

Genes, medio ambiente y asma

L. García-Marcos

Área de Pediatría. Universidad de Murcia. Unidad de Investigación. Dirección de Salud Área II. Cartagena. Murcia. España.

La influencia familiar en el asma está documentada desde hace 100 años. Sin embargo, la exacta naturaleza de su herencia es sujeto de intensa investigación en nuestros días. La genética del asma y el estudio de los individuos susceptibles podrán arrojar nueva luz sobre la influencia del medio ambiente en esta enfermedad. Hay dos enfoques generales para el estudio de la genética del asma: los genes candidatos y la búsqueda amplia del genoma. Ambos enfoques pueden ser complementarios. El análisis de ligamiento, con distintas variables, es la técnica fundamental para el estudio de la genética del asma, aunque sólo puede identificar zonas amplias y no genes concretos. La clonación posicional puede llegar a identificar los genes exactos. En la actualidad, existen múltiples regiones candidatas definidas por búsquedas amplias del genoma o por su relación con las síntesis de mediadores relacionados con la inflamación asmática. Entre las más importantes están la del *cluster* de la interleucina 4 (5q34) y la del receptor de la inmunoglobulina E (11q13). Sin embargo, el asma parece ser una enfermedad poligénica en la que no sólo se requiere el concurso de varios genes para producir la susceptibilidad de un individuo, sino que ese individuo debe recibir la dosis adecuada del ambiente. Esa relación susceptibilidad genética-exposición ambiental, así como el momento del desarrollo del sistema inmunitario en el que se produce la interacción, va a ser objeto de enorme investigación durante los años venideros. También lo será la interacción entre genes de susceptibilidad y genes modificadores. La genética del asma no sólo tiene interés en la génesis de la enfermedad, sino en su tratamiento. En este sentido, la farmacogenética ha comenzado a aislar determinados polimorfismos que podrían estar relacionados con una mejor o peor respuesta clínica a los fármacos antiasmáticos. La farmacogenómica sustituirá en parte a la farmacología convencional a la hora de producir nuevos fármacos.

Palabras clave:

Asma. Genética. Medio ambiente. Farmacogenética. Farmacogenómica. Regiones candidatas. Búsqueda amplia del genoma. Clonación posicional.

INTRODUCCIÓN

La agregación familiar del asma se reconoce ya en 1860, año en que Salter escribe: "¿El asma es heredi-

taria? Creo que no puede haber duda de que lo es [...] el número de casos en que existe historia familiar de asma es mayor [...] del que podrá encontrarse por la simple doctrina del azar. [...] De treinta y cinco casos [...] encuentro diferentes rasgos de herencia en catorce, [...] dos casos de cada cinco"¹.

Los estudios epidemiológicos de múltiples poblaciones ponen de manifiesto desde hace mucho tiempo que los antecedentes familiares constituyen un factor de riesgo muy importante de padecer la enfermedad: el riesgo de que un hijo sea asmático es ostensiblemente mayor cuando los padres son asmáticos que cuando no lo son. Por ejemplo, en el estudio ISAAC en España, el riesgo de asma en un niño con madre asmática es más del doble que en un niño cuya madre no lo es (datos sin publicar).

Este artículo se propone actualizar la situación de la genética del asma y de la interacción entre los genes y el medio ambiente en la generación de casos de asma. En la primera parte se explican brevemente las dificultades que entraña la definición de un fenotipo asmático. En la segunda parte no se ha querido evitar (aunque sin entrar en grandes detalles) el abordaje de los métodos que actualmente utiliza la genética para el estudio de la transmisión de las enfermedades de una a otra generación y para la identificación de los genes que las causan, ya que creemos fundamental estar familiarizados con ellos para poder entender la enorme cantidad de información que se viene generando durante los últimos años. Posteriormente se resumen los hallazgos actuales sobre la genética del asma. A continuación, y de forma muy sucinta, se toca el tema de la genética en la farmacología del asma. Para terminar, se abordan las interacciones de los genes entre sí y con el medio ambiente.

DEFINICIÓN DE UN FENOTIPO ASMÁTICO

Una de las cuestiones fundamentales a la hora de estudiar la genética de las enfermedades es definir perfectamente el fenotipo. En el caso del asma, y en especial en la infancia, la coexistencia de diversos fenotipos² a lo largo del tiempo hace su definición compleja y poco concreta. Ésta es una de las razones por las que no todos los estudios de la genética del asma

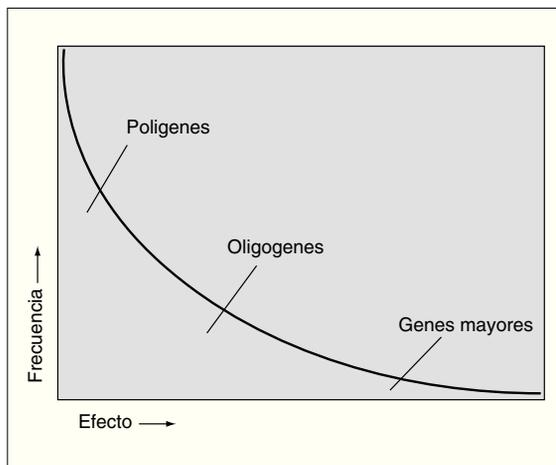


Figura 1. Contraste entre enfermedades monogénicas y poligénicas. En el asma se necesita una gran frecuencia de genes con el polimorfismo adecuado para que se produzca un efecto discreto. Sin embargo, en la fibrosis quística, una mutación en un solo gen causa todo el efecto.

obtienen los mismos resultados. La indefinición del asma radica fundamentalmente en que su diagnóstico sigue siendo en buena medida clínico. El fenotipo asmático se puede definir de forma cualitativa (asma sí o no) o cuantitativa (grados de asma).

Fenotipo cualitativo

Se han propuesto varias formas de concretar mejor el fenotipo asmático³ para intentar estrechar la búsqueda genética en esta enfermedad: usar subfenotipos clínicos, usar subfenotipos graves, establecer una edad de comienzo y estudiar únicamente a los individuos con antecedentes familiares de asma. Además, otros fenotipos que se pueden utilizar son los que presentan criterios definidos por la progresión de la enfermedad, la historia natural⁴ y la respuesta al tratamiento⁵⁻⁸.

Los fenotipos intermedios son los que utilizan marcadores cuantitativos (que no constituyen la enfermedad, pero son rasgos que suelen acompañarla). En el caso del asma, se han usado la hiperreactividad bronquial⁹, el volumen espirado en el primer segundo (FEV₁)^{10,11}, la variabilidad del flujo espiratorio máximo (FEM), la reversibilidad a un broncodilatador^{8,10}, la inmunoglobulina (Ig) E total¹², la IgE específica¹³, el *prick*-test¹⁴ y los eosinófilos¹⁵. Muchos estudios exploran varios de estos parámetros a la vez^{10,16}.

Una forma de combinar varias características para perfilar mejor el fenotipo de asma es utilizar algoritmos que permiten una mejor clasificación de la población en asmáticos y controles. A veces este método

es mejor que el propio diagnóstico de la enfermedad, debido a que, en general, el asma suele estar infra-diagnosticada.

El asma como rasgo cuantitativo

La genética estudia las formas y mecanismos de la herencia de rasgos o características. Rasgo es un término poco definido que puede hacer alusión tanto a la turgencia de la piel de un guisante (liso o rugoso) como al coeficiente intelectual de las personas. Es importante tener en cuenta que los individuos no son un conjunto de rasgos (cada uno codificado por un gen), sumados los unos a los otros, y que cada uno de esos rasgos no está codificado necesariamente por un solo gen. Muy al contrario, un solo gen puede ser fuente de rasgos muy diversos (pleiotropismo), y un rasgo puede necesitar la interacción de varios genes (poligenismo). La fibrosis quística podría constituir un ejemplo de enfermedad pleiotrópica, si se considera que la alteración de un solo gen (7q31) origina numerosos síntomas, fundamentalmente respiratorios y digestivos. Por el contrario, el asma es probablemente una enfermedad poligénica típica, ya que es muy posible que para la aparición de síntomas de asma (fenotipo asmático) se requiera la interacción de diversos genes relacionados con rasgos diversos, como la hiperreactividad bronquial (receptor β -adrenérgico), la inflamación mediada por IgE (interleucina 4 [IL-4]), o la inflamación no mediada por IgE (factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α) (fig. 1).

Los rasgos heredables puede ser, como las variables estadísticas, discretos (cualitativos) o continuos (cuantitativos) (fig. 2). Un rasgo discreto es aquel que determina una clase: el factor Rh, por ejemplo, constituye un rasgo cualitativo, que determina una clase (positivo o negativo) sin espacios intermedios. Por el contrario, otros rasgos son continuos, como ocurre con la talla o con el coeficiente intelectual. En general, parece que los rasgos discretos son codificados por uno o pocos genes, mientras que los rasgos continuos tienen una herencia poligénica y cada uno de los genes involucrados se segrega (hereda) de acuerdo con las leyes de Mendel. Además, los rasgos cuantitativos se ven afectados por el entorno en mayor o menor grado. La genética cuantitativa es la que estudia los rasgos continuos. Asimismo, los *loci* que codifican rasgos continuos se conocen como *loci* de rasgo continuo o *quantitative trait loci* (QTL)¹⁷.

Los diferentes alelos (secuencias diversas de nucleótidos que un gen puede tener en una población y que codifican formas distintas de un rasgo como piel lisa-piel rugosa) de los genes que codifican rasgos cuantitativos pueden tener efectos aditivos. Pongamos

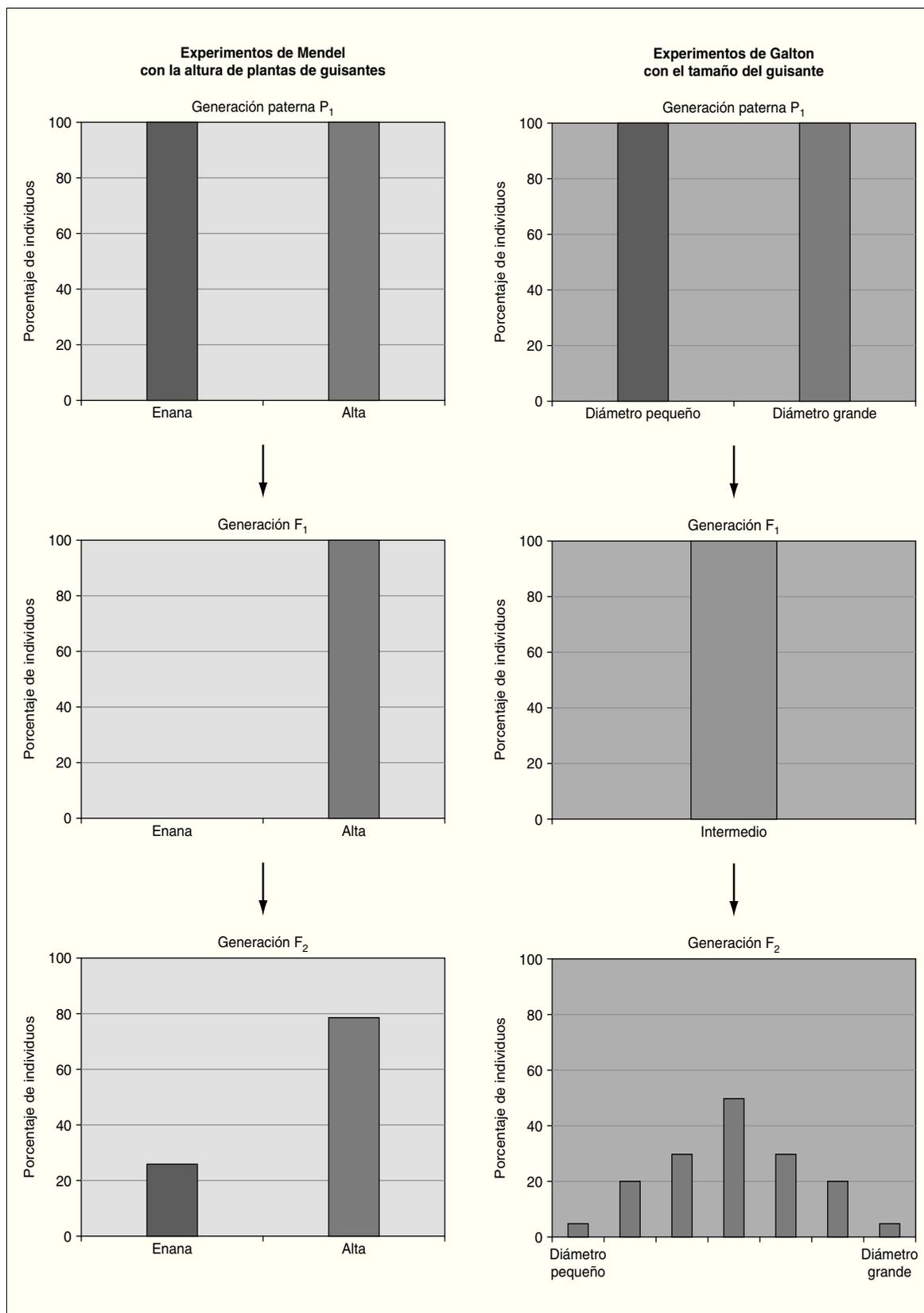


Figura 2. Loci de rasgos cuantitativos. A la izquierda, un rasgo cualitativo; a la derecha, un rasgo cuantitativo.

TABLA 1. Ejemplo de codificación de un rasgo cuantitativo con 2 genes A y B. El alelo "A" codifica 4 unidades; el alelo "a", 2 unidades; el alelo "B", 2 unidades, y el alelo "b", 1 unidad

Genotipo	AABB								
Unidades totales codificadas	12	11	10	10	9	8	8	7	6

que existen, por ejemplo, dos genes *A* y *B* que codifican un rasgo cuantitativo; y que el alelo "A" contribuye con 4 unidades, mientras que el alelo "a" lo hace con 2 unidades. En otro *locus* del genoma, donde se encuentra el gen *B*, el alelo "B" proporciona 2 unidades, mientras que el alelo "b" sólo proporciona 1 unidad. Si estos 2 genes controlan el rasgo, existen 9 posibles genotipos (el número de genotipos es $3^{n^{\circ}}$ genes), cada uno de los cuales determina una suma de unidades, dependiendo de la segregación de los alelos (tabla 1). Como puede adivinarse, este conjunto de valores puede representarse gráficamente, y si se hubiera elegido un ejemplo con 5 genes, se vería que los distintos genotipos ($3^5 = 243$) codifican una serie de valores que se distribuyen normalmente (es decir, como una campana de Gauss).

Sin embargo, otras interacciones genéticas, como la dominancia (el alelo dominante anula al recesivo y sólo él contribuye al fenotipo final, de manera que el homocigoto dominante y el heterocigoto tendrían el mismo valor fenotípico) y la epistasis (relación que un gen ejerce sobre otro), también afectan al fenotipo. Con todo, la acción aditiva suele ser la más importante en los rasgos cuantitativos.

Por otro lado, el ambiente también afecta a los rasgos cuantitativos y, ya que las interacciones entre los genes y el ambiente son el tema de otro apartado, sólo cabe decir aquí que el ambiente puede cambiar el valor de un fenotipo particular y hacer, por ejemplo, que el genotipo AaBb de la tabla 1 varíe de 8 a 10^{18} .

El desarrollo del análisis de los QTL ha permitido que se puedan usar tanto las técnicas de genes candidatos como de búsqueda amplia del genoma. Por tanto, la utilización de un fenotipo asmático continuo (índice asmático) en contraste con uno discreto (asma sí o asma no) es tentador, y para ello se han desarrollado diversos enfoques, todos ellos relacionados con el uso de puntuaciones o índices¹⁹.

Siguiendo los factores de riesgo determinados en los estudios epidemiológicos, se puede establecer una ecuación que calcule las probabilidades de que un determinado individuo, de acuerdo con esa serie de factores de riesgo (sexo, edad, alergia, contacto con tabaco, antecedentes familiares, etc.), presente asma. El método estadístico por el que se llega a este tipo de ecuación se conoce como regresión logística. Sin

embargo, para la creación de un "índice asmático" deben aclararse aún 2 puntos. En primer lugar, los factores de riesgo de padecimiento de asma no son del todo conocidos y podrían variar de una población a otra, por lo que se necesitan más estudios basados en poblaciones generales. En segundo lugar, se debe considerar que el asma es una enfermedad en la que influyen la temporalidad y el ambiente, de manera que los síntomas pueden darse sólo en una época determinada de la vida y sólo cuando el enfermo se expone a determinadas situaciones²⁰. La inclusión del tiempo en la ecuación hace que el modelo de regresión logística (modelo estático) sea poco adecuado y, por el contrario, la regresión de Cox (regresión de riesgos proporcionales de Cox, muy utilizada en los estudios de supervivencia de ensayos clínicos) se ajuste mejor a la situación real.

Cualquiera de los métodos comentados para proporcionar un índice o una probabilidad de presentar asma se basa en estudios observacionales previos en los que, de forma poco controlada, se ha establecido qué individuos presentan la enfermedad y qué otros no. Los errores de clasificación (clasificar como asmático al que no lo es, o viceversa) en estos estudios previos pueden generar errores con respecto a la valoración de los factores de riesgo. Para tratar de corregir este error, algunos autores²¹ han desarrollado lo que se denomina "índice de propensión". Básicamente consiste en incluir en el análisis la probabilidad condicional (probabilidad de que acontezca un episodio dado otro previo) de estar afectado (p. ej., de asma) si se da una serie de circunstancias de riesgo que determinarían –en un modelo ideal– la presencia de la enfermedad. Dicho de otra forma, debe tenerse en cuenta que no todos los que "deberían" estar enfermos (debido a que están sometidos a los factores de riesgo suficientes) lo están. El índice de propensión trata de tener esto en cuenta.

Por tanto, cuando los estudios epidemiológicos lo permitan, la consideración del asma como un rasgo cuantitativo puede ser beneficiosa a la hora de definir el fenotipo asmático en los estudios genéticos, en especial si se llegara a un índice que determinara la enfermedad con un alto valor predictivo y fuera utilizado de forma general por todos los grupos que investigan el tema.

ESTUDIO DE LA GENÉTICA DEL ASMA

Estudios epidemiológicos

Estudios familiares en población general

En los estudios familiares existen 2 métodos para cuantificar la contribución genética en el asma. El primero de ellos es la tasa de riesgo o riesgo relativo familiar (λR). Esta tasa se define a partir de una clásica tabla de 2×2 :

	Madre asmática	Madre no asmática
Asmáticos	a	b
No asmáticos	c	d

$$\lambda R = (a / a + c) / [(a + b) / (a + b + c + d)]$$

Es decir, es la razón entre la prevalencia de asma en los individuos con familiares asmáticos y la prevalencia en la población general. La R se refiere a "relativa", es decir a "familiar". El riesgo relativo (λ) familiar es una buena indicación de la contribución de los genes a la presencia de una enfermedad. Cuanto más pequeña sea λ , más numerosa habrá de ser la población de estudio para detectar asociación. Algunos estudios, con una prevalencia de asma en la población de un 4%, describen una prevalencia de asma en individuos con familiares de primer grado asmáticos del 20-25%, lo que supone un λ de 5 o 6²². En otros estudios se citan λ de 2,6²³. Por contraste, la λ de la fibrosis quística es de 500.

Otra forma de medir la contribución genética en poblaciones generales es la heredabilidad (H^2), que se define como la proporción de la varianza (variación) fenotípica que se debe a los genes (V_g). La varianza total del fenotipo (V_f) puede deberse no sólo a los genes sino también al ambiente (V_a) y, si se quiere además, a la interacción entre el ambiente y los genes (V_{ga}). Por lo tanto,

$$V_f = V_g + V_a + V_{ga}$$

y

$$H^2 = V_g / V_f$$

Los cálculos estadísticos de H^2 son complicados y pueden hacerse por medio de programas especiales de estadística genética. En cualquier caso, quedan fuera del ámbito de esta revisión. Los estudios sobre heredabilidad en el asma arrojan cifras de entre el 50 y el 60%²², lo que indica que los genes son responsables solamente de la mitad de esa varianza.

Análisis de segregación

Este tipo de análisis compara la distribución de una determinada enfermedad en familias de una pobla-

ción con una distribución teórica que correspondería a los diferentes modos de herencia como dominante, recesiva, poligénica, mixta o multifactorial. Los estudios realizados hasta el momento no han sido concluyentes y la forma de heredar el asma sigue siendo un enigma, aunque los últimos datos sugieren un modelo de un gen principal (bien sea dominante o recesivo) o un modelo multifactorial (varios genes interactuando con el ambiente)²⁴⁻³⁷. Recientemente, se ha sugerido que los valores de IgE, los eosinófilos sanguíneos y la hiperrespuesta bronquial están codificados por genes distintos³⁸.

Estudios con gemelos

Los estudios en gemelos se basan en el hecho de que los gemelos monocigóticos comparten todo su material genético, mientras que los dicigóticos sólo comparten la mitad. Comparando la concordancia de una enfermedad entre gemelos monocigóticos y dicigóticos se puede tener una idea de la contribución de los genes al asma. Cualquier rasgo que tenga mayor concordancia en los gemelos monocigóticos que en los dicigóticos tendrá una base genética. Además, si la concordancia entre gemelos de cualquier tipo no varía mucho cuando éstos se crían de forma junta o separada, la responsabilidad de los genes es mucho mayor que la del ambiente.

Aunque hay estudios de asma en gemelos desde hace 30 años³⁹, uno de los más claros y pioneros es el de Duffy et al⁴⁰, que con 3.898 pares de gemelos australianos pusieron de manifiesto que la correlación para el asma entre gemelos monocigóticos es del 65%, mientras que en los dicigóticos es del 25%. Entre los monocigóticos hay diferencias entre los niños y las niñas, y la correlación es mayor entre los niños (el 75 frente al 60%). Estos autores estimaron que la heredabilidad del asma en su población era del 60 y del 70%. Estudios posteriores ofrecen datos parecidos⁴¹⁻⁵².

Utilizando estudios de gemelos, la heredabilidad se puede calcular según la fórmula:

$$H^2 = 2(C_{MC} - C_{DC})$$

donde C_{MC} es la concordancia entre gemelos monocigóticos y C_{DC} es la concordancia entre dicigóticos¹⁸. Queda claro, por tanto, que al menos un 30% de la prevalencia del asma en un momento dado es debido a factores ambientales.

Planteamientos para la identificación de los genes humanos

El gen responsable de una determinada enfermedad puede ser relativamente fácil de identificar cuan-

do esa enfermedad está causada por la existencia de una proteína anormal (fibrosis quística) o por la ausencia de una proteína normal (fenilcetonuria). Cuando una enfermedad (caso del asma) no tiene una base bioquímica o fisiológica perfectamente definida, hay 2 formas fundamentales de buscar sus orígenes genéticos: la búsqueda en genes candidatos y la búsqueda amplia del genoma.

Regiones candidatas

Las regiones candidatas son aquellas que codifican proteínas que se relacionan con la enfermedad en estudio. También pueden ser regiones candidatas aquellas zonas del genoma que se han relacionado con el fenotipo asmático en una búsqueda amplia del genoma por medio de las herramientas que se detallan más adelante.

De entrada, por tanto, en el asma son áreas candidatas las relacionadas con los acontecimientos importantes en la fisiopatología de esta enfermedad, que incluye una respuesta inmunitaria, alérgica o no. El reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos sólo puede llevarse a cabo cuando éstos son presentados por las células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, etc.). Estas células presentan el antígeno unido a moléculas del sistema HLA al linfocito para que lo pueda reconocer y montar la respuesta inmunitaria pertinente. Las moléculas HLA de clase I presentan los antígenos a los linfocitos Tc (citotóxicos o CD8+), y las de clase II, a los linfocitos Th (cooperadores o CD4+). En la actualidad se supone que el fenotipo alérgico conlleva un desequilibrio entre 2 poblaciones linfocitarias, la Th1, antiinflamatoria, y la Th2, proalérgica.

El linfocito pone en marcha una cascada de reacciones por medio de la liberación de citocinas, en su mayoría interleucinas (IL). De éstas, las que más interés suscitan en el asma son las que hacen madurar los linfocitos Th0 hacia Th1 (IL-12) o hacia Th2 (IL-4), las derivadas de las poblaciones linfocitarias Th2, como la IL-4, IL-5 o IL-10, y las derivadas de las poblaciones Th1, como la IL-2 o el interferón gamma (IFN γ). Los *loci* genéticos que codifican todos estos mediadores son también regiones candidatas.

La importancia de la IgE en los procesos alérgicos en general y asmáticos en particular hace a todos los mecanismos relacionados con esta inmunoglobulina candidatos genéticos apropiados. En concreto, son áreas candidatas los genes codificadores de los receptores para la fracción Fc de esta inmunoglobulina, tanto los de alta afinidad en mastocitos y basófilos (Fc ϵ R-I) como los de baja afinidad en linfocitos B (Fc ϵ R-II). Otro candidato lógico incluido en los estu-

dios de la genética del asma es el receptor β_2 , tan involucrado en la dinámica del músculo liso bronquial.

Sabiendo la composición de aminoácidos de estas sustancias es posible conocer la secuencia de bases de ADN implicadas en su codificación. Esta información está actualmente disponible en las bases de datos genómicos, como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) o Genome Data Base (www.gdb.org).

Búsqueda amplia del genoma

Los seres humanos presentamos un grado considerable de variabilidad genética, que puede observarse en rasgos como la estatura, el color de la piel o el de los ojos. Esta variabilidad fenotípica se corresponde con la existencia de multitud de pequeñas variaciones en la secuencia genética contenidas en regiones codificantes. Así, un gen puede variar entre individuos en función de su secuencia de ADN. Las regiones no codificantes contienen un número aún mayor de variaciones en la secuencia del ADN debido a la menor presión selectiva que existe sobre estas secuencias. Algunos *loci* varían considerablemente entre los individuos. Se dice que un *locus* es polimórfico cuando tiene al menos 2 alelos diferentes cuyas frecuencias alélicas respectivas son de al menos el 1% (o el 2% de los individuos son heterocigotos para dicho *locus*). Cuando la frecuencia es menor, se habla de variantes.

Para realizar una búsqueda amplia del genoma no es necesario conocer proteínas anómalas ni genes candidatos; se aprovecha la existencia de secuencias polimórficas de bases (polimorfismos, variaciones) a lo largo de todo el genoma humano (no confundir con polimorfismo genético, que es un *locus* genético: zona del cromosoma en la que se encuentra un gen, que tiene 2 o más alelos –variantes– con una frecuencia mayor del 1% en la población). Existen 4 tipos fundamentales de polimorfismos: los fragmentos de restricción (*restriction fragments length polymorphisms*, RFLP), las repeticiones en tándem de número variable (*variable number of tandem repeat*, VNTR), los polimorfismos microsatélite y los polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Por técnicas que se escapan del tema de esta revisión, en la última década se ha podido ir localizando miles de marcadores de estos 4 tipos a lo largo de todo el genoma.

Estos polimorfismos se utilizan como marcadores que se pueden rastrear en árboles genealógicos de familias con la enfermedad y en poblaciones generales. Para que sean útiles, estos marcadores polimórficos deben transmitirse con el gen de la enfermedad, deben ser codominantes (es decir, los homocigotos

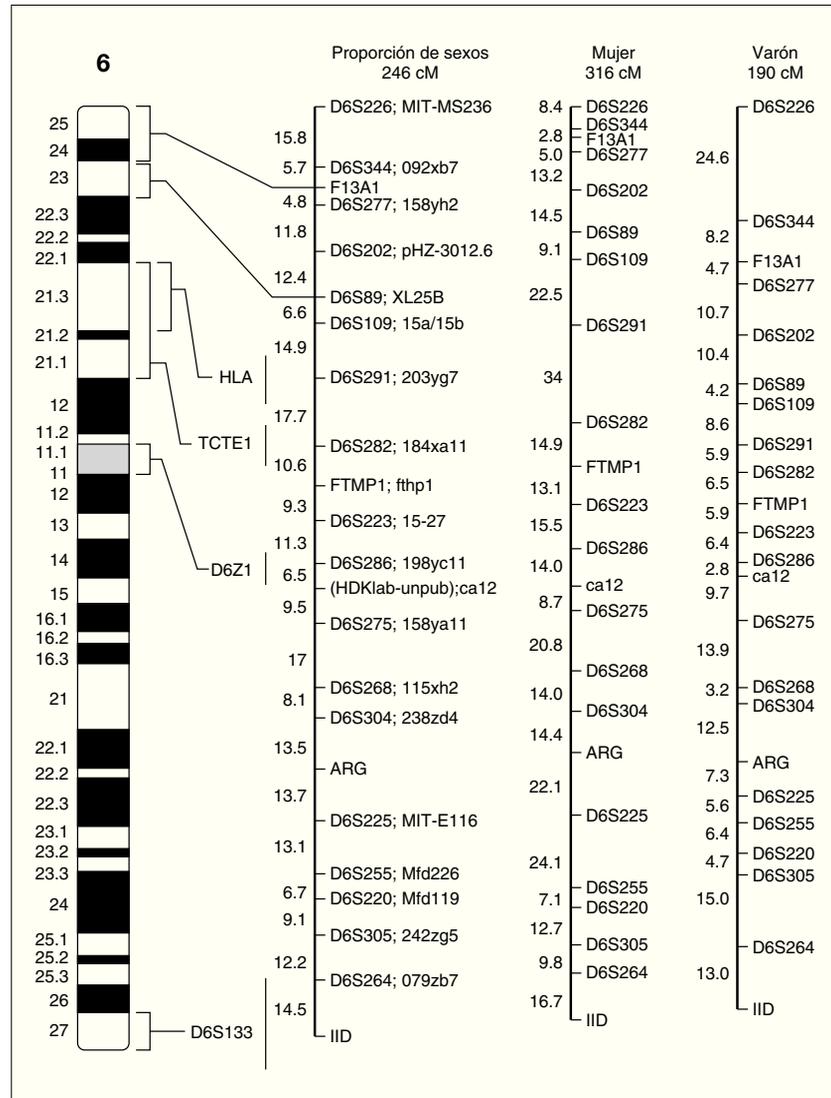


Figura 3. Mapa del cromosoma 6. A la izquierda, el mapa físico con las clásicas bandas y su numeración a partir del centrómero. A la derecha, el mapa genético con los marcadores y la distancia entre ellos en centimorgans (cM). Obsérvese que la distancia entre marcadores es mayor en el cromosoma de la mujer que en el del varón. En algunos casos (p. ej., HLA) se puede establecer una relación entre el mapa físico y el genético.

deben distinguirse de los heterocigotos), deben ser numerosos y tener una gran variabilidad (fig. 3).

Herramientas para la elaboración de mapas genéticos: análisis de ligamiento

La localización de genes y los llamados mapas genéticos se elaboran de los entrecruzamientos cromosómicos que se producen en la meiosis. Las distancias entre loci no se miden en unidades físicas, sino en frecuencias de entrecruzamientos meióticos. Cuanto más alejados físicamente estén 2 loci, más frecuentes serán los entrecruzamientos entre ellos y la consiguiente producción de recombinaciones (nuevas combinaciones de material genético resultado de los entrecruzamientos de cromosomas en la profase de la meiosis). Las frecuencias de entrecruzamientos

se pueden deducir a partir del estudio de árboles genealógicos.

Análisis de ligamiento

Usando familias que incluyan individuos afectados y sus árboles genealógicos, se puede saber si un determinado rasgo fenotípico (p. ej., asma) se hereda (segrega) conjuntamente con un locus conocido de antemano y cuya segregación podemos seguir por contener un polimorfismo (marcador). Si dicho marcador se hereda a la vez que el rasgo fenotípico, se puede concluir que el gen del rasgo se encuentra cerca de él (está ligado a él). Si, por el contrario, se heredan separadamente, el gen del rasgo se encontrará lejos del marcador, que podrá hallarse en individuos sin el rasgo (sin asma). Cuanto más cercanos estén el marcador

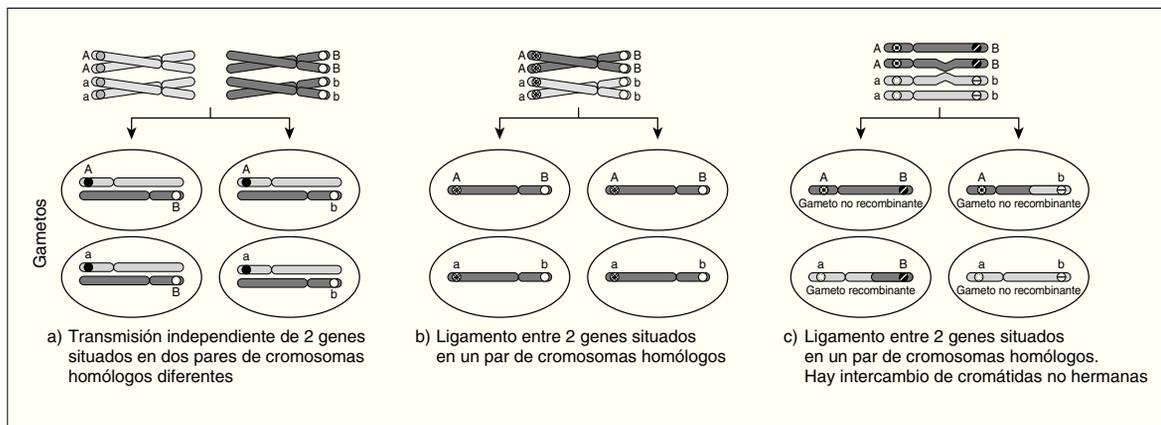


Figura 4. Formas de segregación de genes en la formación de los gametos. Resultados cuando 2 genes heterocigotos se encuentran en: a) dos pares diferentes de cromosomas, b) en el mismo par de cromosomas, sin que se produzca intercambio entre ellos, y c) en el mismo par de homólogos, con intercambio entre cromátidas no hermanas. La probabilidad de que el entrecruzamiento segregue 2 genes (o un gen y un marcador) separadamente depende de la distancia entre ambos: cuanto más cerca se encuentren, menos probable es que un entrecruzamiento los separe, dándose ligamento entre ellos.

y el gen, más difícil será que se hereden separadamente a consecuencia de los entrecruzamientos que se producen fisiológicamente en la meiosis (fig. 4). La medida de la cercanía o lejanía de un gen y su marcador no es una dimensión física, sino probabilística (probabilidad de que el marcador y el gen no se separen a una determinada frecuencia de recombinación). Un centimorgan (cM) es la distancia entre 2 loci entre los que hay una probabilidad de recombinación del 1%. Aproximadamente, esto se traduce en una dimensión física de un millón de pares de bases (1 Mpb). Para calcular la significación del ligamento se utiliza una medida estadística conocida como puntuación LOD (*logarithm of the odds*). Se acepta que una puntuación LOD de 3,0 es indicativa de ligamento (entre el marcador y el gen) e indica que las probabilidades a favor del ligamento son 1.000 veces más que a favor del no ligamento. Si no se detecta ligamento con un marcador, entonces se puede acudir a otro y volver a empezar.

Formas particulares de análisis de ligamiento

El análisis del ligamiento es la herramienta básica para la localización de áreas del genoma que podrían tener relación con una enfermedad. En los últimos años, a medida que se han definido nuevos marcadores y la estadística ha entrado de lleno en el campo de la genética, se han ido depurando nuevos métodos, actualmente disponibles en programas de ordenador. Sin embargo, la base sigue siendo el ligamiento. A continuación se exponen de manera muy somera algunos de estos métodos.

Análisis de parejas de hermanos. Los análisis de parejas de hermanos son una forma de análisis de ligamiento en el que no se necesita información sobre el modo de herencia. El principio básico de esta técnica es que si 2 individuos relacionados (hermanos) son fenotípicamente similares (p. ej., tienen asma), un marcador situado cerca del gen productor del fenotipo debe ser común a ambos. Un determinado marcador será compartido por 2 hermanos un 50% de las veces, ya que comparten el 50% del material genético. Cuando los 2 hermanos son asmáticos, comparan material genético relacionado con la enfermedad. ¿Cómo localizar ese material? Una vez más usando marcadores previamente definidos y conocidos. Si un determinado marcador está ligado al gen relacionado con el asma, se transmitirá con éste y, por tanto, su localización en hermanos afectados será siempre mayor del 50% (figs. 5 y 6).

Desequilibrio del ligamiento. Dentro de una misma familia, el gen de una enfermedad podría estar ligado a un determinado alelo de un determinado marcador (marcador A, alelo 1), mientras que en otra familia ese mismo gen podría estar ligado a un alelo distinto de ese marcador (marcador A, alelo 2). Esto se explica de 2 formas. Primero, las mutaciones que podemos encontrar en un determinado gen y en diferentes individuos pueden ser consecuencia de diferentes acontecimientos mutacionales; en algunos casos se habrán producido en un cromosoma que porta el alelo 1, y otros en un cromosoma que porta el alelo 2 del marcador. Segundo, y a pesar de que una determinada en-

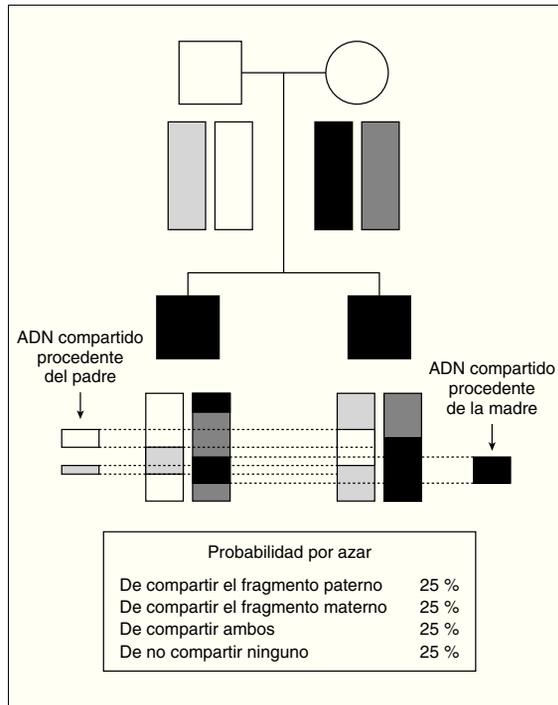


Figura 5. Análisis de ligamiento en parejas de hermanos. Cuando se constata en un número amplio de familias que el material genético —representado en este caso por 2 cromosomas— que comparten los hermanos afectados es significativamente superior al 25 %, es probable que este material compartido contenga un gen relacionado con la enfermedad.

fermedad sea fruto de una única mutación original, los entrecruzamientos ocurridos durante muchas generaciones pueden haber alterado la disposición inicial. Por lo tanto, puede darse el caso de que exista ligamiento entre un alelo de un marcador y un gen dentro de una misma familia, pero no entre distintas familias.

Cuando se estudia una población (muchas familias) y se observa que no hay una asociación entre el gen y un determinado alelo de un marcador, se dice que los 2 loci (el del gen y el del marcador) se encuentran en equilibrio de ligamiento, que es la situación normal. Sin embargo, algunas veces sí existe una asociación poblacional entre un gen y un alelo de un marcador, entendiéndose por asociación que el alelo del marcador y el gen se den juntos con mayor frecuencia de la esperada en función de las frecuencias individuales de cada uno de ellos. Esta situación se conoce como desequilibrio de ligamiento.

El estudio del desequilibrio del ligamiento tiene la ventaja sobre el análisis del ligamiento que se cuenta con un inmenso número de recombinaciones ocurridas durante muchas generaciones, lo que permite estable-

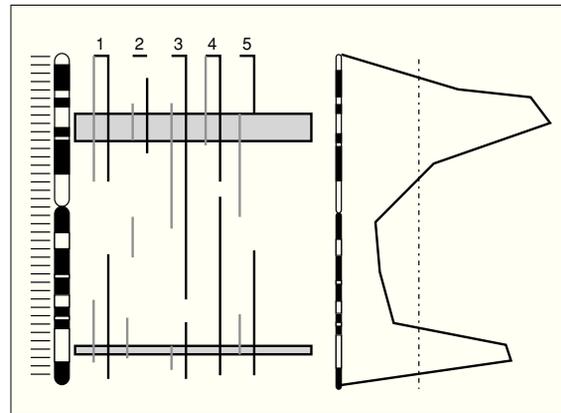


Figura 6. Análisis de ligamiento en parejas de hermanos. De izquierda a derecha: marcadores del cromosoma, cromosoma, material genético compartido del padre (línea gris) y de la madre (línea negra) en 5 parejas de hermanos y zonas (superior e inferior) que todos ellos comparten. A la derecha del todo se ve que la probabilidad de que los fragmentos se compartan es mayor que lo que provocaría el azar (el límite de la significación estadística es la línea discontinua vertical).

cer mapas genéticos a intervalos menores (ya que ha habido un inmensamente mayor número de entrecruzamientos). Mientras que el análisis de ligamiento permite establecer mapas con un detalle de varios centimorgans, el desequilibrio del ligamiento permite hacerlo a niveles 10 veces mayores (0,1 cM). Lo que, con todo, equivale a 100 kpb (100.000 pares de bases).

Como se puede intuir por lo anteriormente comentado, para utilizar el análisis de desequilibrio de ligamiento ha de estudiarse una población con individuos afectados y no afectados.

El inconveniente fundamental de este modelo de estudio es que, si son muchas las mutaciones causantes de enfermedad en un determinado gen, habrán ocurrido en cromosomas que portan diferentes alelos marcadores, lo que hará imposible identificar desequilibrio de ligamiento entre el marcador y el rasgo fenotípico. Dicho de otra manera, que no haya desequilibrio de ligamiento para un determinado marcador no excluye que la región estudiada contenga el gen responsable; mientras que, por el contrario, la inexistencia de ligamiento sí excluye que la región contenga el gen relacionado con el rasgo fenotípico estudiado, dentro del margen de error determinado por el tamaño de la muestra estudiada.

Test de desequilibrio de la transmisión (TdT).

Es una variante del análisis del desequilibrio de liga-

miento que permite trabajar sólo con individuos enfermos (sin grupo control). Sin embargo, es necesario disponer de los padres del individuo afectado. El test compara (en un amplio número de familias) el número de veces que uno de los padres transmite a su hijo un alelo específico con el número de veces que ese alelo no es transmitido. El TdT es un tipo de estudio de asociación en el que el "caso" es el alelo transmitido y el "control" es el alelo no transmitido⁵³. Cuando hay un número suficiente de familias se puede estudiar la significación estadística de la transmisión frente a la no transmisión. Es decir, si ese alelo es transmitido por los padres a los hijos (recordemos, todos ellos afectados) más veces de las que sería previsible por azar. Si esto fuera así, ese alelo concreto tendría relación con la enfermedad.

Refinamiento en la búsqueda de un gen: asociación, mapas físicos y expresión del gen

Con el análisis del ligamiento se puede llegar a localizar una zona "caliente" (candidata) en el genoma. Sin embargo, casi siempre se tratará de una zona demasiado amplia. Para refinar la búsqueda del gen existen varias posibilidades:

1. Utilizar nuevos marcadores genéticos que se encuentren más próximos entre sí y permitan estrechar la zona del mapa genético. Para esto pueden usarse de nuevo las técnicas de ligamiento anteriormente citadas, que serán unas u otras de acuerdo con el tipo de población de que se disponga (población general, familias, hermanos afectados, etc.).
2. Secuenciar los genes candidatos de la región "caliente" buscando polimorfismos que difieran en frecuencia entre los casos (asmáticos) y los controles (sanos). Estos estudios son los estudios de asociación.
3. Realizar un mapa físico de la región.

Estudios de asociación

La intención de los estudios de asociación es mostrar que los individuos afectados de asma tienen más probabilidades de portar un determinado alelo de un gen que los individuos no asmáticos de esa misma población.

No debe confundirse ligamiento con asociación. El ligamiento, como ya se ha dicho, se refiere a la posición de los *loci* en los cromosomas. Cuando 2 *loci* (el correspondiente al marcador y el correspondiente al gen) están ligados, los diferentes alelos de esos *loci* se transmiten juntos dentro de una misma familia. Sin embargo, como también se comentó antes, cabe la posibilidad de que estos mismos alelos no se transmitan junto al gen en otra familia (estarían en equili-

brio de ligamiento). Por otra parte, la asociación se refiere a la relación estadística entre 2 características, sean o no genéticas, en toda la población. En este caso se refiere a la relación entre un determinado alelo y el fenotipo asmático.

Los estudios de asociación deben interpretarse con cuidado, ya que a veces la asociación puede ser espuria. Por ejemplo, si no se tiene en cuenta la etnia y un determinado alelo es más frecuente en una concreta, se puede llegar a la conclusión de que una enfermedad está asociada a un determinado alelo, cuando en realidad la enfermedad simplemente es más frecuente en esa etnia. Otros factores que producen asociaciones espurias son la definición imprecisa de la enfermedad, el inadecuado tamaño muestral y el incorrecto emparejamiento entre casos y controles para variables tales como el sexo o la edad. La incapacidad para replicar una asociación en múltiples poblaciones es una buena indicación de que la asociación no es válida.

Mapas físicos. Clonación funcional y clonación posicional

Clonación funcional. En el caso de conocer la secuencia de ADN de un gen (porque se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica), su localización física suele llevarse a cabo por técnicas de hibridación. Estas técnicas se basan en la propiedad del ADN desnaturalizado (es decir, separado y reducido a una sola hebra) de acoplarse base a base (hibridarse) con sondas de ADN complementario marcadas radiactivamente o por otros métodos, como la quimioluminiscencia. Estas sondas se pueden fabricar por métodos de recombinación (proceso por el que se crea una fibra de ADN de tamaño variable a partir de varias moléculas procedentes de fuentes diversas). Esta forma de localización física de genes es conocida como clonación funcional.

Clonación posicional. Cuando la secuencia de ADN de un gen no se conoce, y cuando por estudios previos (generalmente de análisis de ligamiento) se detecta una región del genoma relacionada con la enfermedad, ésta suele ser lo suficientemente amplia (quizás 1 cM, o aproximadamente 1Mpb) como para contener decenas de genes junto con zonas no codificadoras. Una posible estrategia es la de comenzar con un marcador ligado y "peinar" las zonas circundantes. El proceso por el que esto se lleva a cabo se conoce como clonación posicional.

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas es el "paseo cromosómico". En éste se utiliza el ADN del marcador como sonda para elegir en una biblio-

teca de ADN (genoteca) segmentos de ADN que se superpongan parcialmente. Entre todos ellos se elige aquel que se superponga en su totalidad con el ADN que se está estudiando. Este segmento a su vez puede utilizarse como sonda para escoger un nuevo segmento de ADN de la biblioteca genómica con el que se solape parcialmente y reiniciar el proceso tantas veces como sea necesario. De esta manera se va “caminando” a lo largo del cromosoma. Como no suele saberse a qué lado del marcador está el gen (hacia qué sentido debe caminarsse), suele hacerse en ambos. La existencia en las bibliotecas genómicas de cientos de miles de secuencias de ADN etiquetadas (*sequence tagged sites*, STS) (fig. 7) con su posición física en el cromosoma facilita el trabajo.

Para clonar (hacer múltiples copias) los segmentos de ADN usados en el “paseo cromosómico” se utilizan vectores tales como plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (*yeast artificial chromosomes*, YAC), cromosomas artificiales de bacterias (*bacterial artificial chromosomes*, BAC) y cromosomas artificiales del bacteriófago P1 (*P1 artificial chromosomes*, PAC). Independientemente del vector utilizado, el principio es siempre el mismo: la inserción de la secuencia del ADN a clonar en el ADN de un organismo natural o artificial que, al reproducirse a gran velocidad, hace copias con gran rapidez. El ADN humano insertado se une (recombina) al ADN del organismo, por lo que a la vez que reproduce su propio ADN reproduce el ADN humano insertado. La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) no es útil aquí, ya que las secuencias de ADN a clonar son demasiado grandes para esta técnica.

Para entender un poco mejor este proceso, imagine-mos que queremos ir de Cartagena a Madrid y que no sabemos con exactitud en qué dirección está Madrid ni a qué distancia. Se nos da un plano de carreteras del municipio en el que estamos actualmente y tenemos acceso a una biblioteca de mapas de cada uno de los municipios de las provincias de Murcia, Albacete y Madrid. Estos mapas no están etiquetados, pero, como suele ocurrir con los mapas de carreteras, hay zonas de un mapa que se superponen con las de otro. Partiendo del primer mapa que se nos da, vamos buscando en la biblioteca el mapa que se superpone en ambas direcciones. Usando esos 2 últimos mapas, volvemos a la biblioteca y buscamos los que se superpongan de nuevo, consiguiendo componer un rompecabezas que nos llevará a Madrid.

A medida que se va avanzando en el “paseo” surge la pregunta: ¿cómo se sabe que se ha encontrado un gen? Para ello se usan diversos métodos:

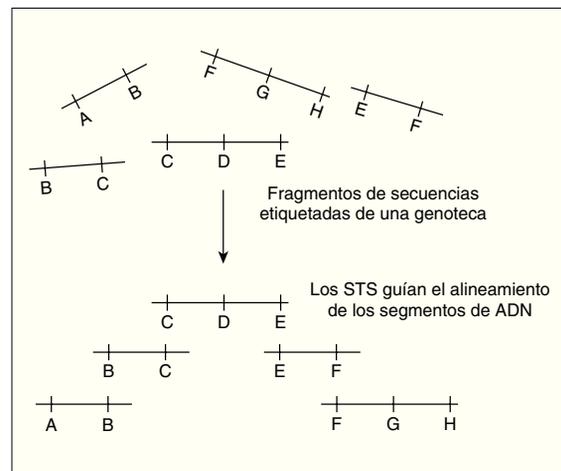


Figura 7. Esquema del uso de las secuencias etiquetadas (STS) para indicar la superposición de segmentos de ADN en el “paseo cromosómico”.

1. *Análisis de la conservación entre especies.* Se basa en el hecho de que la parte codificadora del gen (la que interesa) no ha cambiado apenas en el curso de la evolución, por lo que será común en muchas especies. Si la secuencia que estamos considerando se hibrida con la de otras especies, es probable que tengamos una secuencia codificadora y, por tanto, un gen.

2. *Identificación de islas CG.* Se sabe que el 60% de los genes humanos, en particular la mayor parte de los constitutivos (*housekeeping*) o no específicos de tejido, tienen secuencias ricas en nucleótidos citosina-guanina no metilados en su región 5-terminal (que probablemente los hace más accesibles a los factores de transcripción). La identificación de estas zonas puede ayudar a perfilar la zona del gen.

3. *Identificación de exones.* Aunque hay varias técnicas para este proceso, la más típica es el “atrapamiento del exón”. En ella se inserta la secuencia de ADN en un plásmido que, a su vez, se emplea para introducir este ADN en una célula. Como consecuencia se producirá la transcripción (síntesis de ARNm) de ese ADN. El ARNm sólo contiene los exones; luego, si la fracción de ARNm que se recoge es mayor que la del propio plásmido, eso indica que había un exón incluido en el ADN insertado (fig. 8).

4. *Marcas de secuencias expresadas (expressed sequence tags, EST).* Se trata de secuencias conocidas de genes que se encuentran disponibles en genotecas. Con ellas se puede proceder con las técnicas de hibridación que se comentaron anteriormente.

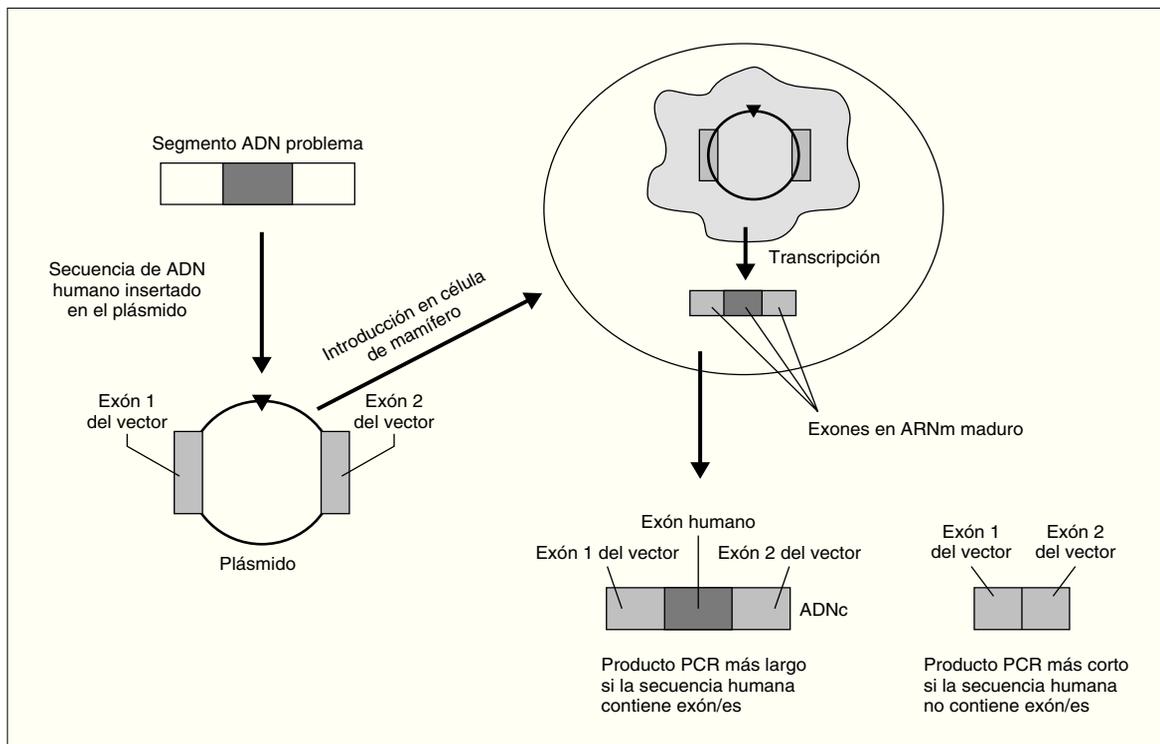


Figura 8. Técnica del atrapamiento del exón. El segmento de ADN humano se coloca en un vector plásmido utilizando técnicas de recombinación de ADN. El vector plásmido se clona en una célula de mamífero que posee la maquinaria de transcripción adecuada. El ARNm se aísla y se convierte en ADNc (ADN complementario). La secuencia de ADNc puede amplificarse por medio de la PCR para determinar su longitud. Si el segmento de ADN humano contiene un exón o varios, será más largo que si no lo(s) contiene.

Expresión del gen. Una vez aislado un gen en una región candidata, hay que confirmar que se trata de un gen que es responsable de una determinada enfermedad o fenotipo. Para ello no hay más que implantar ADN en el tejido en el que se quiera probar la función del gen y en el que el gen sea defectuoso y comprobar que las células recuperan su correcta funcionalidad.

¿Cuál es la mejor técnica en el estudio de la genética del asma?

No se puede decir que haya una técnica mejor que otra. Para empezar, dependerá del número de individuos de que se disponga y de si son sólo afectados, población general o familias con o sin parejas de hermanos. Además, el hecho de elegir de entrada un enfoque no quiere decir que no se pueda volver al otro, o que no puedan ser complementarios en un momento dado. Por ejemplo, se puede comenzar con una búsqueda amplia del genoma y por medio de un análisis del ligamiento localizar una región candidata, procediendo a un estudio detallado de dicha región, de nuevo mediante análisis de ligamiento, utilizando marcadores muy cercanos unos a otros. También se

puede tratar de identificar fenómenos de desequilibrio de ligamiento dentro de la región previamente identificada como candidata.

Otras estrategias para el estudio de la genética del asma

Loci comunes con otras enfermedades inflamatorias

Los estudios genéticos de otras enfermedades pueden ser de utilidad para entender la genética del asma. Tanto la enfermedad de Crohn como la colitis ulcerosa han mostrado segregación familiar, y las búsquedas amplias del genoma han encontrado regiones candidatas que podrían ser comunes con las del asma^{54,55}. Algo parecido podría ocurrir con la artritis reumatoide. Estos hallazgos sugieren que determinados genes principales podrían ser comunes a varias enfermedades inflamatorias.

Enfermedades de herencia mendeliana relacionadas con el asma

El asma está asociada a algunas enfermedades de herencia mendeliana. La identificación de los genes

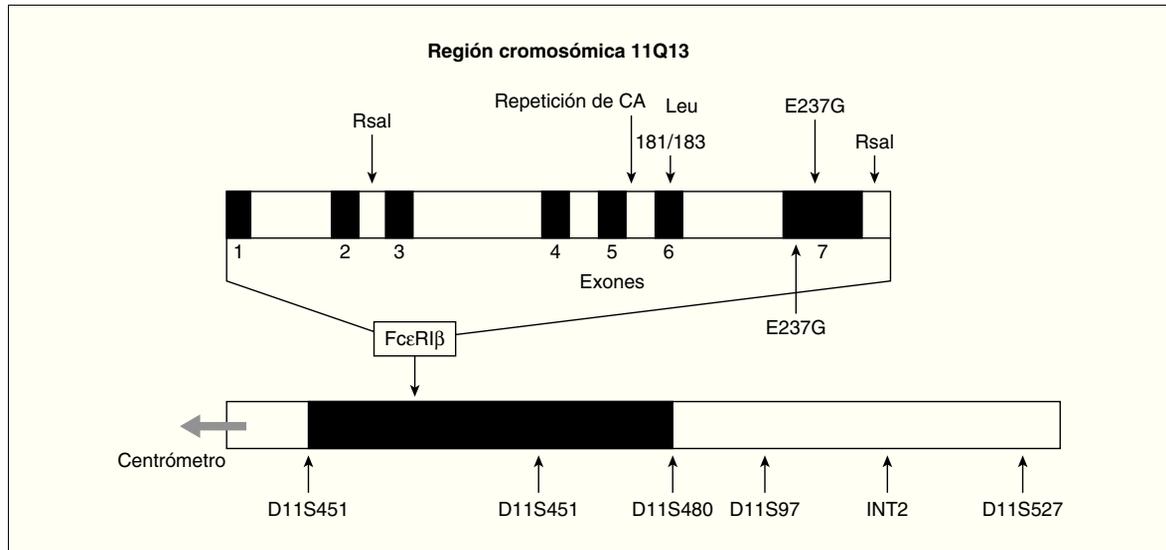


Figura 9. Detalle de la región del cromosoma 11 donde se sitúa el gen del receptor I para la IgE, que está formado por 7 exones. En la parte inferior se señalan los principales marcadores genéticos de la zona¹¹.

que causan esas enfermedades podría dar pistas sobre la herencia genética de la propia asma. Fundamentalmente se trata del síndrome de Job (hiper-IgE)⁵⁶ y el déficit selectivo de IgA⁵⁷. Ambas enfermedades comparten rasgos comunes con el asma, o al menos con algunos fenotipos de asma, como son la IgE en el caso del síndrome de Job y la alergia 3 veces más frecuente entre los afectados de déficit selectivo de IgA. El déficit selectivo de IgA se ha relacionado con el complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC)⁵⁸, mientras que el síndrome de Job se ha localizado en la zona distal del *cluster* de las citocinas del cromosoma 5⁵⁹.

REGIONES GENÉTICAS RELACIONADAS CON EL ASMA

Búsquedas amplias del genoma

El número de búsquedas amplias del genoma es, hasta el momento, reducido. Una de las primeras fue llevada a cabo en una población inglesa y australiana. Este estudio encontró ligamiento para algún tipo de marcador de asma en los cromosomas 4 (hiperreactividad bronquial, HRB), 6 (IgE, eosinófilos), 7 (IgE, HRB, eosinófilos), 11 (IgE, *prick*-test positivo), 13 (atopia) y 16 (IgE, HRB)⁶⁰. El Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA) es un estudio muy amplio (237 pares de hermanos), multicéntrico, que se está llevando a cabo en Estados Unidos. En él se ha descrito ligamiento entre un complejo fenotipo de asma y 6 regiones nuevas, en 3 razas distintas: 5p15 y 17p11 en afroamericanos, 11p15 y 19q13 en caucá-

cos, y 2q31 y 21q21 en hispanos. También se han ratificado 5 regiones que previamente habían mostrado ligamiento para el asma: 5q, 6p, 12q, 13q y 14q en caucásicos y 12q en hispanos⁶¹. En este mismo estudio se han encontrado nuevos ligamientos para la respuesta específica IgE a alérgenos inhalatorios comunes en los caucásicos (2q21-23) y en los afroamericanos (8p23-21), confirmando otros anteriores, como 6p21 y 13q23-24 en los caucásicos y 5q23-33 en los afroamericanos⁶². En la actualidad este estudio tiene reclutadas a 525 parejas de hermanos.

En Europa existen 3 búsquedas amplias del genoma. La primera es en una población holandesa de 200 familias con un individuo asmático⁶³ en el que se describe ligamiento en 7q (marcadores D7S820-D7S821) y se confirma en 5q31 (D5S666-D5S402) y 12q (PAH-D12S070). La segunda (Estudio Colectivo Alemán) se ha realizado en 97 familias alemanas y suizas que incluyen un total de 429 personas 156 parejas de hermanos²³. Sus resultados sitúan regiones candidatas en el cromosoma 2 (alrededor de D2S2298), en 6p21-23, en el cromosoma 9 (próximo a D9S1784), y en 12q13-21. Por último, el estudio francés Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma (EGEA), que incluye a 335 familias nucleares con al menos un afectado (123 padres y 212 niños con asma), ha encontrado ligamiento en 11p13 para la IgE, 12q24 para los eosinófilos y 17q12-21 para asma y pruebas cutáneas positivas. También ha confirmado ligamientos para regiones anteriormente descritas: 1p31 para asma, 11q13 para IgE, 13q31 para eosinófilos y 19q13 para HRB⁶⁴ (fig. 9).

En Japón existe un estudio del tipo mencionado que incluye a 47 familias con al menos 2 asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo. En éste se encontró ligamiento en 5q31-33 y, aunque menos, en 4q35 y 13q11⁶⁵. Además, se han hecho búsquedas en poblaciones aisladas, que tienen la ventaja de que la heterogeneidad del asma es menor, en hutteritas (comunidad de alemanes ancestrales con poca relación exterior y asentados en EE.UU.) y en finlandeses de una zona recóndita. En el primero de estos estudios^{66,67} se encontró ligamiento en 5q23-31, 12q15-24, 19q13 y 21q21 en un total estudiado de 361 individuos. Estas regiones ya habían sido localizadas en otros estudios. Identificaron, además, una nueva región en 3p24-22. En el estudio finlandés se ha encontrado ligamiento en 7p14-15 tanto para el asma como para concentraciones elevadas de IgE, o para los 2 fenotipos conjuntos⁶⁸.

Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de definir genéticamente las enfermedades complejas cuando se utilizan fenotipos no exactamente equivalentes y cuando se estudia a poblaciones diferentes, de etnias diferentes que se encuentran sometidas a diferentes factores ambientales.

A continuación se hace un recorrido rápido por las regiones candidatas más consistentes, elegidas bien por búsquedas amplias del genoma, bien por su relación con la síntesis y modulación de los mediadores de la inflamación asmática.

Regiones candidatas

Cromosoma 5

La región 31 del brazo largo del cromosoma 5 (5q31) ha sido estudiada por bastantes grupos tras la observación original de que existía un ligamiento de esta región con la IgE sérica total en familias Amish⁶⁹ y su confirmación posterior⁷⁰. Esta misma región ha mostrado ligamiento con los valores de eosinófilos⁷¹ y con la resistencia al esquisostoma⁷². Esta región (5q34) contiene varios genes que modulan mediadores de respuestas alérgicas como las IL-4, IL-13, IL-5, CD14 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte and macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF)⁵⁷ y se conoce como el *cluster* de la IL-4.

Sin embargo, el nivel de variación de la IgE debida a cualquiera de los polimorfismos de esta región es únicamente del 1 al 2%, de manera que los polimorfismos actualmente identificados no pueden ser de gran trascendencia para el proceso alérgico. Probablemente esta región, que contiene al menos 2 genes relacionados con la alergia, sea una zona reguladora de mediadores, fundamentalmente IL4, IL-13 e IL-5.

El gen del receptor β_2 -adrenérgico, fundamental en la regulación del tono broncomotor, se encuentra también en este cromosoma. Además de por su interés en la respuesta a los agonistas β_2 -adrenérgicos en el curso del tratamiento del asma, se ha encontrado ligamiento para la IgE y la HRB alrededor de la zona del gen de este receptor⁷³. Se descenderá a algunos detalles en el apartado dedicado a la farmacogenética.

Cromosoma 6

La región del MHC en el cromosoma 6 ha mostrado consistentemente ligamiento con fenotipos de asma en varios estudios^{23,60-62,66}, lo que hace suponer que es un *locus* principal en relación con el asma.

Se sabe que los genes de la clase II del MHC influyen en la capacidad de respuesta a determinados alérgenos⁷⁴⁻⁷⁶. Por lo tanto, el asma relacionada con esta respuesta alérgica puede estar relacionada a su vez con este grupo de genes. A su vez, los genes del receptor del linfocito T (*T cell receptor*, TCR) que se encuentran en los cromosomas 7q y 14q parecen ser modificadores de la respuesta IgE^{77,78}. Por su parte, los genes de la clase I del MHC podrían tener efectos importantes en la respuesta alérgica, pero no han sido investigados adecuadamente⁵⁷.

Los genes menos clásicos del MHC también podrían tener una relación con el asma a través de vías no alérgicas. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (*tumoral necrosis factor*, TNF) es una citocina proinflamatoria muy importante que se encuentra aumentada en la vía aérea de los asmáticos. Se ha descrito un polimorfismo en el complejo TNF que se asocia a la variabilidad de la expresión del TNF- α y con la presencia de asma^{79,80}. Esto subraya la naturaleza inflamatoria de la respuesta asmática, independiente de su base alérgica⁵⁷.

Cromosoma 11

El gen del receptor de la cadena β de la IgE (Fc ϵ RI- β) (fig. 9) se ha localizado en la región 11q13^{81,82}. Un polimorfismo en esa zona se ha relacionado con atopía⁸³, asma⁸⁴ e hiperreactividad bronquial^{85,86} y con la dermatitis atópica grave⁸⁷.

Tanto el ligamiento genético como la asociación de la atopía al *locus* han mostrado un efecto materno muy fuerte, con ligamiento preferente de la transmisión de alelos maternos al niño asmático. Este fenómeno, denominado impronta genética, se encuentra con frecuencia en otras enfermedades de origen genético. Los efectos maternos sobre las enfermedades alérgicas en general, y sobre el asma en particular, suelen ser mayores que los del padre en los estudios epidemiológicos. Por ejemplo, según los datos del

ISAAC en España, el riesgo de padecer asma ocasional se incrementa tanto cuando el padre es asmático como cuando lo es la madre, y en una magnitud parecida (*odds ratio* [OR] = 1,67; $p < 0,05$). Sin embargo, el riesgo de padecer asma clínicamente significativa sólo se relaciona con asma en la madre (OR = 2,22; $p < 0,05$), pero no en el padre (datos sin publicar).

Cromosoma 12

La facilidad con la que múltiples estudios han encontrado ligamiento en el brazo largo del cromosoma 12 (12q) hace suponer que esta región debe contener al menos un gen principal de la alergia⁵⁷. La cartografía detallada de esta zona ha comenzado ya⁸⁸ y se espera que pronto sea posible la clonación posicional. Este cromosoma tiene regiones candidatas relacionadas con la síntesis de interferón- γ (IFN- γ), factor de crecimiento de mastocitos (MCG) y la forma principal de la sintetasa del óxido nítrico (NOS1).

Cromosoma 20

Fruto de las búsquedas amplias del genoma, se ha encontrado en el brazo corto de este cromosoma recientemente el gen *ADAM33* (que codifica la proteína ADAM33, una metaloproteínasa). El ligamiento con esta zona es máximo en asmáticos con hiperreactividad bronquial y mínimo en los que tienen IgE elevada. El gen *ADAM33* se expresa en el músculo de cualquier tipo, y las proteínas ADAM se han implicado en múltiples procesos, incluyendo la proteólisis de la matriz extracelular^{9,20,89}, lo que podría tener implicaciones en los procesos de remodelamiento que se producen en el asma.

En la tabla 2 se presenta un resumen de las regiones candidatas más importantes en el asma.

FARMACOGENÉTICA DEL ASMA

Conceptos de farmacogenética y farmacogenómica

Cualquier clínico con alguna experiencia sabe que no todos los enfermos reaccionan de la misma manera a un medicamento concreto. Aparte del distinto cumplimiento, muchas veces responsable de esta diversidad de respuestas, estas diferencias se deben a las diferentes capacidades de metabolización o de respuesta de cada persona. El estudio de las modificaciones genéticas de las respuestas humanas a los agentes farmacológicos (tanto adecuadas como adversas) se conoce como farmacogenética¹⁸.

La farmacogenómica es la utilización de técnicas genéticas para el diseño de nuevos fármacos. En vez del planteamiento tradicional de probar miles de sus-

TABLA 2. Principales regiones candidatas en el asma

Zona	Gen candidato	Función
5q34	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Interleucinas proinflamatorias
	GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
	Receptor β_2	Broncodilatación
6p	HLA	Presentación de antígenos
6p21.3	TNF- α y β	Factor de necrosis tumoral
7q	TCR- α	Receptor del linfocito T
11q13	Fc ϵ R1 β	Receptor IgE alta afinidad
12q14	IFN- γ	Interferón gamma
12q24	NOS1	Sintetasa 1 del NO
14q11.2	TCR- α	Receptor del linfocito T
20p	<i>ADAM33</i>	Metaloproteínasa

tancias para identificar agonistas o antagonistas de receptores, la farmacogenómica pretende aprovechar los 30.000 genes del genoma humano que pueden codificar proteínas que podrían ser puntos de partida para el desarrollo de fármacos. Sin el conocimiento previo de la función de estas proteínas, la farmacología clásica no puede avanzar. La farmacogenética pretende identificar los genes potencialmente importantes sin conocer la función de las proteínas que son codificadas por ellos. La manera de hacerlo es averiguar qué genes se encuentran activados o silenciados en determinados tejidos en situaciones patológicas en comparación con situaciones de normalidad⁹⁰.

Polimorfismos y enzimas metabólicas

Los efectos de la variación de las enzimas del metabolismo de los fármacos pueden encontrarse en todos los grupos étnicos y con una diversidad de preparaciones farmacológicas. Así, por ejemplo, en algunos pacientes con un determinado polimorfismo de la acetilación hepática, el metabolismo de la isoniazida es muy lento en comparación con los individuos que no poseen este polimorfismo.

Recientemente se han descrito algunos polimorfismos que tienen una gran repercusión en el metabolismo hepático de los fármacos. Los polimorfismos de la isoenzima CYP2D6 del citocromo P450 pueden afectar a unos 30 fármacos, entre los que se incluyen los β_2 -adrenérgicos^{91,92}. Es posible que con el tiempo se realice un cribado sistemático de los enfermos, especialmente si pertenecen a etnias determinadas, antes de comenzar tratamientos con determinados fármacos. De hecho, ya existen en el mercado, en Estados Unidos y en Escandinavia, algunos chips de ADN para el análisis genotípico instantáneo de los alelos del citocromo P450⁹³.

TABLA 3. Selección de genes cuyos polimorfismos pueden tener relación con la respuesta al tratamiento del asma⁹⁰

Gen	Localización	Fármaco afectado
Receptor β_2 (<i>ADBR2</i>)	5q31.32	Agonistas β_2
5-LOX (<i>ALOX5</i>)	10q11.12	Inhibidores de la 5-lipooxigenasa (zileutón), antagonistas CysLT ₁ (montelukast)
Receptor M ₂ (<i>CHRM2</i>)	7q35.36	Antagonistas muscarínicos (bromuro de ipratropio)
Receptor M ₃ (<i>CHRM3</i>)	1q43.44	Antagonistas muscarínicos (bromuro de ipratropio)
GR (<i>GRL</i>)	5q31	Glucocorticoides
PDE ₄ A (<i>PDE4A</i>)	19p13.2	Teofilina
PDE ₄ D (<i>PDE4D</i>)	5q12	Teofilina
<i>CYP450</i>	Varios	Montelukast, salmeterol, budesonida, teofilina

5-LOX: 5 lipooxigenasa; CYP450: citocromo P450; GR: receptor de los glucocorticoides; PDE: fosfodiesterasa.

Aunque los polimorfismos que afectan al metabolismo de los fármacos merecen una investigación exhaustiva, hay que tener en cuenta que las verdaderamente importantes son sólo las que afectan al individuo en el grado suficiente como para que sean clínicamente significativas. Debe tenerse en cuenta que los polimorfismos dentro de los genes humanos son muy frecuentes, hasta el punto de que aproximadamente 1 de cada 1.000 pares de bases (púricas o pirimidínicas) dentro de regiones codificadoras son polimórficas. Sin embargo, debido a la existencia de dobles o triples sistemas de codificación de los aminoácidos (redundancia), no todo polimorfismo de un solo nucleótido provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de una determinada proteína. Es muy probable que la mayoría de los polimorfismos que puedan detectarse en relación con el metabolismo de los fármacos que se emplean en el asma no tengan una gran importancia clínica⁹⁴.

Resumiendo, para que un polimorfismo sea importante desde el punto de vista de la farmacogenética deben darse las siguientes condiciones:

1. El fármaco se utiliza con frecuencia en la clínica.
2. Los efectos tóxicos y terapéuticos del fármaco son difíciles de separar y la dosificación adecuada es difícil de valorar desde el punto de vista clínico.
3. El destino del agente activo es muy dependiente de la vía metabólica variante (la que provoca el polimorfismo).

4. La frecuencia del polimorfismo en la población ha de ser razonablemente alta.

Polimorfismos importantes desde el punto de vista del tratamiento del asma

La investigación de los polimorfismos relacionados con el tratamiento del asma está aún dando sus primeros pasos y, hasta el momento, no muchos de ellos reúnen las condiciones enumeradas anteriormente. Por ejemplo, la sustitución del aminoácido treonina por isoleucina en la posición 164 del receptor β_2 -adrenérgico (Tre-Ile 164) es importante, pero poco frecuente. Los estudios *in vitro* demuestran que la variante Ile 164 tiene un acoplamiento muy reducido a los fármacos adrenérgicos y es predecible que los individuos homocigotos tengan una respuesta reducida a estos fármacos. Sin embargo, la frecuencia de este polimorfismo en la población caucásica es sólo del 3%⁹⁵, lo que resta importancia a este polimorfismo. Por el contrario, el polimorfismo arginina-glicina (Arg-Gly) 16 del receptor β_2 es bastante común en la población general⁹⁶. La forma glicina 16 muestra, *in vitro*, una disminución de la sensibilidad a los agonistas β_2 , y 2 estudios clínicos han puesto de manifiesto que los individuos homocigóticos para este polimorfismo muestran una respuesta reducida al tratamiento con estos fármacos^{97,98}.

Debe tenerse en cuenta, por otro lado, que la magnitud del efecto en estos estudios no fue demasiado grande y que otros estudios no han encontrado relación entre este polimorfismo y la gravedad del asma o el asma fatal⁹⁹. Sin embargo, la cuestión principal es si existe o no una reducción de la sensibilidad a los agonistas- β_2 en estos individuos, y si ésta es clínicamente importante; y esta cuestión aún no se ha dilucidado. Si resultara que sí existe una menor sensibilidad y ésta es clínicamente importante, entonces debería ser tenida en cuenta antes de iniciar ningún plan de tratamiento.

Otros polimorfismos que podrían tener importancia en cuanto al tratamiento del asma son los relacionados con la 5-lipooxigenasa, enzima crucial en la síntesis de leucotrienos. Parece que los individuos que presentan un determinado polimorfismo de una zona reguladora de la transcripción del gen de esta enzima, que se relaciona con una baja capacidad de transcripción, muestran una disminución de la respuesta a los inhibidores de la 5-lipooxigenasa (zileutón)¹⁰⁰. Sin embargo, no se sabe si este polimorfismo puede afectar a fármacos antagonistas competitivos de los leucotrienos como el montelukast o el zafirlukast. Aún existen otros polimorfismos relacionados con la farmacología que se está comenzando a estudiar, pero cuya repercusión es desconocida. La tabla 3 recoge

los genes y los fármacos antiasmáticos a los que podrían afectar¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

En resumen, hay genes cuyos productos son diana de algunos fármacos utilizados en el asma, que tienen polimorfismos y que, al menos algunos de éstos, probablemente tengan importancia clínica. Sin embargo, es muy probable que la importancia de cualquiera de estos polimorfismos, aun siendo mucha, sea menor que la que pueden tener los polimorfismos que afectan a las vías metabólicas, por ejemplo, hepáticas. La tecnología de los chips de ADN hará posible la detección rápida de los polimorfismos importantes, pero antes de ello, en los próximos años, la farmacogenética tiene la tarea de averiguar cuáles son estos polimorfismos.

INTERACCIÓN GENES-AMBIENTE Y GENES-GENES

Como ya se ha comentado al principio, los estudios con gemelos ponen de manifiesto que la heredabilidad del asma es de aproximadamente un 60%⁴¹⁻⁵², lo que quiere decir que el restante 40% depende del ambiente. Sin embargo, esto es una simplificación de la realidad. En la práctica, todos los individuos que padecen asma han recibido una exposición ambiental adecuada, y la totalidad de esos individuos están predispuestos genéticamente. Podríamos decir que es asmático quien puede, no quien quiere.

Un razonamiento parecido es el que lleva a decir que la genética no desempeña ningún papel en el aparente aumento del asma en los últimos 12 años, ya que no es posible que se haya producido un cambio genético en tan corto espacio de tiempo. Sin embargo, este incremento de la prevalencia de asma probablemente es debido a que un mayor número de individuos genéticamente predispuestos son expuestos a los factores ambientales adecuados en un momento específico de su desarrollo inmunitario¹⁰⁵. La ecuación, por tanto, tiene 3 variables: la predisposición genética, el estímulo ambiental y el momento de la interacción.

Un argumento interesante respecto a la importancia del medio ambiente lo tiene el hecho de que en más de un trabajo se ha puesto de manifiesto que el asma o la alergia en uno de los cónyuges es un factor de riesgo de que el otro cónyuge también presente asma o alergia¹⁰⁶. Por ejemplo, en un estudio realizado en Cartagena (datos sin publicar), la OR de que el padre tenga alergia autodescrita si la madre también la presenta es de 4,0 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 2,0-7,6), lo que es más alto que para que uno de los hijos la presente (OR = 2,9; IC del 95%, 1,5-5,6).

Modelos de la interacción genes-ambiente

Se han propuesto 3 modelos para la interacción genes-ambiente¹⁰⁵. Los estudios amplios del genoma

han puesto de manifiesto que existen varios *loci* que contribuyen a la aparición del asma. Si, por ejemplo, existieran 5 genes mayores que contribuyeran a la aparición del asma y todo el mundo recibiera la "dosis de ambiente" adecuada, el riesgo de padecer asma estaría directamente relacionado con el número de genes mayores que contienen el (los) polimorfismo(s) adecuado(s) que una persona hereda. Este modelo no encaja con los estudios actuales (p. ej., entre gemelos).

En el segundo modelo existiría un número pequeño de individuos que tienen polimorfismos en los genes mayores, de tal manera que si son (y sólo si son) expuestos a un estímulo ambiental, desarrollarán con casi total certeza la enfermedad. El riesgo de sufrir asma queda aquí casi totalmente en manos del ambiente. Tampoco este modelo encaja con la información de que se dispone.

Lo más probable es que la interacción genes-ambiente sea una combinación de los 2 modelos anteriores en la que exista un efecto dosis por parte de los genes y un efecto del mismo tipo por parte del ambiente. Acudiendo al ejemplo anterior, en el que se suponía que el asma se debía a polimorfismos en 5 genes mayores, la dosis del ambiente necesaria para provocar la enfermedad sería menor si se tiene sólo un polimorfismo que si se tienen los 5 necesarios. Si no existe ni uno de los polimorfismos adecuados, el individuo no presentará asma, no importa cuán grande sea la dosis del ambiente. En la práctica, la mayoría de la población tendría un número bajo o moderado de polimorfismos, lo que se considera una contribución tanto genética como ambiental.

Hay 3 formas de avanzar en el estudio de la interacción entre los genes y el ambiente. Los estudios de casos y controles proporcionan una estimación de la razón de las ventajas (OR) de estar afectado de asma teniendo en cuenta los estratos de diferentes fenotipos; los diseños de casos frente a casos es una alternativa interesante en la que se comparan los casos expuestos a un determinado ambiente con los que no están expuestos, basándose en el genotipo la definición de caso; por último, cabe usar el diseño de tríos caso-padres en los que se comparan los genotipos transmitidos a un hijo afectado con aquellos que éste no ha heredado (test de desequilibrio de la transmisión), y se estudian de acuerdo con los diferentes estratos de exposición al ambiente¹⁰⁷.

Una "ventana de oportunidad"

Además de la contribución de los genes y del ambiente, hay que tener en cuenta la tercera variable de la ecuación: el momento de la interacción. Algunos

autores sostienen que esa “ventana de oportunidad”¹⁰⁸ puede ser distinta según la enfermedad. Así, para el asma, ese período podría extenderse sólo a los primeros meses (quizá algunos años) de la vida, mientras que para la rinitis alérgica, esta “ventana” podría ser posterior. La interacción adecuada entre los genes y el ambiente (mezcla de factores de riesgo y protectores) durante esta época susceptible podría poner en marcha los mecanismos inmunológicos que impidieran la evolución del sistema inmunológico desde la tendencia Th2 fetal y proalérgica hacia la Th1 antiinfecciosa.

Genes de susceptibilidad y genes modificadores

Ciertas enfermedades genéticas causadas por mutaciones en un solo gen (fibrosis quística) exhiben una gran variabilidad intrafamiliar e interfamiliar. La variabilidad interfamiliar se puede explicar fácilmente por diferencias en el ambiente y por diferencias en el efecto de diferentes mutaciones en el mismo gen. Sin embargo, la variabilidad intrafamiliar, especialmente entre hermanos, es más difícil de explicar.

Actualmente cada vez hay más pruebas de la existencia de genes modificadores distintos de los genes de susceptibilidad, que son los que (hasta el momento) se han asociado al asma¹⁰⁹. Un ejemplo puede encontrarse en la diabetes insulino dependiente: no todos los afectados desarrollan nefropatía, pero el riesgo de que se produzca esta complicación aumenta el doble en parientes de afectados de este tipo de diabetes y que tienen nefropatía¹¹⁰. Simplificando, habría un gen de susceptibilidad que causaría la diabetes y un gen modificador que, al transmitirse en la misma familia, facilitaría la aparición de una complicación: la nefropatía.

CONCLUSIÓN

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la genética del asma, aún queda un largo camino que recorrer en una enfermedad que parece ser poligénica y muy dependiente del medio ambiente que rodea al individuo susceptible, y que lo puede ser en mayor o menor grado. Es probable que la genética contribuya a conocer mejor la enfermedad, con la definición de diferentes genotipos que podrían corresponder a los fenotipos conocidos. La farmacogenética se incorporará paulatinamente a la clínica y hará posible la identificación de los individuos mejor respondedores a los distintos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salter HH. On asthma: its pathology and treatment. London: John Churchill, ed., 1860.

2. Martínez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
3. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265:2037-48.
4. Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, Tanino Y, Jinushi E, Nishimura M. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:686-90.
5. Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999;14:892-6.
6. Panhuysen CI, Vonk JM, Koeter GH, Schouten JP, van Altena R, Bleecker ER, et al. Adult patients may outgrow their asthma: a 25-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1267-72.
7. Drazen JM, Yandava CN, Dube L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999;22:168-70.
8. Ulrik CS, Kok-Jensen A. Different bronchodilating effect of salmeterol and formoterol in an adult asthmatic. *Eur Respir J* 1994;7:1003-5.
9. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-30.
10. Palmer LJ, Daniels SE, Rye PJ, Gibson NA, Tay GK, Cookson WO, et al. Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1825-30.
11. Palmer LJ, Knuiman MW, Divitini ML, Burton PR, James AL, Bartholomew HC, et al. Familial aggregation and heritability of adult lung function: results from the Busseton Health Study. *Eur Respir J* 2001;17:696-702.
12. Buckova D, Izakovicova HL, Vacha J. Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 2002;57:446-8.
13. Wjst M. Specific IgE – one gene fits all? German Asthma Genetics Group. *Clin Exp Allergy* 1999;29(Suppl 4):5-10.
14. Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, Boner AL, et al. Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet* 1999;36:323-5.
15. Bellibas SE. The effect of human calcitonin gene-related peptide on eosinophil chemotaxis in the rat airway. *Peptides* 1996;17:563-4.
16. Xu X, Niu T, Chen C, Wang B, Jin Y, Yang J, et al. Association of airway responsiveness with asthma and persistent wheeze in a Chinese population. *Chest* 2001;119:691-700.
17. Klug WS, Cummings MR. Conceptos de genética. Madrid: Prentice Hall, 1999; p.195-7.
18. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Biochemical genetics: disorders of metabolism. En: Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL, editors. *Medical Genetics*. 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1999; p.136-55.

19. Rich SS. Analytic options for asthma genetics. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 1):84-7.
20. Bracken MB, Belanger K, Cookson WO, Triche E, Christiani DC, Leaderer BP. Genetic and perinatal risk factors for asthma onset and severity: a review and theoretical analysis. *Epidemiol Rev* 2002;24:176-89.
21. Rosenbaum PR, Rubin RD. The central role of the propensity score in observational studies for causal effects. *Biometrika* 1983;70:41-55.
22. Sandford A, Weir T, Pare P. The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1749-65.
23. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999;58:1-8.
24. Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1773-80.
25. Amelung PJ, Postma DS, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Exclusion of chromosome 11q and the CcpepsilonRI-beta gene as aetiological factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families. *Clin Exp Allergy* 1998;28:397-403.
26. Bleecker ER, Postma DS, Meyers DA. Genetic susceptibility to asthma in a changing environment. *Ciba Found Symp* 1997;206:90-9.
27. Chen Y, Schnell AH, Rennie DC, Elston RC, Lockinger LA, Dosman JA. Segregation analyses of asthma and respiratory allergy: the Humboldt family study. *Am J Med Genet* 2001;104:23-30.
28. Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martínez FD. Differences in familial segregation of FEV₁ between asthmatic and nonasthmatic families. Role of a maternal component. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:162-9.
29. Holberg CJ, Halonen M, Wright AL, Martínez FD. Familial aggregation and segregation analysis of eosinophil levels. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1604-10.
30. Holberg CJ, Elston RC, Halonen M, Wright AL, Taussig LM, Morgan WJ, et al. Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in Hispanic and non-Hispanic white families. A recessive component? *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:144-50.
31. Martínez FD, Holberg CJ. Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in Hispanic and non-Hispanic white families. *Clin Exp Allergy* 1995;25(Suppl 2):68-70.
32. Sampogna F, Demenais F, Hochez J, Oryszczyn MP, Macario J, Kauffmann F, et al. Segregation analysis of IgE levels in 335 French families (EGEA) using different strategies to correct for the ascertainment through a correlated trait (asthma). *Genet Epidemiol* 2000;18:128-42.
33. Schnell AH, Palmer LJ, Elston RC. Segregation analysis of asthma and respiratory allergy in population-based samples of families. *Genet Epidemiol* 2001;21(Suppl 1):S30-5.
34. Townley RG, Bewtra A, Wilson AF, Hopp RJ, Elston RC, Nair N, et al. Segregation analysis of bronchial response to methacholine inhalation challenge in families with and without asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:101-7.
35. Wang TN, Ko YC, Wang TH, Cheng LS, Lin YC. Segregation analysis of asthma: recessive major gene component for asthma in relation to history of atopic diseases. *Am J Med Genet* 2000;93:373-80.
36. Xu J, Levitt RC, Panhuysen CI, Postma DS, Taylor EW, Amelung PJ, et al. Evidence for two unlinked loci regulating total serum IgE levels. *Am J Hum Genet* 1995;57:425-30.
37. Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, et al. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 2000;67:1163-73.
38. Palmer LJ, Cookson WO, James AL, Musk AW, Burton PR. Gibbs sampling-based segregation analysis of asthma-associated quantitative traits in a population-based sample of nuclear families. *Genet Epidemiol* 2001;20:356-72.
39. Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971;26:249-85.
40. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1351-8.
41. Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG. Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:265-70.
42. Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 1991;48:873-9.
43. Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* 1991;100:70-5.
44. Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO, Tambs K. No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:43-9.
45. Duffy DL, Mitchell CA, Martin NG. Genetic and environmental risk factors for asthma: a cotwin-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:840-5.
46. Laitinen T, Rasanen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA. Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1073-8.
47. Huovinen E, Kaprio J, Laitinen LA, Koskenvuo M. Incidence and prevalence of asthma among adult Finnish men and women of the Finnish Twin Cohort from 1975 to 1990, and their relation to hay fever and chronic bronchitis. *Chest* 1999;115:928-36.
48. Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgaard T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J* 1999;13:8-14.
49. Clarke JR, Jenkins MA, Hopper JL, Carlin JB, Mayne C, Clayton DG, et al. Evidence for genetic associations between asthma, atopy, and bronchial hyperresponsiveness: a study of 8- to 18-yr-old twins. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2188-93.
50. Huovinen E, Kaprio J, Laitinen LA, Koskenvuo M. Social predictors of adult asthma: a co-twin case-control study. *Thorax* 2001;56:234-6.
51. Koeppe-Schomerus G, Stevenson J, Plomin R. Genes and environment in asthma: a study of 4 year old twins. *Arch Dis Child* 2001;85:398-400.
52. Strachan DP, Wong HJ, Spector TD. Concordance and interrelationship of atopic diseases and markers of allergic sensitization among adult female twins. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:901-7.

53. Stine OC, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Approaches to fine mapping in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28 (Suppl 1):98-100.
54. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
55. Parkes M, Satsangi J, Jewell D. Contribution of the IL-2 and IL-10 genes to inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility. *Clin Exp Immunol* 1998;113:28-32.
56. Davis SD, Schaller J, Wedgwood RJ. Job's syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet* 1966; 1:1013-5.
57. Cookson WO. Asthma genetics. *Chest* 2002;121:7S-13.
58. Hardwick LJ, Walsh S, Butcher S, Nicod A, Shatford J, Bell J, et al. Genetic mapping of susceptibility loci in the genes involved in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997;24:197-8.
59. Rioux JD, Stone VA, Daly MJ, Cargill M, Green T, Nguyen H, et al. Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33. *Am J Hum Genet* 1998;63:1086-94.
60. Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996;383:247-50.
61. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat Genet* 1997;15: 389-92.
62. Hizawa N, Freidhoff LR, Chiu YF, Ehrlich E, Luehr CA, Anderson JL, et al. Genetic regulation of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness: a genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through 2 asthmatic sibs. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:436-42.
63. Xu J, Bleecker ER, Jongepier H, Howard TD, Koppelman GH, Postma DS, et al. Major recessive gene(s) with considerable residual polygenic effect regulating adult height: confirmation of genomewide scan results for chromosomes 6, 9, and 12. *Am J Hum Genet* 2002;71:646-50.
64. Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, et al. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162: 1812-8.
65. Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000;66:152-60.
66. Ober C, Cox NJ, Abney M, di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, et al. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Mol Genet* 1998;7:1393-8.
67. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000;67: 1154-62.
68. Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, et al. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 2001;28:87-91.
69. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-6.
70. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, et al. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994;23:464-70.
71. Martínez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1739-44.
72. Marquet S, Abel L, Hillaire D, Dessein H, Kalil J, Feingold J, et al. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat Genet* 1996;14:181-4.
73. Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, et al. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1280-4.
74. Young RP, Dekker JW, Wordworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, et al. HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens. *Clin Exp Allergy* 1994;24:431-9.
75. D'Amato M, Scotto DA, Maggi E, Menna T, Sacerdoti G, Maurizio SM, et al. Association of responsiveness to the major pollen allergen of *Parietaria officinalis* with HLA-DRB1* alleles: a multicenter study. *Hum Immunol* 1996;46:100-6.
76. Donfack J, Tsalenko A, Hoki DM, Parry R, Solway J, Lester LA, et al. HLA-DRB1*01 alleles are associated with sensitization to cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:960-6.
77. Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, Schou C, Faux JA, Young RP, et al. Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses. *Lancet* 1994;343:1597-600.
78. Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Cookson WO. Germline TCR-A restriction of immunoglobulin E responses to allergen. *Immunogenetics* 1997;46:226-30.
79. Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, et al. Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:278-82.
80. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 1997;6:551-4.
81. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. The FcεRIβ subunit functions as an amplifier of FcεRIγ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996; 85:985-95.
82. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεpsilonRI. *Nature* 1999;402:B24-30.
83. Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, Le Souef P, et al. FcεpsilonRI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 1995;311:776-9.
84. Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Kawai M, Morimoto K, Hopkin JM. Association between FcεpsilonRI beta and atopic disorder in a Japanese population. *Lancet* 1996; 347:394-5.

85. Trabetti E, Cusin V, Malerba G, Martinati LC, Casartelli A, Boner AL, et al. Association of the FcεpsilonR1beta gene with bronchial hyper-responsiveness in an Italian population. *J Med Genet* 1998;35:680-1.
86. Van Herwerden L, Harrap SB, Wong ZY, Abramson MJ, Kutin JJ, Forbes AB, et al. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. *Lancet* 1995;346:1262-5.
87. Cox HE, Moffatt MF, Faux JA, Walley AJ, Coleman R, Trembath RC, et al. Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br J Dermatol* 1998;138:182-7.
88. Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, et al. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:485-91.
89. Howard T, Postma D, Jongepier H, Moore W, Koppelman G, Zheng S, et al. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:717-22.
90. Hall IP. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and airway disease. *Respir Res* 2002;3:10.
91. Oscarson M, Hidestrand M, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol Pharmacol* 1997;52:1034-40.
92. Dalen P, Dahl ML, Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:444-52.
93. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:342-9.
94. Hall IP. Pharmacogenetics of asthma. *Eur Respir J* 2000;15:449-51.
95. Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:334-9.
96. Dewar JC, Wheatley AP, Venn A, Morrison JF, Britton J, Hall IP. Beta2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy* 1998;28:442-8.
97. Tan S, Hall IP, Dewar J, Dow E, Lipworth B. Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 1997;350:995-9.
98. Martínez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest* 1997;100:3184-8.
99. Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, et al. Beta2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:787-91.
100. In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, et al. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 1997;99:1130-7.
101. Silverman ES, Drazen JM. Genetic variations in the 5-lipoxygenase core promoter. Description and functional implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: S77-S80.
102. Fenech AG, Ebejer MJ, Felice AE, Ellul-Micallef R, Hall IP. Mutation screening of the muscarinic M(2) and M(3) receptor genes in normal and asthmatic subjects. *Br J Pharmacol* 2001;133:43-8.
103. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:290-6.
104. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:144-51.
105. Hall IP. The genetics of asthma. Candidate gene approaches: gene-environment interactions. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 1):74-6.
106. Hippisley-Cox J, Coupland C, Pringle M, Crown N, Hammersley V. Married couples' risk of same disease: cross sectional study. *BMJ* 2002;325:636.
107. Beaty TH. Using association studies to test for gene-environment interaction asthma and other complex diseases. *Clin Exp Allergy* 1998;28(Suppl 1):68-73.
108. Von Mutius E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 2001;18:872-81.
109. Houlston RS, Tomlinson IP. Modified genes in humans: strategies for identification. *Eur J Hum Genet* 1998;6:80-8.
110. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996;39:940-5.
111. Blanco Quirós A, Castro J, Tellería JJ. Fundamentos biológicos y genéticos de la atopia y del asma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1998;26:59-73.