

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS CON RIESGO DE TENER ASMA EN LA INFANCIA EN UNA PROVINCIA DE ARGENTINA

Genetic polymorphisms associated with childhood asthma risk in a province of Argentina

Julio César Orellana, María Inés Pereira, Marcela Rodríguez, María José Lauría, R.E. Pogonza, María Ofelia Miño, María Estela Pautasso, Ana Romero Boni, Telma Varela

RESUMEN

Introducción. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas inferiores, genéticamente heterogénea, asociada a una obstrucción variable del flujo de aire, con un claro componente hereditario y es el resultado de la interacción de múltiples regiones genéticas entre sí y con factores ambientales, aunque poco se conoce acerca de sus causas. El asma afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo, es la enfermedad no transmisible más frecuente en los niños donde la mayoría de las exacerbaciones obedecen a un desencadenante externo. Los polimorfismos pueden ser responsables de cambios en la expresión de los genes (aumento, disminución o ningún efecto). Ciertas variaciones genéticas en la expresión de algunos genes podrían tener un efecto sobre el asma y explicar, en parte, algunas características específicas y la predisposición individual a desarrollar esta enfermedad. En un amplio estudio del genoma, mediante el análisis de múltiples marcadores de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) en poblaciones europeas se detectaron SNP en el cromosoma 17q21 fuertemente asociados con asma en la infancia, entre ellos el rs7216389. En otro estudio de niños norteamericanos con asma, analizaron SNP del cromosoma 1q31, entre ellos el rs2786098 más fuertemente asociado con asma. Sin embargo, los factores de riesgo genético para asma han demostrado variar dentro y entre poblaciones.

Objetivo. Analizar en niños asmáticos de Argentina y en un grupo control la frecuencia genotípica de dos SNP (rs7216389 y rs2786098) descriptos en dos cromosomas diferentes (17q21 y 1q31, respectivamente) y su asociación como marcadores de susceptibilidad de padecer asma.

Materiales y métodos. Se estudiaron niños de ambos sexos, menores de 18 años, que concuerdan a la consulta por afecciones respiratorias compatibles con asma a un Servicio de Alergia de un Hospital de Niños de Córdoba. Según la información obtenida en la anamnesis, examen físico y prick tests fueron incluidos en el trabajo como grupo problema. El grupo control fueron niños menores de 18 años. Luego de que sus padres firmaron el consentimiento informado y los niños mayores a 7 años dieron su asentimiento para participar del trabajo de investigación, se tomaron muestras de sangre para la extracción de ADN, realización de PCR y la determinación de los SNP rs7216389 y rs2786098 a través de la digestión con enzimas de restricción NsiI y HhaI respectivamente. Del análisis de restricción para esas enzimas se obtuvieron las frecuencias de los diferentes genotipos en los grupos estudiados. Los alelos que presentaron sitio de corte se designaron n y h para NsiI y HhaI y los que no presentaron sitio de corte N y H para NsiI y HhaI respectivamente.

Resultados. En el sitio polimórfico HhaI, los grupos mostraron una distribución genotípica diferente: los genotipos HH y Hh fueron más abundantes en el grupo control respecto a pacientes con asma (71,43 vs. 21,87%). Por el contrario, el genotipo hh fue más abundante en el grupo de pacientes con asma respecto al grupo control (78,12 vs. 28,57% respectivamente). En relación al genotipo hh, se observó mayor frecuencia entre pacientes con asma con respecto al genotipo HH o Hh (odds ratio [OR]=8,93; intervalo de confianza del 95% [IC95%: 2,76-28,84]) de manera significativa ($p < 1e-4$). Por otro lado, en el sitio polimórfico NsiI los grupos mostraron una distribución genotípica semejante, es decir que no hubo asociación significativa de este SNP en los grupos estudiados.

Conclusión. Se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas para los dos SNP rs7216389 y rs2786098 en las dos poblaciones de estudio casos-contrroles provenientes de una muestra de la ciudad de Córdoba, Argentina. Se evidenció la asociación de estos polimorfismos con el riesgo de padecer asma en la infancia. Se encontró relación estadísticamente significativa entre el genotipo hh y asma. Este hallazgo permitiría proponer este polimorfismo como un indicador de riesgo de padecer asma en la infancia. El análisis de variantes genéticas como factores de riesgo de padecer asma pueden ser útiles en la identificación del subtipo de asma y en la determinación de fenotipos intermedios y son de suma importancia para el futuro desarrollo de estrategias preventivas primarias para la enfermedad.

Palabras claves: asma, Pediatría, polimorfismos.

ABSTRACT

Introduction. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways genetically heterogeneous associated with a variable obstruction of air flow, with a clear hereditary component, it is the result of the interactions of multiple genetic regions between themselves and with environmental factors. However little is known about its causes. Asthma affects more than 3 hundred million people through the world. It is the most frequent non-transmissible disease in children where most of the exacerbations obey to an external trigger. Polymorphisms can be responsible for changes in the genetic expression (increase, decrease, or no effect). Certain genetic variations in the expression of some genes could have an effect on asthma and explain partly some specific characteristics and the individual predisposition to develop this disease. In abroad genome study by the analysis of multiple markers of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in European populations, SNP were detected in 17q21 chromosome strongly associated with childhood asthma, among them rs7216389. In another study of north-american kids with asthma, SNP was analyzed in the chromosome 1q31, among them rs2786098 was more strongly associated with asthma. However, the genetic risk factors for asthma have been proven to vary within and among populations.

Purpose. To analyze in asthmatic children of Argentina and in a control group, the genotypic frequency of two SNPs (rs7216389 and rs2786098) described in two different chromosomes (17q21 and 1q31 respectively) and their association as markers of asthma susceptibility in children.

Materials and methods. Kids were studied of both sexes under 18 years old, that attended consult for breathing problems compatible with asthma to the division of allergy at a pediatric Hospital in Cordoba. According to the information obtained in the anamnesis, physical examination and PRICK tests were included in the study as a problem group. The control group were children under 18 years old. According to the information obtained in the anamnesis, physical examination and PRICK tests were included in the study as a problem group. The control group were children under 18 years old. After the parents signed informed consent and children over 7 years of age gave their agreement to be part of the research study. Blood samples were taken for DNA extraction, PCR and determination of SNPs 7216389 and 2786098 through digestion with NsiI and HhaI restriction enzymes respectively. From the restriction analysis for these enzymes, the frequencies of both genotypes in the groups studied were obtained. The alleles that presented cutting site were assigned n and h for NsiI and HhaI and those that did not present cutting site N and H for NsiI and HhaI respectively.

Results. At the HhaI polymorphic site, the groups showed a different genotypic distribution: the HH and Hh genotypes were more abundant in control compared to patients with asthma (71,43% vs 21,87%). On the other hand, the hh genotype was more abundant in the group of patients with asthma than in the control group (78,12% vs 28,57% respectively). In relation to the hh genotype, a higher frequency was observed among patients with asthma with respect to the genotype HH or Hh OR = 8.93 (95% CI: 2.76-28.84) significantly ($P < 1e-4$). Respect to the NsiI polymorphic site the groups showed a similar genotypic distribution, meaning that there was no significant association of this SNP in the groups studied.

Conclusion. The allelic and genotypic frequencies for the two SNP rs7216389 and 2786098 were established in the two case-control study populations from a sample from a province of Argentina. The association of these polymorphisms with the risk of suffering asthma in childhood was evidenced. A statistically significant relationship was found between the hh genotype and asthma. This finding would allow us to propose this polymorphism as an indicator of the risk of developing asthma in childhood. The analysis of genetic variants as risk factors for asthma may be useful in the identification of the asthma subtype and in the determination of intermediate phenotypes and are of great importance for the future development of primary preventive strategies

Key words: asthma, Pediatrics, polymorphisms.

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2019;50(1):16-27

Servicio de Alergia, Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba. Rep. Argentina

Correspondencia: secretaria@aaaic.org.ar

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas inferiores caracterizada por una obstrucción variable del flujo de aire, con síntomas que incluyen episodios recurrentes de obstrucción bronquial que revierten espontáneamente o por acción de la medicación¹. Estudios genéticos relacionados con el asma revelan que se trata de una enfermedad compleja y heterogénea con un claro componente hereditario, aunque no se adapta a un patrón clásico de herencia mendeliana, sino que es el resultado de la interacción de múltiples regiones genéticas entre sí y con factores ambientales².

Los polimorfismos pueden ser responsables de cambios en la expresión de los genes (aumento, disminución o ningún efecto). Ciertas variaciones genéticas en la expresión de algunos genes podrían tener un efecto sobre el asma y explicar, en parte, algunas características específicas y la predisposición individual a desarrollar esta enfermedad³. Recientemente se ha realizado un amplio estudio del genoma, mediante el análisis de múltiples marcadores de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) en poblaciones europeas⁴, detectándose SNP en el cromosoma 17q21 fuertemente asociados con asma en la infancia y además fuertemente asociados con los niveles de transcritos del gen *ORMDL3*⁵. Entre esos polimorfismos se destaca por su alto grado de asociación con la enfermedad el SNP rs7216389 detectado en el gen *GSDML* y que es adyacente a *ORMDL3*. Posteriormente otros autores intentaron confirmar estas asociaciones entre las variantes genéticas y asma y apoyaron la relación entre el marcador rs7216389 y asma en la infancia, en muestras poblacionales de Japón, Escocia, China y México⁶⁻¹⁰.

Por otra parte, se realizó un estudio en dos grupos de niños norteamericanos con asma, uno con ancestros de origen europeo y otro africano, en el que analizaron por primera vez polimorfismos correspondientes al cromosoma 1q31¹¹. De estos polimorfismos, el SNP rs2786098 detectado en el gen *CRBI* fue el más fuertemente asociado con asma en los individuos con ancestros europeos y también significativamente asociado con asma en los niños con ancestros de origen africano.

En contraste con los estudios genéticos llevados a cabo en relación al asma, las investigaciones sobre sus causas ambientales son mucho más escasas. La influencia del medioambiente en el desarrollo de asma debe ser tenida en cuenta, considerando el rápido incremento de la prevalencia de esta enfermedad y otros desórdenes respiratorios en niños durante las últimas décadas¹². Al respecto, estudios epidemiológicos sugieren que la exposición crónica a contaminantes relacionados con el tráfico automotor, plantas petroquímicas, partículas procedentes de la in-

dustria, etc., tienen efectos adversos sobre el desarrollo y función pulmonar e incrementan la mortalidad y/o morbilidad respiratoria en niños¹³⁻¹⁸, especialmente en ciudades altamente contaminadas de países en desarrollo¹⁹. Además, el estudio de poblaciones del mismo origen étnico pero que divergen en la exposición a ciertos medioambientes, como por ejemplo entre poblaciones rurales y urbanas son argumentos convincentes²⁰ y han generado un marcado interés por establecer la influencia que tendría la exposición a contaminantes del aire. Determinados factores medioambientales juegan un rol considerable. Entre estos factores ambientales se ha identificado por ejemplo que la exposición al humo del tabaco a una edad temprana constituye un riesgo de desarrollar asma e interactúa con la susceptibilidad genética de desarrollar la enfermedad^{21,22}. Particularmente, Bouzigon et al.²³ concluyeron que el incremento en el riesgo de padecer asma conferido por variantes genéticas del cromosoma 17q21 parece estar restringido a un comienzo de la enfermedad en una edad temprana (cuatro años o menos) y que el riesgo es aún más incrementado por la exposición a humo de tabaco del medioambiente a una edad temprana. En este sentido, se ha sugerido que este hallazgo que relaciona la edad y el rol de la exposición temprana al humo de tabaco requiere confirmación por nuevos estudios²⁴.

En base a los antecedentes expuestos se pretende analizar la contribución al riesgo de padecer asma, en niños de una provincia argentina, a los polimorfismos en los cromosomas 17q21 (SNP rs7216389) y 1q31 (SNP rs2786098) y su asociación a la susceptibilidad genética en el desarrollo del asma.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Investigación de tipo observacional – transversal de casos y controles sobre parámetros genéticos en un grupo de niños con asma y un grupo control.

COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este estudio de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Polo Sanitario del Niño y del Adulto (CIEIS) y registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePIS) con el N° 012. El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. A todos los pacientes se les informó en qué consiste el trabajo de investigación y se les solicitó la firma del consentimiento informado a los padres y de asentimiento a los niños mayores de 7 años para participar en el estudio.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Niños de ambos sexos, menores de 18 años que concu-

TABLA 1. Características de los SNP estudiados.

SNP	rs	Cambio denucleótido	Primers	Longitud de los fragmentos amplificados
17q21	7216389	C/T	F 5' CCAGCCAATTGGGAAATAAA 3' R 5' TGCCTCCAAAACCTAGCAGT 3'	574 pb
1q31	2786098	A/C	F 5' TCATATCCCATCTCCTTGGC 3' R 5' TCAGGTAAATCCAGGTTATCC 3'	491 pb

pb: pares de bases.

rrieron al Servicio de Alergia de un Hospital de niños de Córdoba y con diagnóstico clínico de asma según lo establecido por GINA, *The Global Initiative for Asthma*^{25,26}. Todos fueron evaluados clínicamente (examen físico y anamnesis) para descartar otras patologías, se les realizó tests cutáneos mediante la técnica de *prick* test y espirometría en aquellos pacientes que pudieron colaborar con la técnica. Este grupo de pacientes con asma fue considerado la población problema. El grupo de niños menores de 18 años que requerían estudios prequirúrgicos de rutina por cirugías menores no urgentes, previamente sanos y con examen físico normal al momento del estudio fue considerado como la población control.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se tomaron muestras de sangre por punción venosa y con anticoagulante a todos los pacientes de la población problema y la población control. Todos los niños de la población problema fueron evaluados confeccionando una Historia Clínica diseñada para tal fin para descartar otras patologías.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de núcleos celulares de los glóbulos blancos de sangre periférica anticoagulada mediante el procedimiento CTAB modificado²⁷. En este procedimiento la sangre total se homogeniza con Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 10 mM pH 8 y se centrifuga descartando el sobrenadante y recuperando el *pellet*, resuspendiéndolo en solución CTAB 2%. El *pellet* resuspendido se incubó 1 hora a 60°C. Al cabo de dicho tiempo se agrega cloroformo-alcohol isoamílico 24/1 v/v y se centrifuga a máxima velocidad recuperando la fase superior para precipitar el ADN extraído con isopropanol y posteriormente lavarlo con etanol 70%. Con el propósito de constatar la extracción de ADN, los extractos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el gel se sembró 10 µL del ADN genómico extraído para cada muestra con 1,5 µL de *buffer* de corrida.

DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP)

Para detectar ambos SNP se realizaron las siguientes técnicas de biología molecular:

A. Diseño de *primers* específicos: se diseñaron oligonucleótidos complementarios con cada una de las hebras

de ADN en los extremos del segmento de interés (*primers*), para la amplificación de cada región de ADN donde se encontrarían los polimorfismos, a partir de secuencias de esas regiones en humanos existentes en el Banco de Genes. A través de la página web www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer, se verificó que los *primers* diseñados no formarían dímeros ni horquillas y se determinó la temperatura de *melting* óptima para cada uno de ellos (Tabla 1).

B. Amplificación de ADN: los fragmentos de ADN se amplificaron mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante un Ciclador Térmico Professional Basic (Biometra). Las amplificaciones para la detección del rs7216389 fueron en 25 µl de una solución que contenía: Tris-HCl (10 mM, pH=8,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), los cebadores de cada reacción (10 µM), dNTPs (200 µM de cada uno), ADN extraído y 1 U de ADN polimerasa Go. Las condiciones de ciclado fueron una primera etapa a 94°C durante 5 min de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 35 s a 94°C, 60 s a 60,6°C y 60 s a 72°C, con un etapa de extensión final a 72°C por 5 min. Las amplificaciones para la detección del rs 2786098 fueron en 25 µl de una solución que contenía: Tris-HCl (10 mM, pH=8,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (3 mM), los cebadores de cada reacción (10 µM), dNTPs (200 µM de cada uno), ADN extraído y 1 U de ADN polimerasa Go. Las condiciones de ciclado fueron una primera etapa a 94°C durante 5 min de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 35 s a 94°C, 60 s a 61,8°C y 60 s a 72°C, con un etapa de extensión final a 72°C por 5 min. Con el propósito de constatar la correcta amplificación de los segmentos de ADN, los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el gel se sembró 10 µl del ADN genómico extraído para cada muestra con 1,5 µl de *buffer* de corrida. También se sembró el marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen lifetechnologies) a fin de estimar la concentración de ADN genómico total obtenido en la extracción. Todas las extracciones se conservaron en *buffer* TE a -20°C. Los productos de PCR se purificaron mediante un *kit* de purificación de PCR (QIAquick, QIAGEN) para verificar la amplificación de la región correcta y confirmar la presencia de los po-

TABLA 2. Secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción NsiI, HhaI y longitud de los fragmentos obtenidos tras la digestión enzimática.

SNP	Enzima de restricción	Sitio de restricción	Longitud de los fragmentos detectados
17q21	NsiI	5' ATGCA [↓] T 3' 3' T [↑] ACGTA 5'	Alelo N: 574 pb Alelo n: 394 pb + 180 pb
1q31	HhaI	5' GCG [↓] C 3' 3' C [↑] GCG 5'	Alelo H: 491 pb Alelo h: 261 pb + 230 pb

pb: pares de bases.

TABLA 3. Frecuencia de los diferentes genotipos correspondientes a los sitios polimórficos HhaI y NsiI en grupo control y en grupo pacientes con asma.

Genotipos	Grupo control		Pacientes con asma		
	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	
	n	%	n	%	
<i>HhaI</i>					
HH o Hh	20	71,43	7	21,87	28,65
hh	8	28,57	25	78,12	71,35
<i>NsiI</i>					
NN	5	19,23	2	8,69	9,26
Nn	13	50,00	10	43,48	42,38
nn	8	30,77	11	47,8	48,36

limorfismos descritos en humanos mediante secuenciación directa.

C. Secuenciamiento de ADN: las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante el método de terminación de síntesis de cadena con didesoxinucleótidos (Sanger et al., 1977), utilizando un secuenciador automático (ABI Prism 377, Applied Biosystems). Los primers utilizados para las reacciones de PCR fueron también empleados para el secuenciamiento de sus productos. Se determinaron las secuencias en ambas hebras de los fragmentos de ADN a analizar.

D. Detección de los SNP: para detectar los SNP propuestos en un gran número de muestras, se utilizó el análisis de restricción para la digestión de los fragmentos de ADN amplificados por PCR. Las enzimas de restricción se analizaron mediante el programa NEB Cutter 2.0. A partir de los patrones electroforéticos obtenidos se determinaron los distintos genotipos. Por convención se designaron con minúscula aquellos alelos que presentaron sitio de corte para la enzima correspondiente (n y h para NsiI y HhaI, respectivamente) y con mayúscula aquellos alelos que no presentaron sitio de corte (N y H para NsiI y HhaI respectivamente). En la **Tabla 2** se detallan los sitios de reconocimiento de cada enzima y las longitudes de los fragmentos correspondientes a los distintos alelos, tras la digestión con las enzimas de restricción.

La digestión para el SNP 17q21 fue realizada con 10 U/ml de la enzima NsiI y para el SNP 7q31 fue realizada con 10 U/ml de la enzima HhaI (Thermoscientific, Promega) resuspendidas en *buffer* constituido por tris-acetato 33 mM pH=7,9, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM y 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino, a 37°C durante 12 horas.

La determinación de los polimorfismos se realizó luego de la digestión de los productos de PCR mediante su separación en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (RFLP-PCR). En el gel se sembró 10 µl del producto de digestión de cada muestra con 1,5 µl de *buffer* de corrida. También se sembró el marcador de tamaño molecular 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen life technologies).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se analizarán por medio de un software SPSS para Windows XP versión 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Se utilizó el test de Chi cuadrado para comparar las frecuencias genotípicas observadas con aquellas esperadas en caso de cumplirse el equilibrio de Hardy Weinberg. La asociación de los genotipos correspondientes a los diferentes sitios polimórficos con los factores medioambientales se analizaron mediante el test de ANOVA. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

Se extrajo ADN de 28 muestras pertenecientes a la población control y 23 a la población problema para el SNP 17q21 y de 26 muestras pertenecientes a la población control y 32 a la población problema para el SNP 1q31. Para los SNP estudiados se diseñaron los primers específicos que lograron amplificar un solo fragmento de ADN para cada uno. En la **Figura 1** se puede observar el fragmento amplificado para SNP 17q21 y para el 1q31. Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron y esto permitió confirmar que se trataba de las secuencias deseadas para cada SNP.

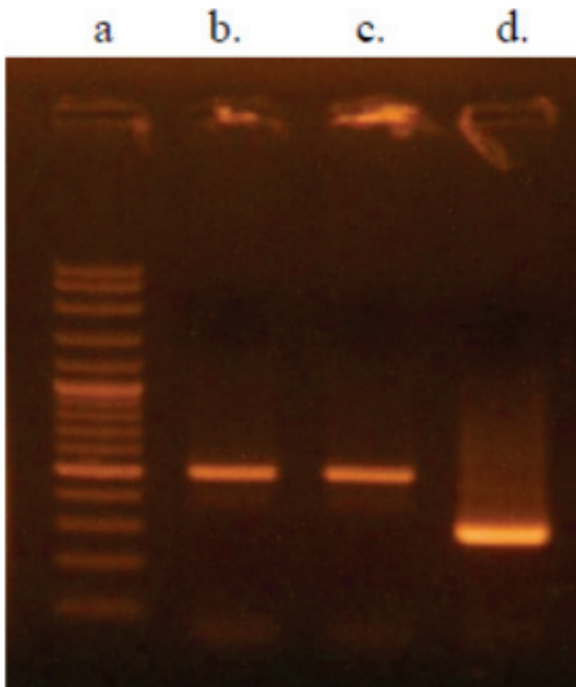


Figura 1. Producto de amplificación de ADN para rs7216389. a. Marcador de PM. b. Amplicon para rs7216389. c. Amplicon de para rs2786098. d. Control positivo de beta actina 200pb.

ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Los fragmentos amplificados para los dos SNP estudiados se sometieron a digestión con sus respectivas enzimas de restricción según **Tabla 2** y se obtuvieron patrones de corte según la presencia de uno y otro alelo en la muestra analizada. En la **Figura 2** se observan como ejemplo, los resultados obtenidos para el análisis de restricción para el SNP 1q31 con la enzima HhaI.

FRECUENCIAS ALÉLICAS EN EL GRUPO CONTROL Y EN LOS PACIENTES CON ASMA:

Los fragmentos amplificados para ambos SNP se sometieron a digestión con las enzimas de restricción según **Tabla 2** y se obtuvieron los fragmentos correspondientes a los alelos H y h o N y n, según la presencia del polimorfismo.

En la **Tabla 3** se muestra la frecuencia de los diferentes genotipos encontrados en pacientes con asma y en grupo control.

Las frecuencias alélicas fueron similares en ambos grupos estudiados (**Tabla 3**). No se encontró diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas. Estos resultados indicarían que las proporciones entre los diferentes genotipos estuvieron de acuerdo con el equilibrio de Hardy Weinberg, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con asma. En la **Tabla 3** se puede observar que en el sitio poli-

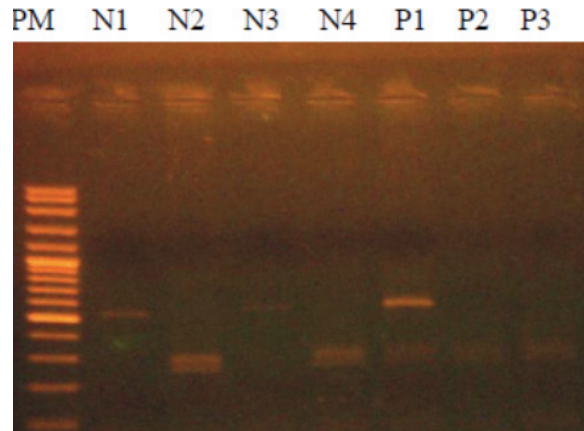


Figura 2. Producto de digestión con HhaI de ADN para rs7216389 para 4 muestras controles (N) y 3 problemas (P). Las muestras N1 y N3 son homocigotas HH en cambio N2, N4, P2 y P3 son homocigotas hh, y P1 es heterocigota Hh.

mórfico HhaI, los grupos mostraron una distribución genotípica diferente: el genotipo HH o Hh fue más abundante en control respecto a pacientes con asma (71,53 *vs.* 21,87%). Por el contrario, el genotipo hh fue más abundante en el grupo de pacientes con asma respecto al grupo control (78,12 *vs.* 28,57%, respectivamente).

En relación al genotipo hh, se observó mayor frecuencia entre pacientes con asma con respecto al genotipo HH o Hh OR=8,93 (IC95%: 2,76-28,84) de manera significativa ($p < 1e-4$). Por otro lado, en el sitio polimórfico NsiI los grupos mostraron una distribución genotípica semejante, es decir que no hubo asociación significativa de este SNP en los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

El asma es una de las enfermedades respiratorias más comunes en niños preescolares, es una causa importante de morbilidad e implica costos elevados para su manejo y tratamiento. Al ser el asma una enfermedad de herencia multifactorial, la identificación de polimorfismos en genes relacionados con el desarrollo de la fisiopatología es muy importante ya que permite identificar a los individuos con genotipos de susceptibilidad, con lo que se logra establecer pronósticos de correlación genotipo-fenotipo y escoger terapéuticas individualizadas que favorezcan a los pacientes^{25,26,29}.

Los resultados de este trabajo muestran que entre las frecuencias alélicas estudiadas no se encontró diferencias entre lo observado y lo esperado, es decir que las proporciones entre los diferentes genotipos estuvieron de acuerdo con el equilibrio de Hardy Weinberg, tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con asma.

El análisis de la distribución de los genotipos en el sitio polimórfico HhaI del SNP rs2786098 muestra mayor prevalencia del genotipo HH o Hh en las pacientes con asma que en el grupo control. La distribución genotípica del sitio polimórfico NsiI es similar entre las pacientes y controles. Esto puede deberse al tamaño muestral, pues en este sitio polimórfico el grupo de pacientes con el genotipo NN era de dos.

Lo más relevante de este estudio es confirmar la asociación del genotipo hh con asma en la población de niños estudiada. Si bien sería necesario un gran número de casos para confirmar esta asociación del SNP rs2786098 en los pacientes con asma, es de destacar que una situación similar se detectó en el trabajo de Sleiman et al.¹¹ en niños con ancestros africanos y

Europeos. Este hallazgo permitiría proponer este polimorfismo como un indicador de riesgo de padecer asma en la infancia.

La posibilidad de predecir oportunamente el riesgo de padecer asma en niños y poder tomar las medidas preventivas y terapéuticas más adecuadas, en base a determinantes genéticos tales como los polimorfismos estudiados, favorecería una práctica médica más individualizada que contribuiría a mejorar la calidad de vida de las pacientes pediátricas con asma.

Estudios de asociación de otros genes candidatos con riesgo de padecer asma en niños con otros parámetros del medioambiente serían de gran importancia, ya que permitirían la identificación de marcadores genéticos de riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Depner M, Fuchs O, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvarinen A, Kaulek V, et al., and the PASTURE Study Group. Clinical and Epidemiologic Phenotypes of Childhood Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014;189(2): 129-38.
2. Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and Molecular Allergy*, 2009; 7(1):7.
3. March ME, Sleiman PMA, Hakonarson H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *International Journal of General Medicine* 2013; 6: 253-65.
4. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. *The New England Journal of Medicine* 2010;363(13):1211-21.
5. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448: 470-3.
6. Hirota T, Harada M., Sakashita M., Doi S., Miyatake A., Fujita K. y col. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 121: 769-770.
7. Tavendale R., Macgregor D. F., Mukhopadhyay S., Palmer C. N. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 121: 860-863.
8. Tulah A., Holloway JW, Sayers I. Defining the contribution of SNPs identified in asthma GWAS to clinical variables in asthmatic children. *BMC Medical Genetics* 2013; 14: 100-110.
9. Leung T. F., Sy H. Y., Ng M. C., Chan I. H., Wong G. W., Tang N. L. y col. Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. *Allergy* 2009; 64: 621-628.
10. Wu H., Romieu I., Sienra-Monge J. J., Li H., del Rio Navarro B. E., London S. J. Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma. *Allergy* 2009; 64: 629-635.
11. Sleiman P. M., Flory J., Imielinski M., Bradfield J. P., Annaiah K., Willis-Owen S. A. y col. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *The New England Journal of Medicine* 2010; 362: 36-44.
12. Eder W., Ege M. G., Mutius E. The asthma epidemic. *The New England Journal of Medicine* 2006; 355: 2226-2235.
13. Shin-Hwa Lee, Jong-Sook Park, Choon-Sik Park. The search for Genetic Variants and Epigenetics related to Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3(4): 236-244.
14. Jedrychowski W, Flack E., Mroz E. The adverse effect of low levels of ambient air pollutants on lung function growth in preadolescent children. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 669-674.
15. Romieu I. Epidemiological studies of health effects arising from motor vehicle air pollution. In: Schwella D., Zali O., editors. *Urban traffic pollution*. Geneva: E & FN Spon; 1999; p. 9-49.
16. Gauderman W. J., Gilliland F, Vora H., Avol E., Stram D., McConnell R. y col. Association between air pollution and lung function growth in southern California children: results from a second cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2002; 166: 76-84.
17. Gauderman W. J., Avol E., Gilliland F, Vora H., Thomas D., Berhane K. y col. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age (published erratum appears in 2005, *The New England Journal of Medicine* 352: 276). *The New England Journal of Medicine* 2004; 351:1057-1067.
18. Wichmann F. A., Müller A., Busi L. E., Cianni N., Massolo L., Schlink U. y col. Increased asthma and respiratory symptoms in children exposed to petrochemical pollution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 123: 632-638.
19. Paramesh H. Epidemiology of asthma in India. *Indian Journal of Pediatrics* 2002; 69: 309-312.
20. Wong G. W., Chow C. M. Childhood asthma epidemiology: insights from comparative studies of rural and urban populations. *Pediatric Pulmonology* 2008; 43: 107-116.
21. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8:169-182.
22. Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009; 123: 3-11.
23. Bouzigon E., Corda E., Aschard H., Dizier M. H., Boland A., Bousquet J. y col. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359: 1985-1994.
24. Holloway J. W., Koppelman G. H. 17q21 Variants and asthma-Questions and answers. *The New England Journal of Medicine* 2008; 359: 2043-2045.

25. GINA, POCKET, GUIDE. Pocket Guide for asthma management and prevention. Medical communications Resources, Inc: 2006; 1-30
26. Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469-478.
27. Stewart C. N., Via L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio-techniques* 1993; 14: 748-750.
28. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1977; 74: 5463-5467.
29. Tulah A., Holloway J.W, Sayers I. Defining the contribution of SNPs identified in asthma GWAS to clinical variables in asthmatic children. *BMC Medical Genetics* 2013; 14: 100-110.