[0.31-39.2]	0.2719
	GG vs GA			2.40[1.40-4.13]	0.0010
	GG vs GA + AA			2.45[1.44-4.16]	0.0006

4. ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS

El análisis de la distribución general de haplotipos que incluyó los 7 SNPs que fueron informativos en nuestra población, mostró la formación de un bloque en alto desequilibrio de ligamiento conformado por los rs3918249, rs2274755 y rs17576 (LD=90) (Fig. 14). Estos SNPs conformaron 4 haplotipos con una frecuencia mayor al 1% (TGA, CGG, CTG, CGA). El haplotipo CTG, conformado por todos los alelos de riesgo mostró diferencias estadísticamente significativas, presentándose en un porcentaje mayor en casos que en controles (6.1 vs 2.9) y mostró un OR de 2.14 (IC 95%: 1.28-3.6; p=0.0018) (Tabla 10)

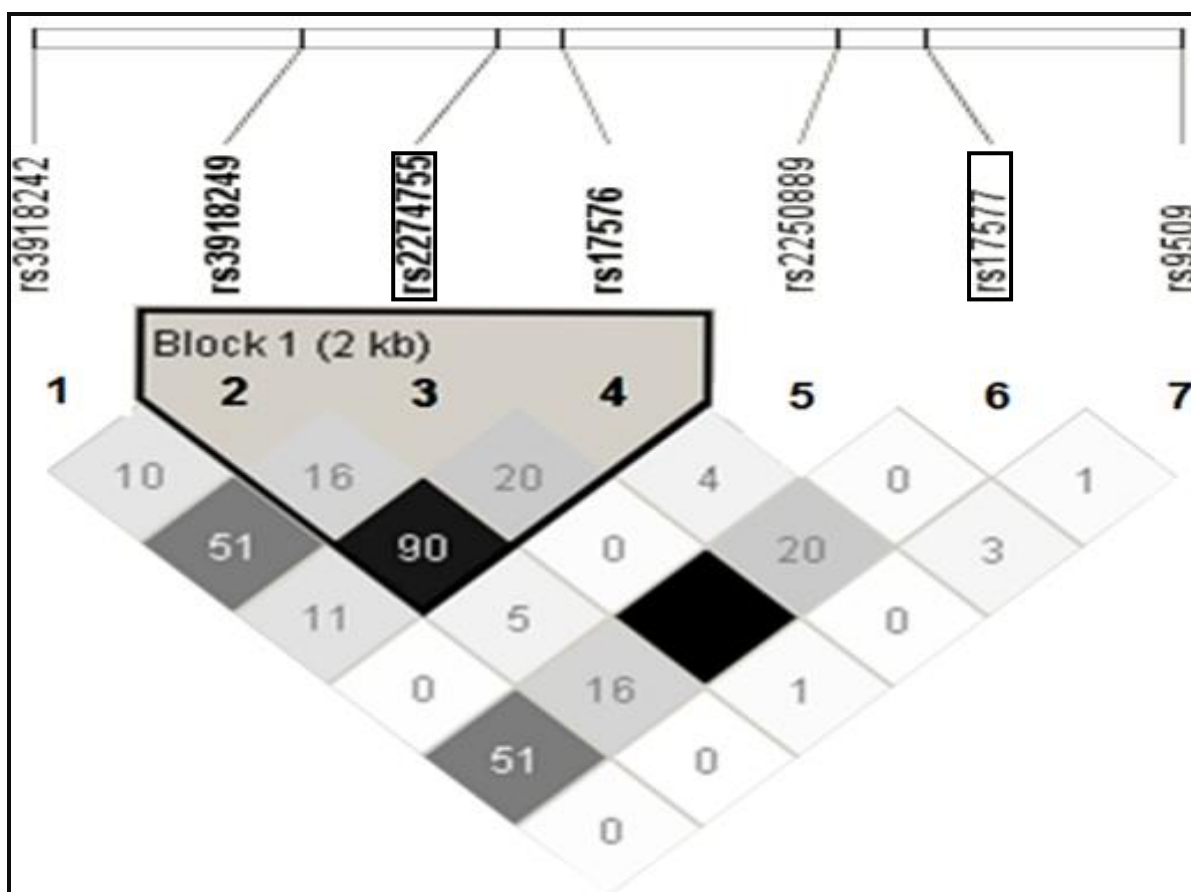


Figura 14. Plot de desequilibrio de ligamiento en la población de estudio. Diagrama de desequilibrio de ligamiento, la intensidad de los colores indican el nivel de ligamiento entre los marcadores. Los SNPs encerrados en recuadros (rs2274755 y rs17577) se encuentran en 100% de desequilibrio de ligamiento.

Tabla 10. Tabla general de distribución de haplotipos en población total.

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia</i>		<i>OR[95%IC]</i>	<i>P</i>
	<i>Controles</i>	<i>Casos</i>		
rs3918249 T/C, rs2274755 G/T, rs17576 A/G				
TGA	0.807	0.774	0.82[0.64-1.05]	0.116
CGG	0.153	0.144	0.94[0.71-1.24]	0.686
CTG	0.029	0.061	2.14[1.28-3.60]	0.001
CGA	0.008	0.016	1.94[0.72-1.84]	0.229

Solo se muestran los haplotipos > 1% y los alelos de riesgo se marcan en fondo gris.

Se analizó también la distribución de haplotipos estratificando por género. De manera similar a lo observado en la población total, en población femenina y en población masculina se formó un solo bloque en desequilibrio de ligamiento conformado por los rs3918249, rs2274755 y rs17576.

En la población masculina se formaron 4 haplotipos con frecuencias >1% de los cuales, el haplotipo CTG conteniendo los tres alelos de riesgo mostró diferencias estadísticamente significativas con un OR=2.39 (IC 95%: 1.08-5.41; p=0.018); este haplotipo se presentó en el 4.8% de los casos y en el 2% de los controles.

En lo que respecta al género femenino también se obtuvieron 4 haplotipos y dos de ellos mostraron diferencias estadísticamente significativas. El haplotipo TGA que contiene los tres alelos ancestrales se presentó en 82% de los controles y en 78.7%

de los casos mostrando un OR=0.67 (IC 95%: 0.45-0.99; p=0.036). El haplotipo CTG se encontró asociado a riesgo con un OR=2.08 (IC 95%:1.04-4.21; p=0.025) y estuvo presente en 8.3% en casos y en 4,2% de los controles (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de haplotipos estratificando por género.

Haplotipos	Frecuencia		OR[95%IC]	P
	Casos	Controles		
POBLACIÓN MASCULINA Bloque: rs3918249 T/C, rs2274755 G/T, rs17576 A/G				
TGA	0.794	0.787	0.96[0.69-1.32]	0.834
CGG	0.176	0.148	0.82[0.57-1.16]	0.275
CTG	0.020	0.048	2.39[1.08-5.41]	0.018
CGA	0.008	0.012	1.46[0.36-6.17]	0.396
POBLACIÓN FEMENINA Bloque: rs3918249 T/C, rs2274755 G/T, rs17576 A/G				
TGA	0.820	0.754	0.67[0.45-0.99]	0.036
CGG	0.123	0.138	1-14[0.71-1.84]	0.564
CTG	0.042	0.083	2.08[1.04-4.21]	0.025
CGA	0.008	0.022	2.72[0.63-13.37]	0.091

Solo se muestran los haplotipos > 1% y los alelos de riesgo se marcan en fondo gris.

4. ANÁLISIS *IN SÍLICO* DE SNPS ASOCIADOS A ASMA.

4.1 Análisis del SNP rs2274755

Inicialmente, se hizo un análisis general, a través de las herramientas “SNP Function Prediction” y “FastSNP” para evaluar el posible efecto del SNP rs2274755. Mediante ambas herramientas se predice que este SNP se encuentra localizado en un sitio de splicing.

Para poder corroborar este hallazgo se empleó la base de datos disponible “Human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing” para de esta manera evaluar la localización del sitio donador de splicing 5´ en el intrón 4 del gen *MMP9* y si éste contiene el SNP de nuestro interés.

Los resultados obtenidos muestran que efectivamente éste SNP se localiza a +3pares de bases del término del exón 4 y que además, éste se encuentra formando parte del motif del sitio donador de splicing 5´ (Fig.15).

El algoritmo SplicePort: An Interactive Splice Site Analysis Tool permitió evaluar si el alelo T (de riesgo) de este SNP podría estar afectando el sitio de splicing. Se determinó que el reemplazo del alelo ancestral (G) por el alelo T podría modificar la secuencia consenso del sitio donador de splicing 5´ (Fig. 16). Como se muestra en la figura 16, el sitio consenso de splicing permite el cambio de una purina por otra purina (R: Adenina ó Guanina), pero no por una pirimidina (Timina), como en este caso, lo cual podría explicar el efecto de este alelo en la susceptibilidad al asma.

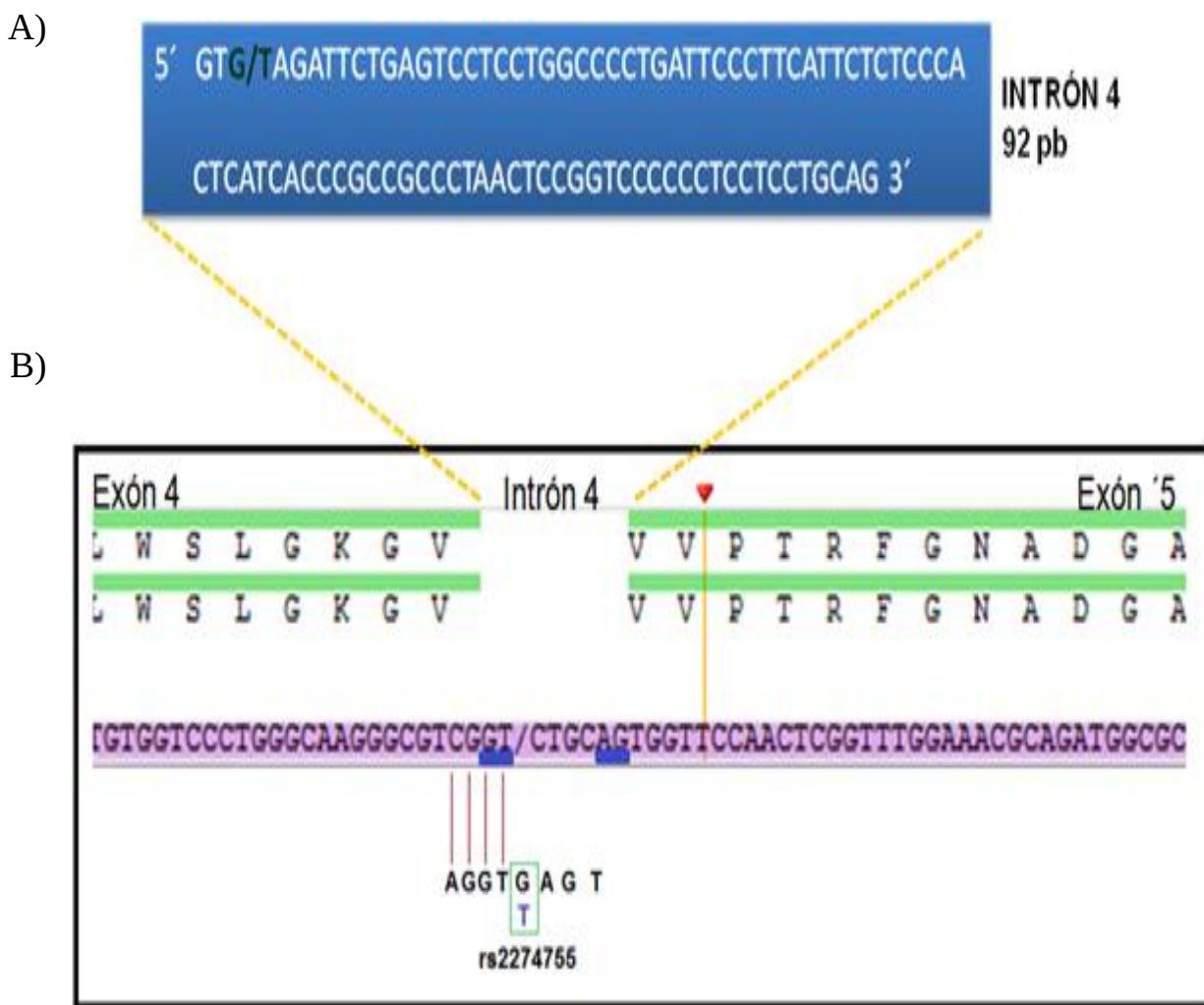


Figura 15. Sitios de splicing entre el exón 4 y exón 5, y localización del SNP rs2274755. A) secuencia de nucleótidos que conforman el intrón 4. En letras negras se muestran las variantes del SNP B) Representación esquemática del sitio de splicing entre el exón 4 y exón 5. Se muestra también la localización del rs2274755 dentro de la secuencia consenso reconocida por la maquinaria de splicing.

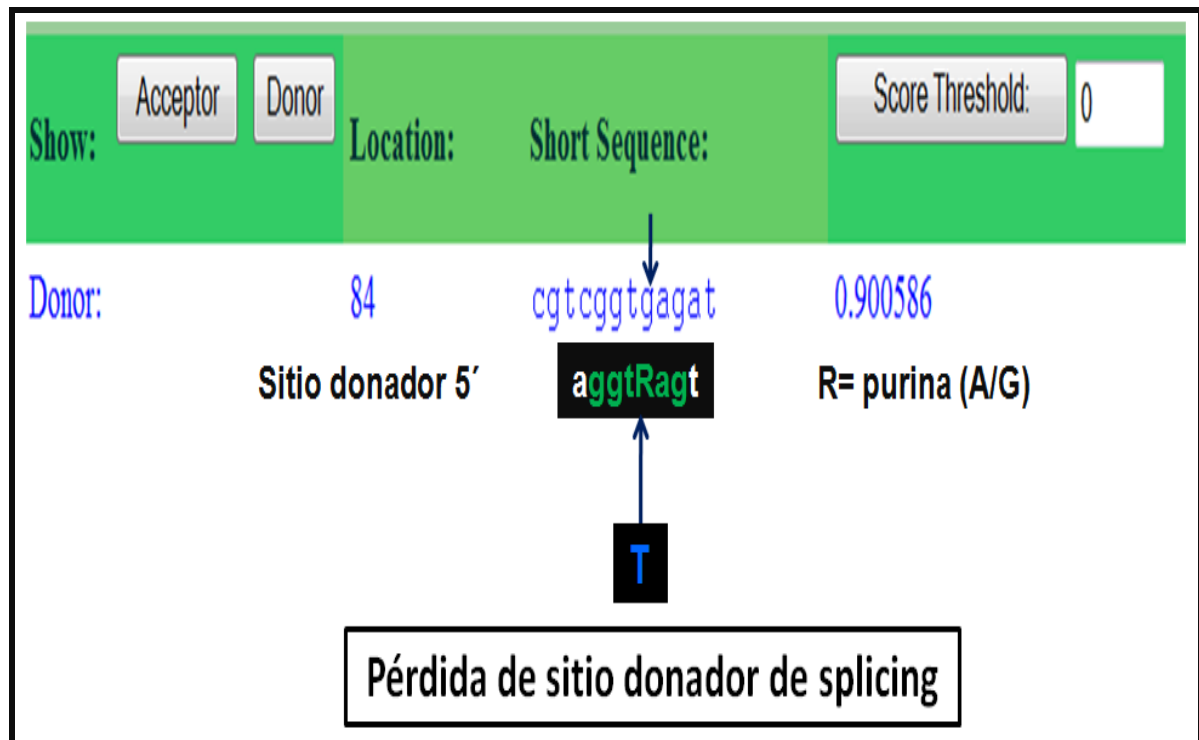


Figura 16. Predicción de pérdida de splicing en presencia del alelo T de riesgo del SNP rs2274755. La pérdida del sitio donador de splicing puede generar que la retención de intrones conduciendo a efectos en la proteína como: a) la inserción de un codón de paro prematuro produciéndose una proteína truncada no funcional; b) la generación de una proteína con una nueva función o; c) la modificación del uso de codones comunes lo que podría influir en la expresión de la proteína.

4.2 Análisis del SNP rs17577

El SNP rs17577 G/A produce el reemplazo de una Arginina por la Glutamina en el aa 648 cuando se encuentra presente el alelo A. Este SNP fue analizado mediante los programas Pmut pathogenicity y SNP3D, que permiten evaluar SNPs codificantes no sinónimos.

Estos dos programas predicen un efecto patológico para la presencia del alelo A. SNPs3D predice posibles cambios en la estructura proteica de MMP9 como pérdida de interacciones salinas y puentes de hidrógeno con aminoácidos adyacentes (Fig. 17 y Tabla 12).

En la tabla 12, en sombreado gris se pueden identificar las variables en las que se predice pueden estarse afectando debido a la sustitución del aminoácido en la posición 668. Para todas las variables que se modifican (excepto enlaces salinos o y pérdida de puentes de hidrógeno) los cambios son expresados en Kcal/mol.

Por ejemplo el programa SNPs 3D sugiere que la Arg en el aa 668 establece una interacción salina con el ácido Glutámico del aa 544. La substitución de la Arg668 por una Glutamina afectaría esta interacción y probablemente la estructura de la proteína.

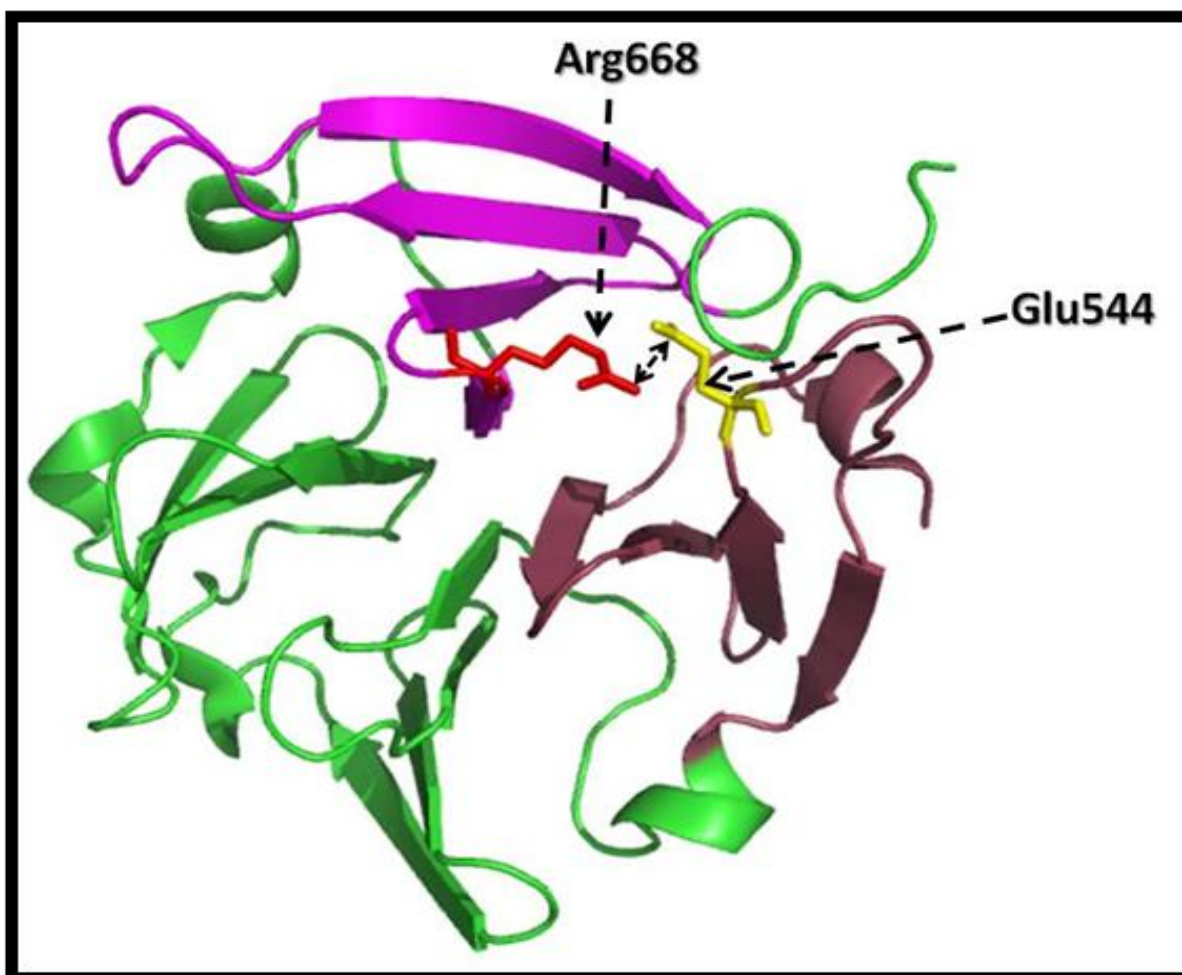


Figura 17. Localización del aminoácido Arg668 en la proteína MMP9. El aminoácido Arg668 se encuentra localizado en el dominio hemopexina y probablemente se encuentre interactuando con el aminoácido Glu544 localizado en el mismo dominio.

Tabla 12. Cambios en la estructura de MMP9 predichas por SNPs3D.

Acceso de la secuencia	NP_004985
SNP	R668Q
accesabilidad de superficie	0.09
Introducción de repulsión electrostática	No
Ruptura de puentes disulfuro	No
Pérdida de efecto hidrofóbico (kcal/mol)	0.07
Pérdida de enlaces salinos	Sí
Pérdida de puentes de hidrógeno	1
Pérdida de interacción polar-polar (kcal/mol)	ganancia 2.4
Pérdida de interacción polar-carga (kcal/mol)	0.25
Pérdida de interacción carga-carga (kcal/mol)	1.27

VII. DISCUSIÓN

La remodelación de las vías aéreas es el proceso patológico más importante que se asocia a la irreversibilidad de la obstrucción bronquial en pacientes con asma crónica, a la gravedad de la enfermedad y a la resistencia terapéutica. Este proceso es una fibrosis subepitelial progresiva acompañada de cambios estructurales de las vías aéreas como consecuencia de la degradación de las moléculas que conforman a la MEC y la membrana basal, principalmente. Ambos tejidos constituidos fundamentalmente por proteoglicanos, elastina, laminina, fibronectina, glicoproteínas y colágena tipo IV y V. Bajo esta red compleja de macromoléculas las enzimas claves responsables de la degradación de la MEC son las MMPs, dentro de ellas, la MMP9 es una de las más relevantes en asma. Esta enzima puede degradar un amplio rango de moléculas de MEC, excepto colágena tipo I, y tiene una potente actividad proteolítica para degradar a la colágena tipo IV, el principal componente de la membrana basal. Se ha sugerido que una mayor actividad o altos niveles de MMP9 en vías aéreas, son un fenómeno pivote en el proceso de remodelación asociado a asma (Atkinson, 2003; Zhang y Wenzel, 2007; Kelly y cols., 2000; Lee y cols., 2001; Lim y cols., 2006).

Existen evidencias que señalan que la sobreexpresión de la MMP9 o alteraciones en su actividad pueden ser resultado de cambios en su secuencia, de hecho se ha demostrado una correlación entre el SNP rs3918242 localizado en la región promotora (-1562 C/T) con la expresión del gen en cultivos de células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos (Nakashima y cols., 2006), sin

embargo, los resultados de asociación no se han reproducido en todas las poblaciones analizadas.

El objetivo de esta tesis fue determinar si polimorfismos en el gen *MMP9* confieren riesgo para desarrollar asma en la población mexicana. Se analizaron 9 SNPs del gen *MMP9* en 403 casos y 426 controles. Los rs3918245 y rs41427445 no fueron informativos para nuestra población (Tabla 4), sin embargo para otras poblaciones la variante rs3918245 si es polimórfica, de hecho en residentes en el sur de Estados Unidos con ancestría Africana (HAPMAP-ASW) se han descrito frecuencias de hasta casi 34% (Fig. 13). Lo mismo sucede para la variante rs41427445 aunque las frecuencias de ésta han reportado únicamente en una población heterogéneas (R24) conformada por 6 individuos caucásicos, 6 afroamericanos, 6 asiáticos y 6 hispanos, y el alelo menor G se encuentra presente en el 6% de dicha población. Estos datos apoyan la hipótesis de heterogeneidad genética que existe entre las poblaciones y fundamentan la necesidad de evaluar a cada población.

De los 7 SNPs que fueron informativos para nuestra población, el rs9509 y el rs2250889, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (Tabla 4 y 5). Ninguno de estos SNPs habían sido evaluados en pacientes asmáticos. El rs9509 únicamente se ha analizado en pacientes con sepsis severa y no se documentó asociación (Chen y cols., 2009), por su lado el rs2250889 se ha encontrado asociado con cáncer de pulmón (Zhibin y cols., 2005), melanoma cutáneo maligno (Cotignola y cols., 2007) y cáncer de piel (Hongmei y cols., 2008).

El SNP rs3918242 (-1562C/T) y su asociación con asma ha sido ampliamente

analizado, pero los resultados de éstos son controversiales. Mientras al igual que lo descrito en poblaciones alemana y australiana (Ganter y cols., 2005), nuestros hallazgos no demuestran asociación con asma (Tabla 4 y 5). Nakashima y cols. (2006) encontraron que en células epiteliales bronquiales de pacientes asmáticos que presentan el alelo T del rs3918242 los niveles de expresión de *MMP9* aumentan más de tres veces comparados con las células que portan el alelo C, Además, este mismo grupo, también reportó una asociación con asma en pacientes japoneses (Nakashima y cols., 2006).

Otra variante que no mostró diferencias estadísticamente significativas en nuestra población ($p=0.2870$) (Tabla 4 y 5), es el rs17576, la cual ha sido evaluada en poblaciones australiana, japonesa y alemana, con resultados similares a nuestro estudio (Nakashima y cols., 2006; Ganter y cols., 2005; Lose y cols., 2005), sin embargo se ha reportado como una variante de riesgo en niños asmáticos no atópicos alemanes (Pinto y cols., 2010). En el presente trabajo no fue posible analizar de manera aislada los pacientes con asma no atópica debido a que es un número muy reducido (16 pacientes) que presentan esta característica por lo que no se puede descartar la participación del rs17576 en la susceptibilidad al desarrollo de este tipo de asma.

Por su parte, en el análisis del rs3918249, se documentó asociación con el riesgo a padecer asma en población femenina (Tabla 7). El alelo de menor frecuencia C, confiere 1.66 veces de riesgo a padecerla (IC 95%: 1.14-2.43; $p=0.0077$) y éste aumenta a 3.01 cuando se encuentra en estado homocigoto (IC 95%: 1.10-8.23; $p=0.0254$) lo cual sugiere un efecto aditivo de esta variante. La asociación género-

dependiente ha sido observado frecuentemente en los estudios de asociación entre SNPs y asma, por ejemplo se ha reportado en casos mexicanos que el alelo A de *TNF-308G/A* confiere hasta 4 veces más de riesgo para padecer asma y artritis reumatoide en población femenina comparado con la población masculina (Hunninghake y cols., 2010).

Aún se desconocen los mecanismos moleculares que expliquen la interacción entre estos SNPs y el género en la etiopatogenia del asma, los estudios epidemiológicos sugieren que las mujeres presentan un riesgo más elevado de padecer asma durante la adolescencia y también de sufrir un tipo de asma más severa que los varones, es probable que la participación de hormonas sexuales estén interactuando con estos genes a través de diversos mecanismos aún no bien esclarecidos.

Los SNPs rs2274755 y rs17577 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (Tabla 8) y se encontraron en total desequilibrio de ligamiento (Fig. 14). Nuestros datos mostraron que el hecho de poseer el alelo T del rs2274755 (2127 G/T) riesgo confiere 2.17 veces de riesgo (IC 95%; $p=0.0017$). Por su parte, la presencia del alelo A del rs17577 se asocia con la susceptibilidad a padecer asma en los niños mexicanos, confirmando un riesgo de 2.17 veces riesgo (IC 95%; $p=0.0017$).

De acuerdo a los datos obtenidos del análisis *in silico*, el alelo T de riesgo del rs224755 podría alterar proceso de splicing entre el exón 4 y 5 del gen *MMP9*, ya que se genera un sitio donador 5' débil que podría conducir a la retención del intrón 4 (Fig. 15 y 16). Se ha observado este fenómeno de retención de intrones en genes de

humano como TNF- β , kalikreina, apolipoproteína E4, proteína 61 rica en cisteínas etc, (Weil y cols., 1990; Xu y cols., 2008; Lacovoss y cols., 2005; Hischfeld y cols., 2009). Se sabe que la retención de intrones puede tener consecuencias como la inserción de un codón de paro prematuro produciéndose una proteína truncada no funcional, generación de una proteína con una nueva función o la modificación del uso de codones comunes lo que influye en la expresión de la proteína (Favoretto y cols., 2004).

Por su parte, el SNP rs17577 también ha sido evaluado en otras poblaciones, de hecho en niños japoneses asmáticos se encontró asociado con riesgo a asma atópica (Nakashima y cols., 2006), dato que concuerda con los resultados del presente estudio, ya que al estratificar por presencia de atopia los valores de p son más significativos comparado con lo que se observo al analizar a la población total de asmáticos (Tabla 9) ($p= 0.0005$ vs $p= 0.0017$, respectivamente).

Éste es un SNP no sinónimo localizado en el exón 12 del gen de *MMP9* que conduce a la sustitución de una arginina (R) por una glutamina (Q) en la posición 668 del dominio hemopexina. Este dominio permite la interacción de la proteína MMP9 con su proteína inhibidora y por lo tanto reguladora de su actividad, TIMP1. La remoción del dominio tipo hemopexina en las colagenasas como MMP9 elimina su capacidad para cortar o procesar colágena de triple hélice, pero mantiene su actividad en sustratos como la gelatina y caseína (Murphy y cols., 1997).

Mediante el análisis *in silico* se puede sugerir que el cambio de un aminoácido cargado positivamente (R) por uno polar sin carga (Q) podría conducir a cambios en la estructura proteica, principalmente la pérdida de enlaces salinos y de algunas

interacciones como puentes de hidrógeno (Tabla 12), por lo tanto podría estar afectándose la unión entre la superficie de contacto cargada positivamente del dominio hemopexina con el carboxilo terminal cargado negativamente de TIMP1 (Gohlke y cols., 1996). Lo anterior podría conducir a que la MMP9 se mantenga constantemente activa y a que haya un aumento en la degradación de tejido de las vías aéreas. Concordante con este hecho, se ha observado una actividad aumentada en fluidos de lavado broncoalveolar de pacientes con asma severa comparada con sujetos no asmáticos (Wu y cols., 2010).

Tomando en cuenta el alto desequilibrio de ligamiento entre estos los SNPs rs2274755 y rs17577 (Fig. 14) con el análisis de uno de ellos se puede deducir el genotipo del otro ("tag SNP). La identificación de tag SNPs resulta de importancia ya que permite reducir costos en los análisis de genotipificación y de esta manera se pueden optimizar recursos en posteriores estudios de asociación en nuestra población. Sin embargo también este desequilibrio de ligamiento no permite discriminar cuál de ellos esta jugando un papel relevante en la patogénesis del asma, por lo que es necesario la realización del análisis funcional para demostrar de qué manera estos contribuyen a la enfermedad.

Por otro parte, en las poblaciones Europea, China y Japonesa (HapMap-CEU, HapMap-CHB y HapMap JPT, respectivamente) se ha reportado un alto LD entre los rs2274755 y rs17577 con el SNP rs3918241 (no incluido en nuestro estudio) localizado en la región promotora del gen MMP9, exactamente en una secuencia de unión del factor de transcripción GATA (GTAAAGGAAGT/ATAATTATCTC) (Pinto y cols., 2010).

Existen evidencias de que el alelo menor del SNP rs17577 correlaciona con niveles elevados de la proteína MMP9 (Wu y cols., 2010), por lo que no podemos descartar que nuestros hallazgos puedan deberse a que en nuestra población estos tres SNPs también se encuentren en alto LD y que el rs3918241 sea el que esté jugando un papel predominante en la patogénesis del asma.

El análisis de haplotipos reveló que el haplotipo conformado por los tres alelos de riesgo de los SNPs rs3918249, rs2274755 y rs17576, la interacción entre estos alelos confiere 2 veces riesgo a padecer asma. Tal parece que este efecto podría estar dado por el SNP que se encontró asociado (rs2274755), ya que el OR que este confiere de manera individual no aumenta cuando se encuentra formando el haplotipo (OR 2.17 vs 2.14, respectivamente).

La mayoría de los estudios de SNPs carecen de información sobre los mecanismos mediante los cuales actúan, por lo que la elucidación de las consecuencias funcionales de estos polimorfismos es esencial para confirmar los resultados de asociación y para entender como los SNPs se combinan para influenciar la susceptibilidad a padecer enfermedades. En este contexto, existe un estudio sobre el rs1042713 en el cual se encontraron diferencias significativas en la respuesta a albuterol (β 2-agonista empleado en el tratamiento de broncoespasmo) dependiendo del genotipo del individuo (Litonjua y cols., 2010). Estudios como éste es un claro ejemplo de cómo el análisis de estos polimorfismos podría ser llevado a la práctica clínica y mejorar los tratamientos para los pacientes asmáticos.

Eventualmente estos resultados podrían ser aprovechados para mejorar estrategias preventivas e incursionar en el desarrollo de herramientas de diagnóstico

y terapias farmacogenéticas.

Como lo demuestran los resultados de asociación del presente trabajo, los SNPs rs3918249, rs2274755 y rs17577 del gen *MMP9* podrían estar participando en la regulación de la expresión de la proteína ó modificando su actividad. Se requieren de otras estrategias que permitan la funcionalidad de las variaciones asociadas a asma para dilucidar la manera en que contribuyen en la fisiopatología de la enfermedad.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Los SNPs rs41427445 y rs3918245 que son informativos para otras poblaciones no lo son para la población mexicana, lo que confirma la heterogeneidad genética de las poblaciones.
- ❖ Los rs2274755 y rs17577 son Tag SNPs, lo cual permitirá reducir costos en el análisis de estos polimorfismos para nuestra población.
- ❖ Los rs3918242, rs3918245, rs41427445, rs17576, rs2250889 y rs9509 del gen *MMP9* no están asociados a la susceptibilidad a padecer asma en la población infantil mexicana, existen diferencias genéticas importantes entre nuestra muestra analizada otras poblaciones con respecto a las frecuencias alélicas así como en su asociación con asma.
- ❖ Los SNP rs3918249, rs2274755 y rs17576 confieren 2 veces de riesgo a padecer asma en forma de haplotipo, la asociación que se observa parece ser dependiente del rs2274755 y fue el único que de manera individual se encontró asociado.
- ❖ Los SNPs rs2274755 y rs17577 se asocian a asma en la población pediátrica mexicana analizada, mostrando similitud en la distribución de los alelos con poblaciones distintas de la nuestra.

- ❖ El análisis *in silico* sugiere que el SNP rs2274755 podría afectar el sitio donador de splicing 5' entre el exón 4 y el exón 5 del gen *MMP9*, éste es un hallazgo nuevo con el que contribuye este trabajo.
- ❖ De acuerdo a la evaluación *in silico*, el SNP rs17577 ocasiona cambios en la estructura proteica de MMP9.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allemandou F, Nussberger J, Brunner HR, *et al.* Rapid Site-Directed Mutagenesis Using Two-PCR-Generated ADN Fragments Reproducing the Plasmid Template. J Biomed Biotechnol 2003; 3: 202–207.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 28:12–24.

Bianchi BR, Bordignon PP, Lang RDD, *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J Exp Med 1998;187:129–134.

Broide DH, ChB MB. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 560–572.

Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, *et al.* Immunopathogenesis of bronchial asthma. Arch Immunol Ther Exp 2009; 57: 331–344.

Calikoğlu M, Unlü A, Tamer L, *et al.* MMP-9 and TIMP-1 levels in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Tuberk Toraks 2006; 54:114-21.

Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K *et al.* Matrix Metalloproteinase-9 Deficiency Impairs Cellular Infiltration and Bronchial Hyperresponsiveness during Allergen-Induced Airway Inflammation. Am J Pathol 2002; 161:491–498.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. National Health Interview Survey, 2008.

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. National Vital Statistics Reports. Deaths: Final Data for 2006. 2009; 57:14.

Chen G, Khalil N, TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir Res* 2006; 7:253-260.

Chen Q, Jin Y, Fang X. Genomic variations within matrix metalloproteinase-9 and severe sepsis. *Critical Care* 2009;13:354-359.

Cho JY, Miller M, McElwain K *et al.* Remodeling associated expression of matrix metalloproteinase 9 but not tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in airway epithelium: modulation by immunostimulatory ADN. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 618–25.

Cong Y, Guo X, Liu X, *et al.* Association of the single nucleotide polymorphisms in the extracellular matrix metalloproteinase-9 gene PACG in southern China. *Mol Vis* 2009; 15: 1412–1417.

Cotignola J, Reva B, Mitra N, *et al.* Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Med Gen* 2007, 8;10:2350-8.

Cundall M, Sun Y, Miranda C, *et al.* Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:1064-71.

De Oliveira AP, Domingos HV, Cavriani G, *et al.* Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293:1120-8.

Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, *et al.* Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:257–263.

Díaz Vázquez CA. Diagnóstico del asma bronquial. Programa de formación en asma infantil. 2000; Capítulo 3: 6-10.

Fan YC. Clinical types of childhood asthma and nonatopic asthma. *World J Pediatr* 2006; 2:253-261.

Favoretto Galante PA, Sakabe NJ, Kirschbaum-slager N, *et al.* Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. *RNA* 2004 10: 757-765.

Gagliardo CG, Bonsignore SA, Bonsignore GBJ, *et al.* Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:85–93.

Gallardo Martínez G, Arias Cruz A, González Díaz SN, *et al.* Costos derivados de la atención médica del asma en un grupo de niños del Noreste de México. *Rev Alergia Mex* 2007; 54:82-85.

Ganter K, Deichmann KA, Heinzmann A. Association study of polymorphisms within matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma. *Int J Immunogenet* 2005; 32:233-6.

GINA, Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2009. www.ginasthma.org.

Gohlke U, Gomis-Ruth FX, Crabbe T, *et al.* The C-terminal (haemopexinlike) domain structure of human gelatinaseA (MMP2): structural implications for its function. *FEBSLett* 1996; 378:126-30.

Goldsmith AM, Bentley JK, Zhou L, *et al.* Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:247–254.

Greenlee KJ, Corry DB, Engler DA, *et al.* Proteomic identification of *in vivo* substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 2006; 177:7312-21.

Gu L, Zhu YJ, Yang X, *et al.* Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacol* 2007; 28:382–391.

Haggerty CL, Ness RB, Kelsey S, *et al.* The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90:284-91.

Haselkorn T, Lee JH, Mink DR, *et al.* Racial Disparities in Asthma-Related Health Outcomes in Severe or Difficult-to-Treat Asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101:256-63.

Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, *et al.* Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by Direct Application of PCR-RFLP on Dried Blood without ADN Extraction. *Analytical Sciences* 2010; 26:503.

Himes BE, Lasky-Su J, Wu AC, *et al.* Asthma-susceptibility variants identified using probands in case-control and family-based analyses. *BMC Med Genet* 2010 ;11 - 122.

Hirschfeld M, Hausen AZ, Bettendorf H, *et al.* Alternative Splicing of Cyr61 Is Regulated by Hypoxia and Significantly Changed in Breast Cancer. *Cancer Res* 2009; 69:2082-2090.

Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:872-97.

Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 2006;26:780-93.

Huerta Hernández RE, Ortega Martell JA, Durán C, *et al.* Activación de linfocitos T en niños con asma. *Alergia Asma Inmunol Ped* 2007; 16: 9-14.

Hunninghake GM, Weiss ST, Celedón JC. Asthma in Hispanics. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 143–163.

Hunninghake GM, Soto Quirós ME, Avila L, *et al.* TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* 2010;65:1566-75.

Jeon YH, Yang HJ, Pyun BY. Lung function in Korean adolescent girls: in association with obesity and the menstrual cycle. *J Korean Med Sci* 2009; 24:20-5.

Jiménez Morales S, Velázquez Cruz R, Ramírez Bello J, *et al.* Tumor necrosis factor- α is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Imm* 2009;70:251-256.

Jiménez-Morales S. Identificación de SNPs en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria asociados a asma infantil. Universidad Autónoma Metropolitana, Méx., D.F., 2009.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway following allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1157–1161.

Kraneveld AD, Hanneke P. M. Kleij V, *et al.* Key Role for Mast Cells in Nonatopic Asthma *J Immunol* 2002;169;2044-2053.

Ko FW, Diba C, Roth M, *et al.* A comparison of airway and serum matrix metalloproteinase-9 activity among normal subjects, asthmatic patients, and patients with asthmatic mucus hypersecretion. *Chest*. 2005; 127:1919-27.

Lacovos PM, Kurlender L, Memari N, *et al.* Intron Retention: A Common Splicing Event within the Human Kallikrein Gene Family. *Clinical Chem* 2005; 51:506–515.

Lanzavecchia SF. Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568–574.

Lara Pérez EA. Prevalencia del asma infantil al nivel del mar. *Alerg Asma Inmunol Pediatr* 2001; 10:88-92.

Lee Chung H. Asthma in childhood: a complex, heterogeneous disease. *Korean J Pediatr* 2011; 54:1-5.

Lee YC, Lee HB, Rhee YK, *et al.* The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1623-30.

Li W, Li H, Bocking AD, *et al.* Tumor Necrosis Factor Stimulates Matrix Metalloproteinase 9 Secretion from Cultured Human Chorionic Trophoblast Cells Through TNF Receptor 1 Signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 Pathway. *Biol Reprod* 2010 Sep; 83:481-487.

Lim DH, Cho JY, Miller M, *et al.* Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L265-71.

Litonjua AA, Gong L, Duan QL, *et al.* Very important pharmacogene summary ADRB2. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Jan;20(1):64-9.

Liu CT, Wang G, Luo FM, *et al.* Imbalanced T cell-specific transcription factors T-bet and GATA-3 contributes to type 2 T helper cell polarization in asthmatic patients. *CJTRD* 2004; 27:398-402.

Lloyd CM, Robinson DS. Allergen-induced airway remodelling. *Eur Respir J* 2007; 29: 1020–1032.

Lose F, Thompson PJ, Duffy D, *et al.* A novel tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphism associated with asthma in Australian women. *Thorax* 2005; 60:623-628.

Makino S, Sagara H. Evolution of Asthma Concept and Effect of Current Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010; 2:172-176.

March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov Med* 2011; 11: 35-45.

Martínez Aguilar NE. Etiopatogenia, factores de riesgo y desencadenantes de asma. *Neumol Cir Tórax* 2009; 68:S98-S110.

Mathur SK. Allergy and Asthma in the Elderly. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010; 3: 587–595.

McMillan SJ, Kearley J, Campbell JD, *et al.* Matrix Metalloproteinase-9 Deficiency Results in Enhanced Allergen-Induced Airway Inflammation. *J Immunol* 2004; 172:2586-2594.

McWeeney DO, Galluzzi JR, Ordovas JM. Allelic Discrimination for Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Scavenger Receptor Class B Type 1 Gene Locus Using Fluorescent Probes. *Clinical Chemistr* 2000; 46:118-119.

Melgert BN, Postma DS, Kuipers I, *et al.* Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1496-503.

Melgert BN, Ray A, Hylkema MN, *et al.* Are there reasons why adult asthma is more common in females? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2007; 7: 143-150.

Meng JF, Rosenwasser LJ. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res* 2010; 4: 215-27.

Ming-liang GU, Jing Z. Mapping and localization of susceptible genes in asthma. *Chin Med J* 2011;124:132-143.

Moncayo AL, Vaca M, Oviedo G, *et al.* Risk factors for atopic and non-atopic asthma in a rural area of Ecuador. *Thorax* 2010; 65:409-416.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 558–564.

Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* 2010; 690: 24–39.

Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why thwhy the “hemopexin” domain? *Matrix Biol* 1997; 15:511-8.

Nakashima K, Hirota T, Obara K, *et al.* A functional polymorphism in MMP-9 is associated with childhood atopic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:300-7.

Nan H, Niu T, Hunter DJ, *et al.* Missense Polymorphisms in Matrix Metalloproteinase Genes and Skin Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3551-3557.

Ortega Martell JA, Fernández Vega M. Diagnóstico de asma. *Neumol Cir Tórax* 2009; 68:S116-S122.

Oshita Y, Koga, Kamimura T, *et al.* Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activities in exacerbations of asthma. *Thorax* 2003; 58:757–760.

Oyarzún M. Factores ambientales relacionados con la gravedad del asma. *Rev Chil Enf Respir* 2004; 20: 25-29.

Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy, *Thorax* 1999; 54:268-72.

Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr* 2008; 84:S68-75.

Pinto LA, Depner M, Klopp, *et al.* MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. *Respir Res* 2010;11:23.

Prado F, Brockmann P. El buen control del asma: ¿Previene la remodelación? Departamento de Pediatría Pontificia Universidad Católica de Chile 2004; ISSN 0718-3321.

Sadeghi M, Motovali-bashi M, Hojati Z. MMP-9 promoter polymorphism associated with tumor progression of breast cancer in Iranian population. *Int J Integ Biol* 2009; 6: 33-37.

Schwartz DA. Gene-environment interactions and airway disease in children. *Pediatrics* 2009; 23:S151-9.

Shalowitz MU, Sadowski LM, Kumar R, *et al.* Asthma Burden in a Citywide, Diverse Sample of Elementary Schoolchildren in Chicago. *Ambulatory Pediatrics* 2007; 7:271-7.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463–516.

Stone Aguilar H, García Caballero R, López González AL, *et al.* Asma infantil. Guías para su Diagnóstico y Tratamiento. *Alerg Asma e Inmunol Pediatr* 2005;14;1.

Subrahmanyam RM, Srikantaiah C, Krishna P, *et al.* Can bronchial asthma be classified based on the immunological status? *Lung India* 2011; 28: 110–113.

Tam A, Morrish D, Wadsworth S, *et al.* The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Women's Health* 2011;11:24-32.

Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1375–1381.

Vargas Becerra MH. Epidemiología del asma. *Neumol y Cir Torax* 2009; 68:S91-S97.

Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169-182.

Vrieze A, Postma DS, Kerstjens HA. Perimenstrual asthma: a síndrome without known cause or cure. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:271-282.

Wallon UM, Overall CM. The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca^{2+} for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement membrane components. *J Biol Chem* 1997; 272: 7473–7481.

Weil D, Brosset S, Dautry F. RNA processing is a limiting step for murine tumor necrosis factor expression in response to interleukin-2. *Mol Cell Biol* 1990; 10:5865–75.

Weinmayr G, Weiland SK, Brunekreef B, *et al.* Atopic Sensitization and the International Variation of Asthma Symptom Prevalence in Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:565–574.

Wolf M, Albrecht S, Märki C. Proteolytic processing of chemokines: Implications in physiological and pathological conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1185-1198.

Wu H, Romieu I, Shi M, *et al.* Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 321-327.

Wu S, Hsu LA, Teng MS, *et al.* Association of matrix metalloproteinase 9 genotypes and cardiovascular disease risk factors with serum matrix metalloproteinase 9 concentrations in Taiwanese individuals. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48:543-9.

Xin XF, Zhao M, Li ZL, *et al.* Metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in induced sputum in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease and their relationship to airway inflammation and airflow limitation. *CJTRD* 2007; 30: 192-6.

Xu Q, Walker D, Bernardo A, *et al.* Intron-3 Retention/Splicing Controls Neuronal Expression of Apolipoprotein E in the CNS. *J Neurosci* 2008; 28:1452–1459.

Yawna BP. Factors accounting for asthma variability: achieving optimal symptom control for individual patients. *Prim Care Respir J* 2008; 17: 138-147.

Zhang JY, Wenzel SE. Tissue and BAL based biomarkers in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007; 27:623-32.

Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587–596.

Zhibin Hu, Xiang Huo, Daru Lu, *et al.* Functional Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase-9 Are Cancer Associated with Risk of Occurrence and Metastasis of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5433-5439.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 13 de diciembre del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al QFB. Roberto Gamboa Becerra.

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Dr. Elisa Irene Azuara Liceaga

M. en C. Yolanda Saldaña Álvarez

Dr. Luis del Pozo Yauner
