

Contribució a l'estudi genètic de les malalties complexes: Asma i Psoriasi a la població espanyola

T I G E B S F P S N V T J P D Q
T V S H T W N S O M Q E D R I M
S X E P N J E O H L V H L A T P
A Y C Q W L Q R I X L I O R A F
T Q O M A K I I R T Y E M U S S
S J E H I G V A S M A U N S T M
W W N N A R F S J Z A C E S H X
W I X V Y G R I X Q E X I D M P
K V C A L L E R G I E S A D A I
E Z E E N S T E O L B N H O E J
K U Z L F G D L P O S R T W O M
J X K Q C Z K M B E S T N R M X
B K J F E N O T I P S W D T N X
F Y C X B C W I T O X U W H Z D
L W N A K E E R Z E H Y K Q A Q
A A G B P T B B S O K T O J A D

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona



Contribució a l'estudi genètic de les malalties complexes: Asma i Psoriasi a la població espanyola

Memòria presentada per
Rafael F. de Cid Ibeas

Per optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció de Dra. Conxi Lázaro García i Dr. Xavier Estivill
Pallejà al Centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'Institut de Recerca Oncològica.
Hospital Duran i Reynals, Barcelona

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona
Programa de Biologia i Patologia Cel·lulars (bienni 1998-1999)
Tutor: Dr. Oriol Bachs

Conxi Lázaro

Xavier Estivill

Oriol Bachs

Rafael F. de Cid

Barcelona, desembre 2002

“Tots parlaven alhora, les seves veus insistents i contradictòries i impacients, fent d’allò que és irreal una possibilitat, després una probabilitat, després un fet incontrovertible, tal com fan els homes quan els seus desitjos esdevenen paraules.”

-W. Faulkner, *The Sound and the Fury*, 1929 -

La vida es una tómbola

- Marisol, *Tómbola*-

Agraïments

Als dos directors del treball.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS98/0977) i la Unió Europea CEC/BIOMED2 (BMH4-CT97-2486).

A l'associació d'afectes de Psoriasi "Acció Psoriasi" i als clínics, sense la col·laboració dels quals hagués estat impossible començar aquest estudi.

Aquí, a més, vull fer públic el meu agraïment, que espero hagi sabut transmetre en el seu moment de forma privada a:

la *jefa* un altre cop.

els companys de feina, primer del Clínic i després de l'IRO, que m'han sofert i dels que he pogut gaudir (i aprendre).

els components del LabC, en totes les seves múltiples i variades fórmules, que han fet que el treball esdevingui un *divertimento* (o quasi, no exagerem).

I finalment, a els meus pares, a la meva companya i, als amics, els inclosos (molts) i aquells no inclosos en els apartats anteriors, simplement per ser-hi.

ABREVIATURES I SÍMBOLS

A	Adenina
θ	Fracció de recombinació
C	Citosina
cM	CentiMorgan
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DGGE	Electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant
EST	Marcador de seqüència expressada (de l'anglès <i>Expressed Sequence Tag</i>)
FEV1	Volum expiratori forçat del primer segon
FVC	Capacitat vital forçada
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (de l'anglès <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>)
G	Guanina
HD	Heterodúplex
HLA	Antígens leucocitaris humans (de l'anglès <i>Human Leucocyte Antigens</i>)
HRB	Hiperresposta bronquial
IBD	Idèntic per descendència (de l'anglès <i>Identity By Descendent</i>)
IBS	Idèntic per estat (de l'anglès <i>Identity By State</i>)
IL-N	Interleucina-N
Khi	Prova khi quadrat
IgEs	Immunoglobulines de tipus E
LOD	Logaritme en base 10 de la probabilitat de lligament (de l'anglès $\log_{10} OD$)
LD	Desequilibri de Lligament
Mb, Kb, pb	Megabase, kilobase, parell de bases
NPL	<i>Lod score</i> no paramètric (de l'anglès <i>Non-Parametric Lod score</i>)
MHC	Complex Major d'Histocompatibilitat
mM, μ M, pM	Milimolar, micromolar, picomolar
OR	Raons de probabilitat (de l'anglès Odds ratio)
<i>p</i>	Nivell de significació (<i>p value</i>)
PAC	Cromosoma artificial derivat de P1 (de l'anglès <i>P1 Artificial Chromosome</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QTL	<i>Loci</i> de tret quantitatiu (de l'anglès <i>Quantitative Trait Loci</i>)
RR	Risc Relatiu
RAST	Test radioactiu d'al·lèrgen adsorbit (de l'anglès <i>Radioallergosorbent test</i>)
RFLP	Polimorfismes de fragments de restricció de longitud polimòrfica (de l'anglès <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
SSCP	Polimorfisme de conformació de cadena senzilla (de l'anglès <i>Single Strand Conformational Polymorphisms</i>)
SPT	Test cutani de punxada (de l'anglès <i>Skin Prick Test</i>)
SNP	Polimorfisme de canvi de nucleòtid (de l'anglès <i>Single nucleotide polymorphisms</i>)
STR	Polimorfismes de curtes repeticions en tàndem (de l'anglès <i>Short Tandem Repeat polymorphisms</i>)
SpIgEs	Immunoglobulines de tipus E específiques
T	Timina
TCR/BCR	Receptor de cèl·lules T/B (de l'anglès <i>T/B cell receptor</i>)
TDT	Test de Desequilibri de Transmissió
UTR	Regió no traduïda (de l'anglès <i>Untranslated region</i>)
VNTR	Polimorfisme de número variable de repeticions en tàndem (de l'anglès <i>Variable Number of Tandem Repeat Polymorphisms</i>)
YAC	Cromosoma artificial derivat de llevat (de l'anglès <i>Yeast Artificial Chromosome</i>)

Introducció xi

Malalties comunes, Malalties complexes 1

Estimació del component genètic	2
Definició del fenotip en els estudis genètics	2
Mesura de la contribució genètica	2
Mapatge	3
Anàlisi genètica en malalties complexes	4
Anàlisi de lligament genètic	4
Anàlisi d'associació al·lèlica	6
Cerca genòmica	7
Altres consideracions en els estudis genètics	7

Psoriasi 9

Manifestacions clíniques	9
Formes clíniques de la psoriasi	9
Malalties relacionades amb la psoriasi	10
Epidemiologia	11
Mortalitat i morbiditat de la malaltia	11
Anatomia i fisiologia de la pell	11
Queratinització: formació de l'estrat corni	13
Patofisiologia de la psoriasi	13
Etiopatogènia	15
Contribució genètica a la psoriasi	16
Estudis de lligament genètic	16
Gens candidats	20
Gens candidats de la regió 6p21	20
Gens candidats a 1q21	22
Estudis d'expressió	22
Models animals de psoriasi	25

Asma 11

Fenotips intermedis	12
Síntomes respiratoris i funció pulmonar	12
Hiperresposta bronquial, atòpia i asma	12
Classificació de l'asma	13
Epidemiologia de l'asma	14
Prevalença	14
Mortalitat i severitat: increment de la prevalença	16
Factors de risc de l'asma	16
El fenotip asma en els estudis genètics	17
Malalties obstructives relacionades	18
Malaltia pulmonar d'obstrucció crònica	18
Anatomia i fisiologia dels bronquis	19
Patofisiologia de l'asma	21

Inflamació	21
Al·lèrgia	22
Hiperresposta bronquial	22
Limfòcits. IgEs	23
Poblacions de cèl·lules T	23
Funció efectora de les IgEs: receptors d'IgEs	24
Receptors de citocines	25
Models murins d'asma	25
Contribució genètica a l'asma	25
Heretabilitat de l'asma	26
Atòpia	26
Hiperresposta bronquial	27
Estudis de lligament	27
Cromosoma 11	27
Cromosoma 5	28
Cromosoma 12	28
Cromosoma 13	29
Cromosoma 6	29
Gens candidats	29
Receptors d'antígens de cèl·lules T	29
Serpines: α -1-antitripsina i α -1-antiquimotripsina	31
Receptors d'IgEs: Fc ϵ RI i Fc ϵ RII	31
Clara Cell 16: CC16	32
Cluster 5q	32
Gens candidats en regió 6p21	34
Receptors d'IL-4, IL-13 i IL-9	35
Cerques globals del genoma	36
Regions candidates en els models animals	37
F ibrosi quística i asma	37
Patologia de FQ: tracte respiratori	37
CFTR	38
Mutacions al gen CFTR	40
Mutacions en patologia no FQ	43

Objectius 69

Resultats

Anàlisi dels gens de predisposició a psoriasi	
Obtenció d'un banc de material genètic	77
Descripció clínica dels pacients	77
Diferències clíniques entre tipus I i tipus II	81
Anàlisi genètica de lligament	83

Anàlisi de las regiones de predisposición a la psoriasis en la población española: evidencia de un gen principal implicado en la psoriasis en la región 6p21. (<i>Medicina. Clinica</i> . 2001; 117:49-51).	85
Addenda.	
Anàlisi sota patrons d'herència complexa	87
Anàlisi del locus <i>PSORS1</i>	93
Estudi mutacional del gen <i>TCF19</i>	97
Estudi d'associació al·lèlica	99
Coding haplotypes analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC <i>PSORS1</i> locus. (<i>Human Molecular Genetics</i> 2002: Vol. 11, No.5, 589-597).	101

Anàlisi dels gens de predisposició a asma

Obtenció d'un banc de material genètic (DNA) de pacients / famílies amb asma

Descripció clínica dels pacients	105
Descripció dels fenotips emprats en l'estudi genètic	107

Regió cromosòmica 5q31

Association study of proposed candidate genes/regions in a population of Spanish asthmatics. <i>European Journal of Epidemiology</i> 16: 745-750	107
Gen del receptor β 2-adrenèrgic (<i>ADRB2</i>)	113
Gen del receptor de Lipopolisacàrid (<i>CD14</i>)	115

Regió cromosòmica 6p21

Gen de Limfotòxina α (<i>Ltα</i>) i del Factor de necrosi tumoral (<i>TNF</i>)	117
---	-----

Regió cromosòmica 16q

Gen de la cadena α del receptor d'interleucina 4 (<i>IL4Rα</i>)	119
--	-----

Regió cromosòmica 19p13

Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> (2000) 161: 700-706	125
Addenda Gen candidat <i>FCRE2</i>	127

CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator gene*)

Missense Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in	
---	--

Adult Patients with Asthma. <i>Human Mutation</i> :1999 14:510-519	129
<i>CFTR</i> and asthma in the French EGEA study. <i>European Journal of Human Genetics</i> : 2001 67-9.	131

Different role for <i>Cystic Fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR)</i> variants in childhood asthma patients. <i>Sotmés a Clinical Experimental Allergy</i> , octubre 2002	133
---	-----

A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the <i>Cystic fibrosis transmembrane regulator gene</i> in normal individuals. <i>Human Genetics</i> (2000) 106: 172-178	135
--	-----

Enquesta a portadors de mutacions a <i>CFTR</i>	137
---	-----

Discusió

Psoriasi

La presentació juvenil està associada amb HLA-Cw*6	141
--	-----

Identificació de <i>PSORS1</i> com a locus de predisposició	142
---	-----

Caracterització dels loci *PSORS*

Herència del locus <i>PSORS1</i>	143
Efecte patern de <i>PSORS1</i>	144
Lligament amb <i>PSORS3</i>	144
Interacció entre <i>PSORS1</i> i <i>PSORS3</i>	145

Gens candidats a la regió <i>PSORS1</i>	147
---	-----

Corol·lari	150
------------	-----

Asma

Gens candidats i asma

Receptor d'IL4 i nivells d'IgEs	153
<i>FCER1</i> i <i>FCER2</i>	154
<i>ADRB2</i>	156
Eosinofília i CD14	157
CD14 en adults	159
TNF i atòpia cutània	160
Receptor de cèl·lules T	161

Corol·lari	161
------------	-----

CFTR i asma

Síntomes respiratoris en portadors de mutacions a <i>CFTR</i>	163
---	-----

Variants de <i>CFTR</i> en pacients amb asma	164
--	-----

Mutacions o variants. Anàlisi en població general i població control	162
Variants de <i>CFTR</i> en asma. Un efecte modificador de l'asma	163
Corol·lari	169
Conclusions	171
Annex 1	
Metòdes	175
Extracció de DNA	
Anàlisi de SSCPs/HD	
Establiment de línies cel·lulars	
Obtenció de Metafases	
Triatge mutacional de <i>TCF19</i>	
Anàlisi de <i>CDSN</i>	
Anàlisi de <i>POU5F1</i>	
Anàlisi de <i>HLA-Cw6</i>	
Anàlisi de microsatèl·lits	
Anàlisi de <i>CFTR</i>	
Anàlisi de <i>ADRB2</i>	
Anàlisi de <i>TNF</i>	
Anàlisi de <i>Ltα</i>	
Anàlisi de <i>CD14</i>	
Anàlisi d' <i>IL4-Rα</i>	
Annex 2	
Qüestionaris de símptomes respiratoris en portadors, qüestionari <i>Psorigen</i> i qüestionari <i>Asmagen</i>	181
Annex 3	
Taula de variants identificades a <i>CFTR</i>	191
Referències	
Programes d'anàlisi genètica utilitzats	199
Bases de dades electròniques	200
Bibliografia	201

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1	4	Taula 21	78
Marcadors genètics emprats en el mapatge genètic		Descripció de la mostra d'individus	
Taula 2	17	Taula 22	78
Funció dels principals mediadors immunològics en la psoriasi		Descripció de les característiques dels pacients	
Taula 3	19	Taula 23	79
Patrons d'herència proposats per l'herència de la psoriasi		Característiques clíniques dels pacients amb psoriasi	
Taula 4	21	Taula 24	82
<i>Loci</i> de predisposició a psoriasi no confirmats		Edat mitjana d'aparició de la malaltia segons les característiques clíniques de psoriasi	
Taula 5	25	Taula 25	88
Característiques de les lesions en els models animals de psoriasi		Resultats de l'anàlisi de múltiples punts de la regió 6p21	
Taula 6	27	Taula 26	87
Criteris diagnòstics de l'asma segons l' NHLBI		Resultats de l'anàlisi de dos punts de la regió 6p21	
Taula 7	30	Taula 27	89
Classificació de l'asma segons els criteris de l' NHLBI		Resultats de l'anàlisi de la regió 6p21 per grups d'edat	
Taula 8	33	Taula 28	89
Factors de risc pel desenvolupament de l'asma		Valors de penetració per als heterozigots segons els grups d'edat	
Taula 9	36	Taula 29	90
Tipus cel·lulars presents a la paret bronquial		Valors de penetració per als heterozigots segons herència paterna	
Taula 10	39	Taula 30	90
Funcions de les citocines i quimocines rellevants a la progressió de l'asma		Valors de penetració per als portadors de Cw*6	
Taula 11	41	Taula 31	91
Família de proteïnes STAT i activadors específics		Resultats interacció <i>loci PSORS</i>	
Taula 12	43	Taula 32	93
Models d'herència per a l'asma		Resultats de l'anàlisi de parelles d'afectes per SimIBD	
Taula 13	46	Taula 33	97
Resultats de lligament a les regions 11q, 5q, 12q i 13q		Distribució al·lèlica de les variants de <i>TCF19</i>	
Taula 14	52	Taula 34	98
Variants gèniques d' <i>IL4RA</i>		Distribució per genotips de les variants de <i>TCF19</i>	
Taula 15	53	Taula 35	99
Estudis de lligament realitzats en models murins d'asma		Distribució al·lèlica de les variants de <i>HLA-C</i> , <i>POU5F1</i> i <i>CDSN</i>	
Taula 16	59	Taula 36	100
Distribució mundial per regions de les mutacions més freqüents de <i>CFTR</i>		Resultats de l'anàlisi d'haplotips estimats de les variants HLA-Cw*6, <i>POU5F1</i> +2 i <i>CDSN</i> +1243	
Taula 17	60	Taula 37	100
Mutacions i variants descrites en els principals estudis de ABAP		Mesures de desequilibri de lligament (D') entre els marcadors a 6p21	
Taula 18	61	Taula 38	108
Mutacions a <i>CFTR</i> descrites en pacients amb malalties respiratòries		Característiques de la mostra d'individus del grup de Barcelona amb asma adult	
Taula 19 a,b	62	Taula 39	109
Estudis de cerca global del genoma en psoriasi			
Taula 20a, b, c	64		
Estudis de cerca global del genoma en asma			

Característiques de les mostres d'asma infantil i del grup de famílies amb asma

Resum de les seqüències encebadors utilitzats i les condicions optimitzades per l'anàlisi de SSCP/HD dels fragments de *CFTR*

Taula 40	113
Freqüències genotípiques de la variant de <i>ADRB2</i> , Gly16Arg	
Taula 41	115
Freqüències genotípiques de les variants <i>CD14-159 C/T</i> i <i>CD14+1433 G/C</i>	
Taula 42	117
Freqüències genotípiques de les variants <i>TNF-308</i> i <i>Lta*NcoI</i>	
Taula 43	118
Resultats de l'anàlisi d'haplotips de les variants <i>TNF-308</i> i <i>Lta*NcoI</i>	
Taula 44	119
Freqüència al·lèlica dels <i>SNPs</i> d' <i>IL4Ra</i> analitzats en les mostres de pacients i individus controls	
Taula 45	120
Freqüència genotípica dels <i>SNPs</i> d' <i>IL4Ra</i> analitzats en les submostres de pacients amb asma i al·lèrgia	
Taula 46	121
Concentracions d'IgEs sèriques en els grups de pacients	
Taula 47	122
Freqüència dels haplotips de l'exó 11 d' <i>IL4RA</i> .	
Taula 48	122
Freqüència i mitjana d'IgEs dels haplotips d' <i>IL4RA</i> observats en els grups de pacients i controls	
Taula 49	127
Freqüència al·lèlica dels marcadors a 19p13	
Taula 50	127
Resultats d'associació al·lèlica dels marcadors a 19p13	
Taula 51	137
Descripció i freqüència de les mutacions reportades en l'enquesta a portadors de mutacions de <i>CFTR</i>	
Taula 52	178
Seqüència dels encebadors emprats en l'anàlisi de <i>TCF19</i>	
Taula 53	179
Condicions d'anàlisi de SSCP/HD per a <i>TCF19</i>	
Taula 54	180

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1	11	Concentracions d'IgEs totals (UI/ml) en sèrum per genotips de l'I14-R	
Placa eritoescamosa de psoriasi			
Figura 2	12	Figura 24	148
Lesions de psoriasi en les típiques àrees de distribució en la pell		Esquema de la regió crítica de <i>PSORS1</i>	
Figura 3	14	Figura 25	158
Tall transversal de la pell		Esquema de la regió 5q31	
Figura 4	16	Figura 26	164
Tall transversal de seccions de pell no afectada i afectada de psoriasi		Distribució de les mutacions en l'estructura genòmica de <i>CFTR</i>	
Figura 5	23	Figura 27	166
Mapa de la regió crítica <i>PSORS1</i> en 6p21		Distribució de les mutacions en els dominis de <i>CFTR</i>	
Figura 6	29		
Relació entre els fenotips intermedis d'asma.			
Figura 7	31		
Prevalença observada en asma (síntomes) adulta i infantil en població espanyola i diverses poblacions.			
Figura 8	35		
Estructura de les vies aèries.			
Figura 9	38		
Esquema de les principals cèl·lules implicades en el procés patològic de l'asma			
Figura 10	40		
Desenvolupament de la resposta Th2			
Figura 11	41		
Principals vies implicades en la síntesi i regulació de les IgEs			
Figura 12	51		
Esquema de les regions HLA i no HLA en la regió 6p21			
Figura 13	55		
Model dels dominis proposats per a <i>CFTR</i> .			
Figura 14	57		
Sumari de les alteracions produïdes en les vies respiratòries per un defecte en <i>CFTR</i>			
Figura 15	79		
Freqüència que es localitzen les lesions de psoriasis			
Figura 16	81		
Freqüència de pacients segons la distribució corporal de les lesions en pacients portadors i no portadors del l'al·lel <i>Cw*6</i>			
Figura 17	97		
Posició dels canvis detectats en la seqüència de <i>TCF19</i> en l'anàlisi de SCCP/HD			
Figura 18	99		
Representació de les mesures d'equilibri de Hardy-Weinberg en la regió 6p21			
Figura 19	116		
Esquema de la disposició cromosòmica dels gens <i>Lta</i> i <i>TNF</i>			
Figura 20	119		
Representació de les mesures d'equilibri de Hardy-Weinberg entre les variants del gen de l' <i>IL4RA</i>			
Figura 21	120		
Relacions d'associació al·lèlica entre els diferents parells de marcadors de l'exó 11 del gen de l' <i>IL4RA</i>			
Figura 22	121		
Concentració mitjana d'IgEs totals (UI/ml) en el sèrum en els grups d'individus analitzats			
Figura 23	122		

INTRODUCCIÓ —————

Malalties comunes, Malalties complexes

La majoria de les malalties comunes humanes tenen una prevalença elevada a la població general, i encara que de moltes es coneix (o intueix) una base genètica, pocs gens n'han estat associats, i encara menys n'han estat directament involucrats com a causants. La majoria de les 9000 malalties d'origen genètic descrites en humans (*Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM, 2002) presenten un patró d'herència mendeliana, principalment de caràcter monogènic. Aquestes malalties, anomenades malalties mendelianes clàssiques, sovint comporten un efecte molt dràstic en l'individu, però són molt poc freqüents en la població general (<0,01%). Les malalties comunes, en oposició, presenten un patró d'herència complex i efectes menys dràstics en el pacient, però, afecten a una part molt important de la població significant un greu problema de salut pública. Exemples de malalties complexes són la dislèxia, l'epilèpsia, l'Alzheimer, l'esquizofrènia, la diabetis, els trastorns d'ansietat, l'asma i la psoriasi, entre d'altres.

La base genètica de les malalties comunes és poligènica i multifactorial. La interacció entre els diferents gens és variable, podent ser tant additiva com multiplicativa, a la qual cosa s'ha de sumar a més l'efecte dels factors ambientals sobre l'expressió dels gens i la seva interacció. La relació entre la genètica i el fenotip no és simple, en part degut a l'heterogeneïtat genètica que és present tant a nivell de *locus*, com d'al·lels, i en part degut a l'efecte pleotròpic de moltes d'aquestes variants. En oposició al concepte de gen causant, lligat a la idea de l'herència mendeliana, a cadascun dels gens implicats se'ls anomena gens de predisposició, distinció que, encara que artificial, permet remarcar el caràcter contribuïdor, comparable al de qualsevol dels altres factors generals de risc descrits per a la malaltia. Tradicionalment, segons la seva contribució individual al risc de la malaltia es distingeix entre *poligens*, gens que contribueixen d'igual forma amb petits efectes, *gens majors*, gens que tenen una acció predominant sobre els altres *loci* (o *gens menors*), i *oligogens*, amb efectes intermedis (Morton 1998).

Altres característiques, comunes amb les malalties monogèniques clàssiques, com la presència de mosaïcisme (germinal i somàtic), herència mitocondrial, expressivitat i penetració variable (edat, sexe, etc.), interaccions gèniques, efecte ambiental, fenocòpies, etc., estan presents en l'herència d'aquests gens de predisposició, sent un factor de complexitat afegit en el patró d'herència de les malalties comunes o complexes.

Estimació del component genètic

Definició del fenotip en els estudis genètics

En l'anàlisi genètica d'una malaltia el primer pas és la definició del tret a estudiar, definició que ha de ser de fàcil reproducció i validació. El coneixement de les bases genètiques permet una millor comprensió dels caràcters essencials del fenotip i, de forma recíproca, ajuda en el refinament de la definició, en un procés gradual i progressiu. En general les malalties comunes es caracteritzen per una gran variabilitat fenotípica, la qual cosa dificulta l'establiment d'una definició clara. La inclusió de variables com l'edat d'aparició de la malaltia, diferències en el fenotip clínic, anàlisi dels individus amb història familiar o l'ús de fenotips severos de la malaltia milloren la definició del fenotip en els estudis genètics (Lander i Schork 1994). De forma alternativa es pot recórrer a l'estudi dels fenotips intermedis de la malaltia.

La majoria dels trets associats amb les malalties comunes són de caràcter quantitatiu. Aquests, a diferència dels trets discrets (qualitatius), presenten una distribució continua a la població dificultant l'establiment d'un llindar patològic, que en determinar-se de forma arbitrària pot no reflectir cap realitat biològica.

Mesura de la contribució genètica

Un cop establert el fenotip més idoni (global o intermedi), el següent pas és la determinació i quantificació del component o base genètica. Aquest es pot posar de relleu de diverses formes: observant l'agregació familiar, mesurant el risc familiar, en estudis de bessons o mitjançant estudis de segregació.

Agregació familiar

La presència de múltiples afectes en una genealogia és una característica comuna de moltes de les malalties complexes. Aquesta agregació familiar és una indicació important d'una base genètica però no suficient, ja que altres components no genètics (ambientals, ètnics i culturals) poden estar en la base d'aquesta observació.

Heretabilitat i Risc de recurrència familiar

Aquests són dos paràmetres que permeten mesurar el component genètic. L'heretabilitat (h^2) mesura la part de la variabilitat present en la malaltia deguda a un factor genètic. Generalment les estimacions es fan a partir del

grau de correlació entre parelles de familiars (de 1er, 2n, o 3er grau), i el seu valor oscil·la entre $h^2=0$, en els casos de malaltia no genètica deguda a factors ambientals, i $h^2=1$, en el cas de determinació genètica del 100%.

El risc de recurrència familiar (λ_R) és un paràmetre que permet quantificar la intensitat de l'efecte genètic i mesurar la facilitat per identificar-lo; com més alt sigui el risc, més alt és el component genètic, i més fàcil és d'identificar-lo. El risc de recurrència (λ_R) es defineix com la relació de la prevalença entre un grup de parents R (germans, pares, fills, oncles, etc...) respecte a la prevalença en la població general G ($\lambda_R=f_R/f_G$). El valor més utilitzat és el de risc en germans (*siblings*) (λ_S). Un valor de risc superior a 2, és indicador d'un component genètic significatiu, però el seu significat depèn de la prevalença de la malaltia. Les malalties amb una freqüència elevada presenten generalment uns valors de risc més baixos.

L'estudi del patró de riscos en diferents grups familiars és una mesura més adient de l'etiologia genètica, que aporta informació suplementària sobre el número de gens implicats, el patró d'herència i el possible mode d'interacció gènica.

Estudis de bessons i de germans adoptius

Els estudis de germans permeten distingir l'efecte dels components genètics i ambientals d'una malaltia. Si els dos bessons són afectes es diu que hi ha concordança per al tret, en cas contrari es parla de discordança. L'estimació de les taxa de concordança entre bessons monozigòtics (MZ) i dizigòtics (DZ) permet quantificar el grau d'heretabilitat. D'altra banda, estimacions de la concordança entre bessons MZ crescuts junts o bé en ambients diferents i l'estudi de germans adoptius, permeten contrastar la importància relativa de l'ambient en la condició estudiada.

Tant en l'estudi de bessons com d'adopcions, és difícil obtenir una mostra d'una mida estadísticament adequada. Molts dels estudis són petits la qual cosa porta a resultats no significatius o esbiaixats, a més, diferències metodològiques com la forma de selecció de la mostra (població general o bé d'estudis dirigits) o els requisits que imposa les característiques especials de la malaltia (p ex. edat d'aparició, recurrència) condicionen les estimacions derivades.

Segregació familiar

Els estudis de segregació permeten obtenir evidència de l'acció gènica en l'agregació familiar. Aquests estudis es basen en el mètode estadístic de la màxima versemblança, estimant paràmetres associats al tipus d'herència (freqüència gènica, penetració, grau de dominància) que permeten construir un model probable, i identificar quin és el que millor s'ajusta a les dades observades. Les estimacions dels paràmetres associats amb el model d'herència són usades en el següent pas del procés d'anàlisi genètica (estudi de lligament genètic) (Farrer i Cupples 1998). Aquests models poden presentar un component mendelià clàssic (dominant o recessiu) o no-mendelià (com els models poligènics, mixtes) o poden ser purament ambientals (sense evidència genètica).

Mapatge

L'assignació d'un *locus* al genoma pot produir-se de forma casual, com és el cas d'associacions amb regions amb alteracions cromosòmiques (duplicacions, translocacions, delecions), o bé en casos on s'aprecia una comorbiditat amb una altra malaltia (relacionada o no) de la que sí es coneix la posició genòmica. Aquestes aproximacions encara que de forma puntual poden donar molta informació, són limitades i no permeten la cerca gènica d'una manera independent.

La cerca independent de regions del genoma lligades a un tret fenotípic ha estat possible pel desenvolupament de marcadors anònims (en principi no relacionats amb el gen) del genoma. Però no ha estat fins a la darrera dècada que el desenvolupament de marcadors genètics molt potents ha permès la seva aplicació en la cerca aleatòria en tot el genoma.

Marcadors i mapes de marcadors

Qualsevol caràcter amb herència mendeliana pot ser usat com a marcador genètic. Aquest només ha de tenir determinades característiques per poder ser eficient: ser altament informatiu, fàcilment identificable i reproduïble a partir de material de simple obtenció.

Els tipus de marcadors genètics utilitzats han variat de la mà dels avenços de la genètica molecular (taula 1), primant la seva informativitat, el seu número i la ràpida detecció. La informativitat d'un marcador fa referència a la capacitat de produir meiosis informatives. Una meiosi es diu que és informativa si permet identificar un fenomen de recombinació a la família;

totes les meiosis de pares homozigots, i la meitat de les produïdes pels pares heterozigots idèntics, produeixen meiosis no informatives. La informativitat es valora amb dos paràmetres; el *valor d'heterozigositat* d'un marcador, que mesura la probabilitat que un individu triat a l'atzar sigui heterozigot, i amb el *contingut informatiu del polimorfisme* (PIC), que és una mesura més restrictiva, on es té en compte la pèrdua d'informació resultant del creuament entre dos pares heterozigots idèntics, els valors absoluts de PIC són sempre una mica més baixos que els d'heterozigositat.

Els marcadors es disposen ordenats en mapes del genoma que permeten la localització del *locus* associat a la malaltia estudiada en referència a ells. Principalment es poden distingir dos tipus de mapes de marcadors: mapes genètics i mapes físics.

Els mapes físics representen la distància física entre dos *loci*, normalment expressada en parell de bases (pb) (distància real) o en el cas dels mapes físics de radiació en centiRai (cR) (distància estimada). Aquests es basen en la freqüència de trencament per radiació induïda en línies d'híbrids cel·lulars, i l'equivalència amb la distància real en pb depèn del nivell de radiació. Altres mapes físics estan basats en *STS*, *YACs* o directament la seqüència, on s'ordenen els diferents fragments per encavalcament.

Els mapes genètics mesuren la fracció de recombinació entre dos *loci* en funció de la distància i la probabilitat d'un fenomen de recombinació entre ells; les unitats de mapa estan quantificades com el percentatge de recombinació (θ) o centiMorgans (cM) (1cM és la unitat bàsica distància genètica (w), equivalent a l'1% de recombinació).

Per a una fracció de recombinació petita (<10%), l'estimació de la fracció és equivalent a la distància física, de manera que la freqüència de recombinació és additiva en distàncies curtes, però no en les distàncies llargues on mai pot excedir el 50% (meitat de gàmetes recombinants). L'ajust de la freqüència de recombinació a la distància genètica és fa mitjançant correccions matemàtiques denominades funcions de mapa. Aquestes, poden considerar la presència de fenòmens d'interferència (I) entre els processos de recombinació (efectes positius i negatius). Les més emprades són la funció de *Haldane* (no té en compte la interferència) i la funció de *Kosambi* (considera la interferència) (Ott 1999).

Taula 1**Marcadors genètics emprats en el mapatge de malalties humanes**

Tipus de marcadors	<i>loci</i> (n)	característiques	
Grups sanguinis (1910-1960)	20	difícil detecció	baix polimorfisme
Variants de mobilitat electroforètica (1960-1975)	30	difícil detecció	baix polimorfisme
HLA (1970-)	1	molt informatiu	només 1 <i>locus</i> a 6p21.3
RFLP (1975-)	>10 ⁵	fàcil detecció; <i>Southern</i> , PCR	baixa heterozigositat (Max; 0,5)
VNTR			
minisatèl·lits (1985-)	>10 ⁴	fàcil detecció; <i>Southern</i>	alta heterozigositat
microsatèl·lits (1989-)	>10 ⁵	fàcil detecció; pcr multiplex	localització principal a telòmers
SNP (1998-)	>10 ⁶	distribució arreu del genoma	
		fàcil detecció; hibridació en placa, espectrometria (HPLC)	baixa heterozigositat
		distribució arreu del genoma	

Les funcions de mapa són essencials en l'anàlisi de lligament de múltiples punts per a convertir les fraccions de recombinació observades en distància genètica, però en general els mapes genètics són poc eficients en el mapatge de distàncies inferiors a 2 cM.

La relació entre el mapa genètic i el físic no és igual en els dos sexes ni tampoc al llarg del genoma. El mapa genètic de la dona és un 10% més gran que el de l'home, a més, la distribució de la freqüència de recombinació és més freqüent en els telòmers en el cas dels homes, i en els centròmers en les dones. De forma general s'assumeix que 1cM equival a 1 Mb, encara que en el cas dels homes equival a 1,05 Mb i a 0,70 Mb en les dones. Basant-se en aquestes diferències els mapes genètics poden assumir una recombinació igual o bé poden presentar les diferències específiques per sexe.

En l'apartat de "Bases de dades electròniques" de la secció de Referències, s'han indicat les adreces electròniques on es localitzen alguns dels mapes genètics més emprats en el mapatge genètic.

Anàlisi genètica en malalties complexes

Els estudis de mapatge genètic es basen en el fenomen de la recombinació meiótica, el qual és examinat de diverses formes per determinar la distància genètica entre dos *loci* (p.ex., marcador-malaltia, marcador-marcador). La probabilitat de recombinació entre dos *loci* és funció de la distància física que els separa, com més a prop siguin més probable serà que es transmetin de forma conjunta, de manera que és més probable que dos individus afectes de la mateixa família comparteixin els mateixos al·lels o fragments cromosòmics. Partint d'aquest supòsit, els estudis de mapatge genètic estan dirigits a posar de manifest si algun al·lel (*locus* malaltia o un *locus* proper) s'hereta conjuntament amb el fenotip estudiat, o bé alguna variant al·lèlica està present amb una freqüència alterada respecte a l'esperada per atzar en la població general.

A grans trets els mètodes de mapatge es poden agrupar en mètodes de lligament genètic i mètodes d'associació al·lèlica.

Anàlisi de lligament genètic

S'anomena lligament genètic, quant dos al·lels en dos *loci* segreguen de forma conjunta dins d'una família. La forma més senzilla de localitzar un gen, és examinar de quina forma es transmeten els haplotips de pares a fills. Amb l'observació directa dels fenòmens de recombinació es pot localitzar el gen en una reduïda regió en un mapa meiótic de trencament. Però, l'heterogeneïtat genètica, la penetració variable, el genotipat incomplet o la manca de part de l'estructura familiar, dificulten aquesta aproximació, per la qual cosa

s'ha de recórrer a l'ús de mètodes estadístics d'estimació de probabilitats.

En l'anàlisi de malalties comunes, els estudis de segregació donen una idea de quin és el model d'herència de la malaltia, però sovint és difícil definir un model potent, de manera que és necessari realitzar aproximacions estadístiques que no requereixin l'assumpció de cap patró predeterminat d'herència. En base a aquesta necessitat, es distingeix entre mètodes de lligament genètic dependent de model genètic (també anomenats paramètrics) i mètodes independents de model genètic (anomenats no paramètrics).

Mètodes dependents de model genètic

Aquests mètodes d'anàlisi requereixen la definició d'un model d'herència i la dels paràmetres associats com la freqüència al·lèlica, taxa de mutació, penetració i grau d'heterogeneïtat genètica. Generalment es fa referència a aquests mètodes com anàlisi de *lod score*.

El *lod score* (LOD; acrònim de l'anglès *log odds*) és un estadístic que expressa la probabilitat que un tret cosegregui amb un marcador. Matemàticament és el logaritme del quocient entre la probabilitat que segreguin de forma lligada (hipòtesi nul·la) respecte la possibilitat que ho facin de forma independent, no lligada (hipòtesi alternativa). Els valors de LOD poden ser positius o negatius, i un valor superior a 3 (raó de probabilitat de lligament vs no lligament de 1000:1) està establert com a indicador de la localització del *locus* malaltia (lligament) mentre que valors inferiors a $LOD = -2$ són indicatius de no lligament (Morton 1995).

Les probabilitats de lligament per a cada família es poden multiplicar, i el LOD es pot sumar en totes elles, de forma que els resultats en un gran nombre de famílies poden ser acumulats per augmentar les evidències.

L'anàlisi de *lod score* es pot realitzar valorant de forma independent cada marcador genètic en relació al *locus* problema (generalment *locus* malaltia), és el que s'anomena anàlisi de dos punts (*two-point analysis*), o bé aprofitant la informació de més d'un marcador, anàlisi de múltiples punts (*multipoint analysis*). En el primer cas, es compara la probabilitat de lligament respecte no lligament entre un únic marcador i el *locus* malaltia, considerant diferents fraccions de recombinació possible (distància genètica des de $\theta=0$ a 0,5). En el cas de l'anàlisi de múltiples punts es parteix d'un mapa de marcadors, i s'analitza de forma seqüencial la posició

(amb diferents fraccions de recombinació) del *locus* malaltia respecte dos marcadors contigus al llarg del mapa, amb la qual cosa es guanya informativitat i s'obté una major eficiència en l'anàlisi (Xu et al. 1998) (Ott 1999).

El càlcul de l'estadístic LOD es pot realitzar mitjançant diferents aproximacions matemàtiques, les quals determinen el tipus de famílies que poden analitzar de forma eficient el programari (*software*) d'anàlisi genètica. Així doncs, els mètodes que consideren tots els *loci* al mateix temps (Elston i Stewart 1971) són adients per a l'estudi de grans genealogies, però amb pocs marcadors, mentre que els mètodes que consideren tots els membres de la família (Lander i Green 1987) són adequats per a l'estudi de molts marcadors però en famílies de mida reduïda.

Mètodes independents de model genètic

Aquests mètodes no necessiten de l'especificació d'un model genètic predeterminat, encara que paràmetres com el nombre d'al·lèls, la freqüència al·lèlica i el mapa dels marcadors han de ser definits de forma prèvia. En alguns casos, mètodes paramètrics amb condicionants de penetració minimitzada, són comparables a mètodes no paramètrics; com és el cas del mètode de baixa penetració o "*affecteds-only*", àmpliament emprat com a substitut de mètodes no paramètrics.

El supòsit inicial d'aquesta aproximació és que si dos individus d'una família són fenotípicament similars, i existeix un condicionant genètic, els individus han de compartir marcadors genètics similars, prop del gen que contribueix al tret. La compartició o semblança depèn del grau de contribució del *locus* al tret estudiat i de la distància entre el *locus* i el marcador estudiat.

En aquests estudis, la compartició d'al·lèls pot ser formulada sense tenir en compte l'herència; el que s'anomena, al·lèls idèntics per estat (IBS), o bé si es té en compte l'herència i es pot determinar l'ascendència, al·lèls idèntics per descendència (IBD), això és, al·lèls iguals heretats d'un ascendent comú. La probabilitat que dos individus afectes comparteixin 0, 1 o 2 al·lèls IBS, depèn del nombre d'al·lèls del marcador, i la de compartir al·lèls IBD, del nombre d'al·lèls i del grau de relació familiar. El grau d'informació dels mètodes d'IBD és major ja que incorpora informació sobre l'herència de la mateixa regió, per descendència. Sota condicions de lligament, aquestes proporcions de

compartició varien, sent el que es posa a prova en les anàlisis de lligament.

El grau de compartició d'al·lels s'estima a partir de l'anàlisi dels membres de la família. Els mètodes més emprats utilitzen parelles de germans (mètodes de *sib-pairs*), encara que aquests mètodes han estat modificats per a incloure altres tipus de parelles amb un diferent grau de parentesc (mètodes d'*affected relative pairs*).

- ✓ Els mètodes de *sib-pairs*, es basen en l'estudi d'al·lels IBD, comparant el número de parelles de germans que comparteixen 0, 1 o 2 al·lels. Quan no es pot determinar l'IBD, hi ha mètodes d'estimació (com el denominat de *màxim likelihood score* (MLS)), que permeten emprar la informació d'altres membres de la família per estimar els valors de IBD en les parelles de germans, comparant la probabilitat de les dades sota determinades freqüències de compartició observades respecte el cas de no lligament. El resultat és un valor similar al LOD que també és additiu.
- ✓ Els mètodes d'*affected relative pairs* (ARP), comparen la compartició en més tipus de parelles de familiars. En algun cas s'analitza només l'IBS (mètode *affected pedigree member*, APM); i en altres l'IBD (SimIBD, *non parametric linkage*, NPL). L'anàlisi de lligament no paramètric (NPL), afegeix una millora als altres mètodes d'ARP, ja que a més de comparar parells de familiars, compara simultàniament tots els al·lels en tots els individus afectes i permet realitzar un estudi de múltiples punts.

Anàlisi d'associació al·lèlica

L'associació al·lèlica és en principi un concepte diferent al de lligament genètic; l'associació és la concurrència de dos al·lels, o d'un al·lel i la malaltia. L'anàlisi d'associació al·lèlica posa a prova la presència d'una diferència significativa (augment o disminució) de la freqüència d'un marcador al·lèlic en els individus afectes, respecte la població general. En absència de pressions externes (selecció, migració, mutació, deriva genètica) i sota condicions d'aparellament aleatori, la freqüència genotípica de qualsevol variant genètica es troba en l'anomenat equilibri de Hardy-Weinberg (HWE). L'alteració d'aquest equilibri és indicativa d'associació al·lèlica. Aquesta pot ser produïda per un efecte biològic directe del mateix al·lel, o bé degut a la

presència d'un *locus* proper, causant de la predisposició, amb el qual es diu que presenta desequilibri de lligament (LD, acrònim de l'anglès *linkage disequilibrium*).

El LD és una associació al·lèlica deguda a lligament entre dos *loci* molt propers. En aquests casos la possibilitat de fenòmens de recombinació entre ells és molt baixa, i tots dos *loci* són transmesos de forma conjunta, independentment de la família estudiada. Aquesta és la diferència principal de concepte respecte al de lligament; en aquell cas el fenomen de recombinació és un fenomen intrafamiliar.

El LD varia en funció del temps i de la distància entre els marcadors, quan més proper sigui el marcador al gen de la malaltia, més temps (mesurat com a generacions) persistirà l'associació en la població, per la qual cosa podem dir que l'extensió del LD depèn de la història del gen i de la població. Aquesta propietat permet emprar-lo en el mapatge de gens. De manera similar al lligament genètic que analitza els fenòmens de recombinació en famílies, el mapatge per LD (LDM), examina les conseqüències dels fenòmens de recombinació acumulats al llarg de la història de la població.

Tipus d'estudis d'associació al·lèlica

Pel seu disseny es poden diferenciar dos tipus d'estudis d'associació: els basats en una mostra poblacional i els basats en mostres de famílies.

Mostra poblacional. Es compara la freqüència al·lèlica d'un marcador en un grup d'individus afectes no relacionats (anomenats casos) i en un grup control d'individus no afectes i no relacionats (controls). De vegades la presència de múltiples subtipus poblacionals en una població suposadament homogènia pot produir associacions espúries. Per tal d'evitar-ho, els grups, generalment, estan aparellats per diferents factors de confusió (sexe, edat, hàbits, habitat, etc.).

Mostra de famílies. Utilitzen membres de la família com a controls "interns", reduint el problema de la possible estratificació en la mostra. Es poden distingir al menys tres estratègies diferents.

- ✓ Analitzar germans no afectes com a població control.
- ✓ *Haplotype relative risk test* (HRR) en el que es defineix l'haplòtip transmès a la descendència

afecta com a “cas” i el que no és transmès, com a “control” (Falk i Rubinstein 1987).

- ✓ Test de desequilibri en la transmissió TDT (de l'anglès *Transmission Disequilibrium Test*). En aquest test es posa a prova les vegades que un al·lel és transmès per un pare heterozigot a la descendència afecta (casos) contra les que no és transmès (control) (Spielman i Ewens 1996).

Cerca genòmica

La relativa facilitat amb la que es pot efectuar un tipatge amb múltiples marcadors ha portat en els darrers anys a l'establiment de la cerca genòmica com una de les primeres aproximacions en la cerca de factors de predisposició genètica. Des del punt de vista de l'estratègia de partida, el mapatge de gens es pot diferenciar en *cerca aleatòria (o global)* i *cerca dirigida*.

En la cerca aleatòria del genoma, el que es coneix en anglès com a *genome wide search*, no es parteix de cap concepció determinada sobre la natura del gen (o gens) implicat(s). Consisteix en el mapatge global (per lligament o associació) dels gens implicats en la malaltia mitjançant l'ús de marcadors anònims situats al llarg de tot el genoma. La resolució del mapa depèn del tipus de marcadors utilitzats (generalment microsatèl·lits o SNPs) i varia des de valors menors d'1 cM fins a 20 cM. En canvi la cerca dirigida del genoma, consisteix en el que s'anomena estudis dels gens candidats (*candidate gene/region approach*), on els marcadors emprats estan concentrats en certes regions (o en gens específics) basant-se en una informació prèvia; ja sigui sobre la funció del gen (o gens) i la implicació en els processos fisiològics rellevants al tret estudiat, el que s'anomena candidats funcionals, o bé degut a evidències de lligament en altres estudis, el que s'anomena candidats posicionals.

Lligament i associació

Com ja s'ha esmentat, els estudis de cerca genòmica es poden realitzar, segons uns criteris de lligament o de desequilibri de lligament (associació). Els estudis basats en el lligament genètic tenen una potència limitada per al mapatge de malalties complexes. En contrast, els estudis d'associació són més eficients en la detecció de factors de risc més petits (Risch i Merikangas 1996; Risch 2000).

En els estudis de cerca global basats en lligament, la distància mitjana entre marcadors és entre 10-20 cM, i de forma general consisteixen en STRPs. En oposició, en el mapatge basat en associació la resolució

del mapa necessària per detectar LD s'ha estimat en 3 kb, per la qual cosa seria necessari el tipatge de 500.000 SNPs (Kruglyak 1999). Les limitacions per a estendre al mapatge global del genoma la utilitat que aporta el LD en el mapatge fi de zones candidates, s'ha vist superat per la ràpida descripció d'aproximadament 1.000.000 SNPs al llarg de genoma, i les eines tècniques pel tipatge de grans quantitats de marcadors (*microarrays* i espectrometria). L'ús de poblacions específiques, pot reduir la resolució del mapa i el número de SNPs necessaris (Boehnke 2000). Actualment però, l'estratègia més plausible es centra en l'estudi específic dels gens candidats, la qual cosa augmenta l'eficiència de l'anàlisi, l'estudi de candidats (ja sigui analitzant les variants de la zona codificant, o totes les variants del gen) (Cambien et al. 1999)

Altres consideracions en els estudis genètics

El procés de mapatge es basa en tres passes seqüencials: (a) tipar una sèrie de marcadors, (b) calcular un estadístic teòric de lligament i (c) identificar les regions del genoma en les que el valor de l'estadístic presenti una desviació significativa d'allò esperat en condicions de no lligament, és a dir, que presenten significació estadística. El mapatge genètic, especialment en el cas de les malalties complexes, ha esdevingut un problema estadístic. A continuació s'ha fet un breu comentari dels punts a tenir en compte en l'anàlisi genètica.

Significació

Els resultats de lligament es basen en la comparació d'hipòtesi de treball (no lligament vs lligament) mitjançant estadístics, els quals tenen associats uns determinats nivells d'error (tipus I, tipus II) que validen els resultats obtinguts: error tipus I (α), és la probabilitat d'obtenir falsos positius, això és, d'indicar que hi ha lligament en absència real d'aquest, i l'error tipus II (β), és la probabilitat de falsos negatius, és a dir, indicar que no hi ha lligament quan hi és present.

Tant la significació com la potència depenen de la mida de la mostra i de l'efecte del factor que es compara. De forma universal s'accepta un 5% de falsos positius (α), com a valor de significació d'un test estadístic. En els estudis de lligament de tipus paramètric de malalties mendelianes, un LOD de 3 (1000 oportunitats contra 1 que les dades observades siguin causades per lligament respecte no lligament) ha estat acceptat com l'indiar per afirmar la presència de lligament, i de fet, el baix nivell de falsos positius detectat a la pràctica certifica la seva utilitat (Risch 2000). Aquest valor de LOD correspon a

un nivell de significació real de 0,0001, molt més restrictiu que el 0,05% acceptat de forma universal.

En els casos de cerca aleatòria de tot el genoma la possibilitat de falsos positius s'incrementa de forma proporcional al número de marcadors analitzats. En el cas del valor LOD, una correcció pel número de marcadors eleva fins a valors de 5,5 el llindar teòric de significació del LOD (Ott 1999).

En els mètodes de compartició d'al·lels, la significació és expressada de forma diferent, com a p o valor de p (en l'anglès, *P value*), que mesura la probabilitat que les dades de lligament observades es reproduïen sota condicions de lliure transmissió (no-lligament). Es distingeix entre el valor de significació p d'un test (*pointwise p* o *p* nominal), com la probabilitat que per atzar el valor obtingut de lligament sigui superat, i valor p de múltiples tests (*genome wide p*) com la probabilitat que per atzar el valor obtingut sigui superat en algun punt del genoma. El valor acceptat és l'universal llindar del 5%.

Els resultats són avaluats de forma diferent depenent de l'aproximació realitzada. En general la rèplica en mostres independents és una prova de confiança. Però, per tal de donar uniformitat als resultats de lligament, s'han establert diferents categories, des de "valors suggestius de lligament", a "valors que confirmen el lligament" (Lander i Kruglyak 1995).

Donada la dificultat de distingir entre la significació dels nombrosos estudis que representen autèntics gens de predisposició, la combinació de les evidències és una eina que s'ha usat per al mapatge de gens en diferents formes; (a) la meta-anàlisi dels estudis, (b) les col·laboracions prospectives, on s'intenta uniformitzar el disseny de l'estudi i (c) les col·laboracions retrospectives, on es combina i es reanalitza la informació d'estudis independents.

En els estudis d'associació, el risc de falsos positius augmenta amb l'increment del número de tests realitzats, de forma que el nivell de significació es veu rebaixat de forma dependent del número de marcadors i d'al·lels testats o de proves independents realitzades. De forma general s'aplica la correcció de Bonferroni per evitar els possibles problemes ocasionats, on el valor p corregit (p_c) és $P_c = P / (n(m))$, on n és el número de marcadors i m el número d'al·lels del marcador.

Altres formes d'estimar la significació dels resultats no tenen en compte les correccions teòriques. Mitjançant els anomenats mètodes de simulació, es compara la probabilitat de les dades sota condicions de

lligament *versus* no lligament; el nivell de significació és aquell en el que els resultats en les rèpliques no superen el 5%. Existeixen diversos programes d'anàlisi genètica que permeten testar la fiabilitat de l'estudi (SIMLINK, SLINK, SIMULATE).

Mostra

Certs factors relacionats amb la mostra d'individus seleccionats, com el tipus de mostra, la forma de selecció, o les característiques estadístiques de la mostra, poden condicionar el resultat final d'un estudi.

Tipus de mostra

En general es poden distingir entre estudis basats en mostres formades per famílies, i mostres d'individus no relacionats de la població general. La utilitat d'un o altre tipus dependrà de molts condicionants: finalitat de l'estudi, accessibilitat, característiques de la població i de la seva història (aïllada, barrejada, etc), i de les característiques clíniques (edat d'aparició, heterogeneïtat fenotípica, etc.) i genètiques (heterogeneïtat genètica, tipus d'herència, penetració, etc.) de la malaltia. Generalment és útil realitzar estudis combinats.

L'estratègia de selecció de la mostra (*ascertainment*) introdueix un biaix que determina la consistència de l'estudi. Els criteris de selecció han de ser clarament precisats en els estudis, i han de ser tinguts en compte *a priori*. Aquests es poden basar en la selecció dels individus amb història familiar de la malaltia (p.ex., història de malalties al·lèrgiques amb asma, etc...), o bé simplement a partir de la definició d'un fenotip rellevant a la malaltia en una població general (p.ex., nivells d'IgEs). A més, depenent de la malaltia, la font de selecció de la mostra pot ser important; crides realitzades a partir d'associacions de malalts, en hospitals, en consultes privades o en serveis d'urgències, ja que poden modificar la composició fenotípica de la mostra, i el sentit de l'associació resultant.

Potència de la mostra

Es podria dir que la potència d'una mostra determina la probabilitat d'evidènciar un resultat positiu quan aquest és present. Els càlculs teòrics de la potència de la mostra es poden realitzar mitjançant estudis de simulació, que a més permeten establir quina és la informació que aporta el *pedigree*, i de quina manera pot incrementar-se amb un mostratge posterior.

La simulació d'estudis es basen en la n -repetició (rèpliques) d'una anàlisi de les dades generades a l'atzar en n -processos, sota determinats supòsits d'herència. Aquests processos són el mètode d'elecció en cas de

l'estudi de les malalties mendelianes en famílies, i assumint les seves deficiències pot ser usat en el cas de les complexes.

En el cas que s'usin mètodes no paramètrics (tant de lligament com d'associació), com aproximació simple s'empren estratègies com la simulació amb el supòsit de "baixa penetració o només afectes". Altres estimacions de la potència es basen en l'estimació del risc; es poden trobar tabulacions teòriques de la potència de la mostra per a l'anàlisi de *sib-pairs* (Hauser iBoehnke 1998) o per a l'anàlisi de TDT. En els estudis de cerca global de genoma, el càlcul de la potència també depèn de la resolució del mapa de marcadors (Elston et al. 1996).



Placa de psoriasi (Josep de Cid)

Psoriasi

La psoriasi va ser definida clínicament per primera vegada com una dermatosi crònica diferenciada al 1808 per R. William (*On cutaneous diseases*. Johnson, London), però la descripció més antiga d'una possible afecció de psoriasi ja està present en el recull de malalties del *Corpus Hippocraticum*. Aquest llibre atribueix a Hipòcrates la designació d'una malaltia dèrmica que anomenà *Psora* (del grec picor). Més de 2000 anys després encara es desconeix la seva causa i ens trobem amb solucions mèdiques tant pintoresques com recomanacions de “banys de sol i mar durant 4-6 hores al dia, repòs i relaxació durant quatre setmanes”. Evidentment hi ha altres tractaments més científics, però aquesta solució posa de manifest el desconeixement de les bases moleculars de la malaltia.

La psoriasi és una malaltia de la pell de caràcter crònic, que es caracteritza per la presència de pústules i de plaques eritematoescamoses de diferents mides (figura 1) i que es presenta amb recurrència d'una forma imprevisible (Christophers i Sterry 1993).



Figura 1

Placa de psoriasi amb l'aparença típica eritematosa i recoberta d'escates blanques. La psoriasi havia estat anomenada lepra blanca.

Els efectes poden ser incapacitants, però menys en determinats casos (eritrodèrmia exfoliativa i psoriasi pustulosa generalitzada) les lesions són asimptomàtiques i no presenten complicacions sistèmiques.

Manifestacions clíniques

La psoriasi es manifesta principalment a la pell en forma de plaques i, en menor mesura, de pústules. A més un 25% dels pacients presenten afecció ungular.

L'afecció ungular es presenta en formes lleus com a un puntejat sobre l'ungla (*pits*) o canvis en la coloració de les ungles, però pot arribar, en les formes pustuloses, a la pèrdua total de la placa ungular (onicolisi). Les pústules poden presentar-se en qualsevol tipus de psoriasi, normalment associades a moments d'intensa manifestació de la malaltia. Són de naturalesa no-infecciosa i es presenten envoltades d'una zona eritematosa intensa.

La localització de les lesions generalment és simètrica, presentant-se de forma predominant en els colzes, genolls, cuir cabellut i regió sacra, encara que qualsevol part del cos pot estar afectada (figura 2). La morfologia de les lesions és molt variable en forma i extensió, distingint segons la morfologia entre formes de psoriasi anular, numular, folicular, punctata, generalitzada, gyrata, guttata, etc.

El diagnòstic de la malaltia es realitza mitjançant l'exploració de les lesions; caracteritzades per la presència de regions eritematoses ben delimitades i cobertes de capes d'escates lliures fines i blanquinoses. El diagnòstic es pot confirmar mitjançant un raspap “metòdic” de la placa. Aquest consisteix en el raspap mecànic i seqüencial de la superfície afectada, i en primer terme porta al despreniment de les escates superiors (signe de la cera), i evidència d'un petit puntejat hemorràgic (signe d'Auspitz) que és característic de la psoriasi i té valor diagnòstic. Una altra característica que s'utilitza en el diagnòstic és l'evocació del “fenomen de Koebner”. Aquest consisteix en la formació de lesions noves en una àrea cutània aparentment normal com a conseqüència d'una irritació inespecífica (p.ex. picadures, abrasions, radiacions, cirurgia, tatuatges, etc.). Aquest fenomen es reproduïx entre un 20% i 50% dels pacients amb psoriasi, principalment durant la fase activa de la malaltia.

Formes clíniques de la psoriasi

Psoriasi vulgar (també anomenada estacionària crònica)

És la manifestació més freqüent. Es caracteritza per la presència durant llargs períodes de temps de plaques eritematoescamoses d'extensió variable que poden confluir, localitzades principalment en els genolls, colzes, cuir cabellut, regió lumbar i umbilical. Una forma especial de psoriasi vulgar, que no presenta descamació, és la psoriasi flexural (o invertida), que es localitza específicament en les regions dels plecs fexurals.

Psoriasi guttata (psoriasi eruptiva)

Es caracteritza per la presència de lesions petites (de 0,5 a 1,5 cm), que es presenten com puntejats independents que poden arribar a confluir, localitzades principalment a la part superior del tronc i la part proximal de les extremitats. Són freqüents en les formes d'aparició primerenca i és freqüent en nens i adults joves. Generalment s'associen a processos infecciosos.



Figura 2

Les imatges superiors il·lustren l'aparència de les lesions de psoriasi en les típiques àrees de distribució en la pell. Les tres imatges inferiors presenten les lesions ungulars. (adaptat de *Psoriasis*)

Eritrodèrmia psoriàsica

És un forma de presentació menys freqüent i es manifesta com un eritema predominant amb una descamació menys important que en el cas de la psoriasi vulgar. Afecta a tota la superfície corporal, inclosa la cara i les ungles. Pot presentar-se de forma gradual a partir de psoriasi vulgar o de forma brusca com a conseqüència de problemes amb el tractament farmacològic. L'elevada pèrdua per descamació i l'engruiment cutani pot produir una incapacitació de les articulacions, un augment de les infeccions, alteracions de la termoregulació i pèrdua de proteïnes. La seva manifestació va acompanyada de febre, malestar general i alteracions hidroelectrolítiques.

Psoriasi pustulosa

Es caracteritza per la presentació, de forma generalitzada o localitzada, en qualsevol part del cos (tret de la cara), de pústules estèrils d'una mida de 2 a 3mm.

La psoriasi pustulosa generalitzada (anomenada de von Zumbush) caracteritzada per l'aparició aguda de pústules a les zones eritematoses, es considera una variant aguda de la psoriasi. Aquesta forma va acompanyada d'importants efectes sistèmics en el pacient: febre, mal estat general, hipocalcèmia i leucocitosi.

La forma pustulosa localitzada es presenta en condicions de forma crònica i es localitza als palmells i les plantes: psoriasi palmoplantar de Barber i acrodermatitis continua de Hallopeau. A diferència de la forma generalitzada, no presenta símptomes sistèmics.

Malalties relacionades amb la psoriasi

Artritis psoriàsica

L'artritis psoriàsica pertany a un grup d'afeccions inflamatòries de caràcter seronegatiu amb susceptibilitat lligada a al·lels HLA de classe I entre les que es troben l'espondilitis anquilosant, artritis enteropàtica i la síndrome de Reiter. Entre un 8 i 10% dels pacients psoriàsics desenvolupen artritis (Winchester 1993), sent més freqüent en els individus amb psoriasi severa. Afecta principalment les articulacions de les extremitats superiors, principalment les mans. El 80% dels pacients presenten afecció a les ungles, mentre que només un 20-30% tenen lesions en plaques. La presència de lesions

cutànies no té relació amb l'evolució de l'afecció sinovial.

Altres malalties

La psoriasi presentar comorbiditat amb la malaltia inflamatòria d'intestí (malaltia de Chron i colitis ulcerosa) i amb infeccions amb el VIH (Mallon iBunker 2000). S'ha descrit un patró diferenciat de malalties associades en els pacients amb psoriasi, amb una menor prevalença de malalties al·lèrgiques de la pell i una major resistència a infeccions cutànies, a més d'una major prevalença d'altres malalties com diabetis, obesitat i malaltia de cor (Henseler iChristophers 1995).

Epidemiologia

La psoriasi afecta a l'1-3% de la població general, sense cap diferència entre homes i dones. Presenta una distribució universal encara que existeix una gran variació geogràfica en la prevalença. En general és més alta entre els individus caucàsics dels països nòrdics (5-10%) que entre els individus d'ascendència oriental o africana, sent rara entre les poblacions natives d'Amèrica (0-0,3%). Aquestes variacions impliquen tant, factors climàtics, geogràfics com racials (Krueger iDuvic 1994).

En la població espanyola la prevalença ha estat estimada entre 1,17%-1,43%, sense diferències respecte al sexe, sent més freqüent en la franja d'edat entre 20-50. Existeixen, però, petites variacions geogràfiques, sent més alta en la regió central seca que en la franja litoral (Ferrandiz et al. 2001).

Història natural

La majoria dels pacients desenvolupen les primeres lesions de psoriasi durant la tercera dècada de vida, encara que s'han descrit casos de presentació congènita i casos per sobre del centenari. En els homes s'ha documentat una presentació més primerenca que en les dones (Farber iNall 1974).

En psoriasi s'ha descrit dos patrons de presentació diferenciats; en un primer grup (tipus I) es presenta en edat primerenca amb una edat d'inici al voltant de 16-22 anys, mentre que el segon tipus (tipus II) (aproximadament 20% dels pacients) es presenta al voltant dels 55 anys. La forma d'aparició primerenca té una major component genètica, amb una important història familiar. La majoria dels pacients són positius

per a l'antigen HLA-Cw*6, i a nivell clínic les lesions tenen tendència a generalitzar-se i ser més severes que les formes d'aparició tardana (Henseler iChristophers 1985).

Els brots de psoriasi es poden desencadenar per l'acció de diversos factors de risc (Tagami 1997). Entre els factors ambientals que poden donar lloc a un brot psoriàtic hi ha traumatismes, fàrmacs (sals de liti, betabloquejants, corticoides, antipalúdics, antiinflamatoris no esteroideus (AINE), factors metabòlics com la hipocalcèmia, l'embaràs, canvis climàtics, estrès emocional i infeccions (per virus, bacteris i llevats).

Mortalitat i morbiditat de la malaltia

Fins el 1808 la psoriasi era confosa amb la lepra la qual cosa va portar a la foguera molt afectes de psoriasi durant el segle XIV (Fry 1988) (actualment aquesta confusió ha desaparegut i per fortuna la foguera ha deixat de fer-se servir com a mètode de curació). La psoriasi és una malaltia no mortal, que cursa amb una picor lleugera, encara que com ja s'ha dit poden presentar-se formes incapacitants i complicacions que en alguns casos condueixen a la mort. Es calcula que unes 400 persones moren anualment per complicacions en el curs de la malaltia. Menys en aquests casos, els principals problemes per al pacient són principalment estètics, psicològics i socials, derivats de l'aparença de les lesions.

La severitat es determina per l'extensió corporal de la lesió afectada. Es considera lleu si afecta menys de l'1% de la superfície (aprox. el palmell de la mà) amb plaques aïllades, moderada si afecta entre l'1% i el 10%, i severa si la superfície afectada es major del 10% i conté pústules. Existeix un índex de la severitat, anomenat PASI (de l'anglès *Psoriasis area and severity index*) que relaciona la mida, l'eritema, el gruix de la lesió i les escates presents a la zona afectada. L'índex té un valor màxim de 72, i es diferencia entre psoriasi lleu (PASI<10), moderada (PASI entre 10-50) i severa (PASI>50).

Anatomia i fisiologia de la pell

La pell és l'òrgan diana en la psoriasi i està constituïda per tres capes superposades, des de la superfície a la profunditat es distingeix en; epidermis, dermis i hipodermis (figura 3). A continuació es fa una descripció de les característiques estructurals i fisiològiques de la pell.

Epidermis

Està formada principalment pels queratinòcits els quals s'organitzen en capes (estrats): estrat germinal, estrat espinós, estrat granulós i estrat corni. Aquestes capes reflecteixen un estat específic en el procés de diferenciació.

Estrat germinal: format per una capa de cèl·lules cúbiques, amb nucli i totalment funcionals, és l'estrat més profund de l'epidermis que descansa sobre la lamina basal. Al citoplasma es presenten grànuls fagocitats de melanina i un gran nombre de filaments queratina (tonofilaments). Les cèl·lules presenten unions intercel·lulars de tipus desmosoma.

Estrat espinós: està format per múltiples capes de cèl·lules més aplanades, encara funcionals i amb un gran nombre d'interdigitacions i unions intercel·lulars (desmosomes puntuals). Les cèl·lules contenen un número important de tonofilaments agrupats en forma de petites fibril·les, disposades de forma paral·lela a la superfície cel·lular amb cúmuls de melanina fagocitats.

Estrat granulós: està compost per poques capes de cèl·lules, de morfologia aplanada i amb un nucli en degeneració. El número d'interdigitacions i unions intercel·lulars és menor, i al citoplasma es poden observar grànuls queratina modificada (queratohialina), juntament amb la xarxa de tonofibril·les.

Estrat corni: és l'estadi final de diferenciació i es caracteritza per la presència de múltiples capes de cèl·lules aplanades, amb una membrana cel·lular molt densa, sense digitacions ni nucli i amb el citoplasma ocupat per fibres queratina. Dintre de l'estrat corni es pot diferenciar entre la part més profunda, anomenat estrat *lúcid*, i a la part superior, format per l'estrat *compactum* i *disjunctum*, amb una capacitat de descamació diferent.

A part dels queratinòcits, es troben melanòcits i cèl·lules de Langerhans, així com terminacions nervioses lliures o especials com els corpuscles de Merkel.

- Melanòcits, es troben a la capa germinal, en una proporció variable (1/4-12 queratinòcits). Són cèl·lules actives amb la funció principal de protecció contra la radiació solar. En el seu citoplasma s'identifiquen els cossos d'acumulació de la melanina (melanosoma i promelanosoma), que son transportats a l'exterior de la cèl·lula i són fagocitats pels queratinòcits envoltants, que actuen com a

dipòsits de melanina a la pell. No presenten unions intercel·lulars amb els queratinòcits, però sí llargues prolongacions entre ells.

- Cèl·lules de Langerhans, són cèl·lules especialitzades del sistema immune que tenen la funció de presentació antigènica, són les cèl·lules presentadores de la pell. Es localitzen principalment en l'estrat espinós.

Dermis i Hipodermis

La dermis és subjacent a l'epidermis i està formada principalment per teixit conjuntiu. Es distingeix entre la zona papil·lar, formada per teixit conjuntiu lax amb moltes cèl·lules i fibres molt fines, i la zona reticular, molt més densa. A la part superior s'organitza en forma d'evaginacions dèrmiques, denominades papil·les dèrmiques, intercalades amb crestes epidèrmiques (figura 3). En aquesta capa es troben abundants vasos sanguinis, limfàtics, cèl·lules musculars llises, fibres estriades, i terminacions nervioses lliures o especialitzades (corpuscles de Meissner, Pacini, etc.). També es troben diversos annexos epidèrmics que penetren des de l'epidermis: glàndules sudoríferes, sebàcies, foliculs pilosos.

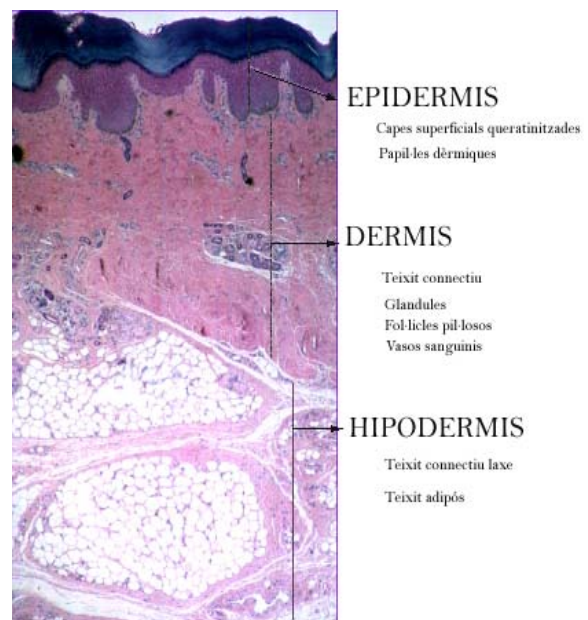


Figura 3

Tall transversal de la pell. L'epidermis presenta una intensa interacció amb la dermis mitjançant la superfície de les crestes epidèrmiques.

La hipodermis subjacent és un teixit conjuntiu lax amb important presència de teixit adipós. La

vascularització és molt importat tant en la dermis com en la hipodermis. Es distingeixen tres plexes superposats amb nombrosos capil·lars a nivell de les papil·les dèrmiques.

Queratinització: Formació de l'estrat corni

La queratinització és el procés durant el qual els queratinòcits de la capa germinal després de poques divisions es diferencien, s'aplanen, degeneren funcionalment i es converteixen en escates queratinitzades que es desprenen de la superfície. El període de temps en el procés normal de descamació és de 2-4 setmanes. La proliferació de les cèl·lules bassals està controlada per un compromís entre diversos factors de creixement (p.ex., EGF, factor de creixement epidèrmic; IGF-1, factor de creixement insuline-like; KGF, factor de creixement de queratinòcits; FGF, factor de creixement de fibroblasts) produïts pels mateixos queratinòcits, fibroblasts i també per cèl·lules del sistema immune (cèl·lules T, monòcits, macròfags).

A nivell fisiològic l'epidermis es diferencia en dos compartiments cel·lulars: compartiment proliferatiu i compartiment terminal.

En el **compartiment proliferatiu**, es distingeixen dos poblacions, tant morfològicament com funcional. Una població de cèl·lules mare amb capacitat proliferativa reduïda majoritàriament en fase G₀/G₁ (amb els marcadors $\beta 1+$, $\beta 4+$ (integrina beta1 i beta4), k1/k10- (queratines 1 i 10), PCNA- (antigen nuclear de proliferació cel·lular), i la població de les cèl·lules filles, cèl·lules en procés de diferenciació, però encara amb una lleugera capacitat proliferativa ($\beta 1+$, $\beta 4-$, k1/k10+, PCNA+) (Bata-Csorgo et al. 1993) (Bata-Csorgo et al. 1995). L'anàlisi dels compartiments proliferatius en plaques actives de psoriasi ha demostrat que a diferència del teixit no afectat o de la pell normal, el 100% de la població de cèl·lules mare està en cicle (PCNA+).

En el **compartiment terminal**, les cèl·lules no es divideixen i entren en el programa de diferenciació cel·lular: queratinització o cornificació de l'epidermis. La capa cornificada està formada pel component cel·lular (corneòcits), l'embolcall lipídic dels corneòcits, i una matriu lipídica (cossos lamelars) que fa de morter entre les cèl·lules.

Els cossos lamelars són cúmuls lipídics sintetitzats pels queratinòcits des de l'estrat basal i alliberats en les darreres fases de diferenciació en l'estrat

corni; contenen a més de lípids, diversos enzims (hidrolases de lípids i proteases) que intervenen en la modificació dels components de la capa còrnia (unions cel·lulars, lípids), i en el despreniment de les capes superiors.

Les cèl·lules sintetitzen queratines (k1/k10) que s'organitzen en fibres al citoplasma, entrecruant-se i unint-se a altres proteïnes estructurals (involucrina, loricrina, etc.). El nucli i les organel·les degeneren i les cèl·lules moren formant un exoesquelet de fibres inert juntament amb els cossos lamelars. Les cèl·lules es mantenen unides mitjançant les unions desmosoma, modificades (corneodesmosoma). Durant la diferenciació es sintetitzen diversos enzims (p.ex., transglutaminasa, colesterol sulfatasa) que intervenen en la formació dels precursors lipídics dels cossos lamelars

Encara que hi ha presents fibres de queratina a tots els nivells, la composició varia en el temps, i els canvis estan relacionats amb el procés de descamació. En lesions actives de psoriasi s'ha observat una desregulació en l'expressió d'aquestes molècules (Komine et al. 1996). Mutacions en gens de les queratines han estat associades a diverses malalties dèrmiques (revisat a Epstein i col, 1996).

Patofisiologia de la psoriasi

La psoriasi és una malaltia òrgano-específica, que es manifesta com una alteració del procés de diferenciació dels queratinòcits amb presència d'un infiltrat inflamatori en la dermis i epidermis. L'alteració del procés de la diferenciació es manifesta en una hiperproliferació de les cèl·lules de la capa basal i un deficient procés de diferenciació dels queratinòcits amb una important descamació superficial, així com canvis en els capil·lars de la dermis.

A nivell histològic, a l'epidermis s'observa una hiperqueratosi amb queratinització incompleta i retenció dels nuclis a la capa còrnia (paraqueratosi), acantosi epidèrmica interpapil·lar (hiperplàsia de l'estrat espinós, amb un gruix regular o constant) i una disminució del gruix de la capa granulosa. En dermis s'observa la presència de papil·les dèrmiques molt allargades amb una presència important de capil·lars superficials, dilatats i tortuosos. L'infiltrat inflamatori, present en l'epidermis i prop dels vasos dèrmics, consisteix en macròfags, polimorfonuclears i limfòcits, sent molt característica la presència d'exocitosis neutrofilica amb cúmul de polimorfonuclears en l'epidermis (abscessos de Munro).

En el cas de les psoriasis pustuloses es formen grans pústules intraepidèrmiques.

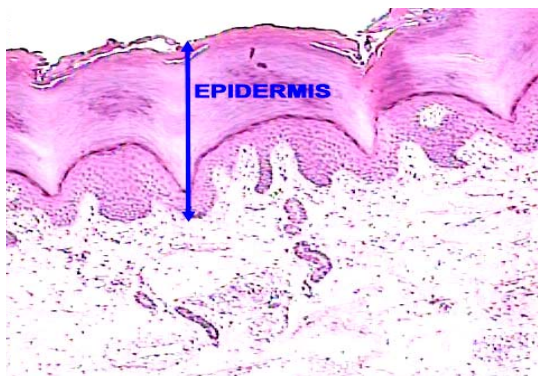
A la figura 4 es presenta les característiques histològiques d'una zona afectada de psoriasi.

En psoriasi hi ha molts tipus cel·lulars activats, la qual cosa es reflecteix en múltiples alteracions a nivell intracel·lular. S'ha descrit anormalitats en diverses vies de transducció de senyal (increment de l'activitat fosfolipasa C (PLC), adenilat ciclasa o de tirosin quinasa, així com un increment de diversos mediadors farmacològics (PGE, PGF2a, LTB4, PAF, C5a) i immunològics (IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF, TGF- α). A part s'ha posat de manifest un increment en el nombre de cèl·lules dendrítiques, de limfòcits, i alteracions en cèl·lules endotelials, fibroblasts i queratinòcits. Tots aquests successos són presents en la zona afectada de la pell, encara que no està establert si són secundaris o primaris a la manifestació de les lesions.

Queratinòcits

La durada del cycle cel·lular dels queratinòcits bassals és de 13 dies, i la maduració i descamació de 26 dies. En el cas de la pell afectada la totalitat de les cèl·lules de l'estrat germinatiu entren en fase de divisió, i el cycle es redueix entre 1 i 5 dies, i la descamació es produeix en només 4 dies. La pell no afectada del pacient també presenta un ritme de proliferació superior (2,5 vegades) encara que menor que en la zona de la lesió. La hiperproliferació sembla ser causada per un increment de les cèl·lules mare ($\beta 1+$, $\beta 4+$, k1/k10-, PCNA-) que entren en cycle, més que a causa d'un increment del número de divisions de la població "transient" ($\beta 1+$, $\beta 4$ -k1/k10+, PCNA+)(Bata-Csorgo et al. 1993).

a



Els queratinòcits quan estan activats secreten mediadors immunològics (IL-1, IL-6, IL-8, INF- γ , TNF, TGF- α) amb funcions autocrines i paracrines afectant a diversos tipus cel·lulars (cèl·lules T, endotelials), a més d'expressar molècules relacionades amb l'activació immunitària (HLA-I, HLA-II, lligant de CD28), i l'adhesió (integrines funcionals). Molts dels canvis que s'observen en la lesió són semblants als presents en el procés de cicatrització de ferides, per la qual cosa s'ha suggerit que els mecanismes implicats poden ser similars (Mansbridge i Knapp 1987). Els queratinòcits de les lesions presenten diverses anormalitats funcionals, com alteracions en el patró de síntesi de citocines i resistència a l'apoptosi (Wrone-Smith et al. 1997) i increment de l'expressió de betaintegrines en la capa suprabassal, i increment de l'expressió de receptors d'EGF en les capes superiors de l'epidermis. Models animals transgènics d'expressió de betaintegrines i d'anfiregulina (EGF família) presenten un fenotip psoriasiforme (Carroll et al. 1995; Cook et al. 1999).

Limfòcits

El principal component de l'infiltrat inflamatori està format per limfòcits T memòria ($CD45^+$) i cèl·lules activades ($CD25^+$). Pel que fa a l'estirp funcional, a la zona de la dermis el fenotip és principalment de tipus $CD3^+ CD4^+$, mentre que en la zona epidèrmica és $CD3^+ CD8^+$ (De Rie et al. 1996). Estudis sobre l'origen de la població T han posat de manifest la clonalitat de la població T amb l'ús preferent de determinades cadenes TCR $V\beta$, suggerint una activació *in situ* de determinades clones (Chang et al. 1994).

b

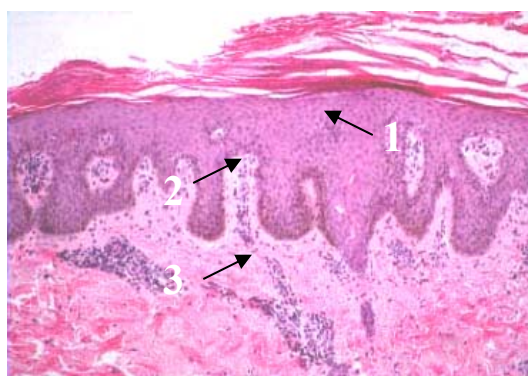


Figura 4

Tall transversal de seccions de pell no afectada i afectada de psoriasi. A la figura (a) s'observa l'estructura no patològica de la pell amb una capa proliferativa fina i un estrat corni molt ample, mentre que en la zona de pell afectada de psoriasi (b) s'observa una disminució de l'estrat corni diferenciat i un augment del gruix de les capes no diferenciades (1), unes papil·les dèrmiques molt allargades amb una elevada proliferació a l'estrat germinal (2), i un infiltrat molt pronunciat a la dermis (3). A la part superior s'observa la capa de descamació superficial.

Taula 2

Funció dels principals mediadors immunològics en els tipus cel·lulars presents a la pell. Amb fletxes s'indica l'expressió augmentada de les citocines en les lesions de psoriasis

		Acció sobre cèl·lules diana		Funció
IL-1	↑ en lesions	activació de cèl·lules T, neutròfils, mastòcits ↑cèl·lules dendrítiques	↑ MHC II ↑ adhesines ↑ IL-8 ↑ IFN- γ ↑ k6-16	angiogènesi adhesió cel·lular
IL-6	↑ en lesions	proliferació quimiotaxis i activació cèl·lules T		hiperproliferació queratinòcits
IL-8	↑↑ en lesions	proliferació quimiotaxis i activació cèl·lules T		angiogènesi hiperproliferació queratinòcits
IFN- γ	↑ en lesions	activació macrofags	↑ MHC II ↑ adhesines ↑ IL-1 ↑ TGF- α	adhesió cel·lular
TNF	↑ en lesions	↑cèl·lules dendrítiques	↑ MHC II ↑ adhesines ↑ IL-8	adhesió cel·lular
TGF α	↑↑ en lesions		↑ IFN- γ	angiogènesi hiperproliferació queratinòcits

Quant a les citocines presents a la lesió, no s'ha detectat l'IL-4, sí en canvi IL-2, TNF, IFN- γ , la qual cosa ha fet suggerir que el patró d'expressió de citocines és semblant al de tipus Th1. A la taula 2 s'han indicat les citocines més importants en relació a la patologia psoriàsica.

Altres cèl·lules:

Els fibroblasts es troben activats en les lesions, encara que no s'ha detectat en psoriasis presència de fibrosi. Experiments de trasplantament d'epidermis i de reconstitució dèrmica, han posat de manifest la seva capacitat de reproduir les lesions psoriàsiques (Fraki et al. 1982). Aquestes cèl·lules poden actuar estimulant el creixement dels queratinòcits, ja sigui per contacte directe o bé per la producció de citocines.

La presència dels mastòcits en les lesions psoriàsiques i dels granulòcits en els abscessos de Munro és característica d'un augment de l'activitat de la malaltia. El cúmul és degut a l'elevada concentració de quimiotàctics en les zones afectades.

Etiopatogènia

S'han descrit moltes de les alteracions presents en la pell dels pacients, però encara s'hipotetitzava sobre la causa primària de la malaltia. Existeixen dues teories principals, que consideren que és un defecte primari de caràcter dèrmic o alternativament considera que és de base immunològica.

Diverses evidències posen de manifest el paper preponderant de la resposta immune en l'inici i el manteniment de la malaltia: efectivitat del tractament amb tòxics específics de cèl·lules T activades (Gottlieb 1990; Gottlieb et al. 1995b) o amb immunosupressors (Ellis et al. 1986), la reproducció de models de psoriasis després de la transferència de cèl·lules T en models animals (Wrone-Smith i Nickoloff 1996; Schon et al. 1997), o la demostració de l'estat d'activació de les cèl·lules T en els pacients, de forma prèvia a l'aparició de la lesió (Norris et al. 1997). Tot i així, també hi ha dades que suggereixen una alteració primària a nivell de l'epidermis (desregulació de l'expressió de les molècules d'adhesió o canvis en l'homeostasi de l'epidermis (Carroll et al. 1995)), de la dermis (implicant als fibroblasts dèrmics; trasplantaments en models artificials *in vitro* (Konstantinova et al. 1996)) o del sistema vascular (en cèl·lules endotelials). L'ús de models animals no ha servit per aclarir aquesta disjuntiva, ja que proposen un escenari alternatiu, amb models "dèrmics" o models "immunològics". Els coneixements actuals de la patologia permeten proposar un model mixt, que explicaria també la seva manifestació òrgano-específica. El model transgènic de Carroll i col·l., 1995, correlaciona l'estat d'activació queratinòcits amb a producció de citocines inflamatòries (Haase et al. 2001).

Component genètica de la psoriasis

Els primers estudis epidemiològics poblacionals en regions nordeuropees varen establir les bases per al coneixement de les bases genètiques de la psoriasi (Lomholt 1963; Helgreen 1967). Aquests estudis posaren de manifest la forta agregació familiar i la major prevalença en familiars que en la població general, estimant el risc relatiu en parents de primer grau entre valors de 4 i 8 (revisat a Elder i col·l., 1994). Els valors d'heretabilitat descrits en diferents estudis són molt alts, oscil·lant entre 80-90% (Brandrup et al. 1982; Duffy et al. 1993), encara que els factors ambientals són importants en l'establiment del curs de la malaltia (Tagami 1997).

Estudis de bessons han estimat taxes de concordança del 70-75% en poblacions americanes (Farber et al. 1974) i europees (Lomholt 1963; Brandrup et al. 1982) tot i que en alguns estudis s'ha reportat valors menors amb una concordança del 25% (Duffy et al. 1993). És de remarcar que en el cas de la concordança entre bessons monozigòtics (MZ), existeix una gran homogeneïtat en les característiques de la malaltia (distribució, edat d'aparició, severitat), la qual cosa suggereix forta implicació genètica en la manifestació d'aquests caràcters (Farber et al. 1974).

La majoria dels estudis de segregació reportats han descrit un patró d'herència autosòmic dominant (revisat a Elder i col·l., 1994, (Elder et al. 1994)). Els primers estudis de grans genealogies proposaren un model d'herència autosòmic dominant amb una penetració reduïda (Ward i Stephens 1961; Abele et al. 1963). Estudis posteriors realitzats en 5000 famílies, proposaren la compatibilitat d'una herència recessiva, assumint una freqüència gènica molt alta (Swanbeck et al. 1994). Quant al número de gens implicats s'ha suggerit models d'herència oligogènica (dos *locus* recessius) (Steimberg, 1951), multifactorial (Watson et al. 1972) o amb un *locus* major i una herència residual multifactorial (Iselius i Williams 1984). Elder i col·l., calcularen la variació del risc respecte els diferents graus de relació familiar mitjançant el mètode de Risch, evidenciant un patró *multilocus* amb un model d'acció epistàtic (no additiu) (Elder et al. 1994).

Patrons d'herència paterna i d'anticipació observats en els estudis epidemiològics han estat reportats en la descripció de l'herència de determinats *loci* (Burden et al. 1998; Veal et al. 2001). Aquests han estat explicats per fenòmens d'inestabilitat mitòtica o d'*imprinting* (Traupe et al. 1992; Zheng et al. 1994).

A la taula 3 es resumeixen els patrons d'herència que s'han suggerit per la psoriasi

Associacions amb HLA

Des de la descripció de la primera relació entre una malaltia humana (malaltia de Hogdkin) i el sistema HLA en l'any 1967, va haver un gran allau d'estudis que cercaren una relació directa amb el sistema HLA. Per aquesta raó les associacions amb al·lels HLA va ser un dels primers objectius obvis en la cerca d'una determinació genètica de la psoriasi.

En població caucàsica la primera associació va ser descrita amb l'al·lel HLA-B13 (Russell et al. 1972) i posteriorment amb altres al·lels de classe I (Cw6, B17, B37) i de classe II (DR7) ((Brenner et al. 1978), (Tiware et al. 1982). Henseler i Christophers, 1985 varen associar la presència de determinats al·lels HLA (Cw6, DR7, B13, B57) amb l'agregació familiar i el curs de la malaltia, anomenant-la psoriasi tipus I, enfront la psoriasi tipus II, sense història familiar i una (feble) correlació amb els al·lels Cw2 i B27 (Henseler i Christophers 1985). Schmitt-Egenolf, van evidenciar que els al·lels DPB1*03032, DQA1*0201, DRB1*0701, B57 i CW6 que formen un haplotip ancestral en els individus de raça caucàsica, denominat EH-57.1 (Degli-Esposti et al. 1992), estaven fortament associats a la psoriasi de tipus I, i que la regió que conté el major determinant de risc és la fracció de classe I de l'haplotip EH-57.1 (B57-CW6) (Schmitt-Egenolf et al. 1993; Schmitt-Egenolf et al. 1996).

Estudis de lligament genètic

Els estudis de lligament en psoriasi han posat de manifest diversos *loci* de predisposició, set dels quals han estat denominats *PSORS* (MIM:177900) (de l'anglès *psoriasis susceptibility*): *PSORS1* (6p21), *PSORS2* (17q22-25), *PSORS3* (4q28.3-32.1), *PSORS4* (1q21-q24.1), *PSORS5* (3q21), *PSORS6* (19p13.3), *PSORS7* (1p32.2-p31.1). Altres regions també han estat suggerides com a regions de predisposició en diverses localitzacions cromosòmiques: 2p14, 4p15.33, 8q24.3, 7p16-q11.21, 11q25, 14q12, 14q32, 16q, 18p11.32-11.22, 20p12.1-q12, 21q.

La major part dels *loci* han estat detectats en cerques globals aleatòries del genoma, amb la qual cosa les delimitacions de les regions de lligament són una mica grolleres.

Taula 3

Patrons d'herència proposats per l'herència de la psoriasi.

	Model genètic	Comentaris	Individus analitzats
Steimberg, 1951	Oligogènic		Pacients
Watson, 1972	Dobles recessiu		
Farber, 1972	Multifactorial		
Ward, 1961	Multifactorial		
Abele, 1963	Autosomal dominant	Penetració reduïda	Família extensa
Ananthakrishnan, 1974	Multifactorial		Població general
Lomhold, 1963	Efecte d'imprinting		Població general
Trauppe, 1992			
Lomhold, 1976	Poligènica		Població general
Elder, 1994	Multilocus		Població general
Swanbeck, 1994	Autosomal recessiu	Alta freqüència gènica	Agrupació d'afectes
Swanbeck, 1995		Tres variants segons l'edat	
Theeuwes, 1995	Autosòmic dominant	Inestabilitat mitòtica	Literatura

A continuació es resumeixen els estudis que han demostrat lligament en les regions *PSORS* (taula 19a i 19b).

Regions *PSORS*

PSORS1 6p21.23

Aquest *locus* ha estat identificat en diverses poblacions. Trembath i col·l., va ser el primer en identificar en una cerca global de genoma un *locus* a 6p21, estimant la contribució al risc de la malaltia en un 35% (Trembath et al. 1997). L'anàlisi consistí en una cerca global en dues fases (two-stages) a partir de famílies *multiplex* d'origen britànic amb psoriasi del tipus I. L'anàlisi de lligament va ser realitzat de forma no-paramètrica, combinant lligament entre germans, entre grups de germans de la mateixa família i entre famílies (estudi d'associació (HRR)). Estudis posteriors han confirmat de forma directa aquest *locus*; en població americana i germànica en un estudi de cerca global (Nair et al. 1997) proposant una herència AR (positius amb els marcadors *TNFA*, *D6S260*), o de forma indirecta en població italiana (Capon et al. 1999b).

Els gens candidats que es localitzen en aquesta regió es descriuen de forma individual més endavant, ja que el seu estudi forma part dels objectius d'aquesta tesi.

PSORS2 17q22-25

Aquesta va ser la primera regió fora del MHC en ser descrita lligada a la psoriasi. La seva contribució al risc ha estat estimada en el 20% (Bhalerao i Bowcock 1998), encara que no ha estat replicada amb facilitat. El

primer estudi consistí en una cerca global en famílies *multiplex* d'origen americà (E.U.A.), detectant lligament amb marcadors de 17q i una heterogeneïtat del 50% ($\alpha=0,5$), amb indicis de lligament amb un marcador de la regió 6p (al·lel HLA-Cw6) en famílies no lligades a 17q (Tomfohrde et al. 1994). Altres estudis posteriors (també de cerca global del genoma) han confirmat de forma independent aquest *locus* a 17q en diferents poblacions (per mètodes de *sharing*) (Matthews et al. 1995; Nair et al. 1997; Enlund et al. 1999a). En la majoria dels estudis el patró d'herència és AD amb una penetració reduïda. Altres estudis de cerca global (per mètodes de *sharing*) (Trembath et al. 1997) i de cerca dirigida (Matthews et al. 1995; Nair et al. 1995; Burden et al. 1998; Capon et al. 1999a) no han pogut demostrar lligament amb 17q.

Entre els gens presents a la regió, hi és el gen per a la beta-integrina 4 (*IGB4*), que intervé en la composició de l'hemidesmosoma, mutacions al gen s'han associat a formes lleus d'epidermolisi bullosa (Epstein 1996).

PSORS3 4q28.3-32.1

Aquest *locus* va ser identificat en l'anàlisi de 6 famílies d'origen britànic. La cerca global aleatòria de baixa resolució (180 marcadors) identificà en una família tres regions susceptibles de lligament als cromosomes 3, 7 i 4, però l'anàlisi per saturació de marcadors a les sis famílies confirmà només el *locus* a 4q amb un valor límit de $LOD=3,01$, amb un model d'herència AR (Matthews et al. 1996).

PSORS4 1q21-q24.1

Aquest *locus* ha estat descrit en una anàlisi global del genoma en famílies *multiplex* d'origen italià. La

cerca genòmica es realitzà en una única família, que resultà amb indicis de lligament a 1q. L'anàlisi per saturació de la regió es va estendre a 22 famílies confirmant el lligament, sota un model d'herència AD amb penetració reduïda i amb presència d'heterogeneïtat ($\alpha=0,57$) (Capon et al. 1999a). El mateix grup mitjançant estudis d'associació (TDT) en un grup independent de 79 trios italians i un grup cas-control de Sardenya, detectà la presència d'un haplotip més freqüent en els pacients (Capon et al. 2001). Aquesta regió també ha estat reportada de forma preliminar en una cerca independent realitzada en població britànica (Barnes et al. 1998)

En població italiana (famílies lligades a 6p21) s'ha descrit una interacció epistàtica del *locus* 1q21 amb el *locus* *PSORS1* (Capon et al. 1999b), mentre que un altre estudi es suggeria un efecte de 1q independent del *locus* HLA-C (anàlisi de Cw*6) (Barnes et al. 1998).

Aquest *locus* coincideix en una zona on mapa un complex de més de 20 gens que intervenen en la diferenciació epidèrmica (Complex de diferenciació epidèrmica; EDC) (Hardas et al. 1996; Marenholz et al. 2001). En aquesta regió mapen gens que codifiquen per a proteïnes estructurals de l'epidermis (loricrina, involucrina, filagrina, trichohyalina), reguladors de la diferenciació (S100, proteïna cel·lular d'unió a retinoic (CRABP-II)), gens de la família SPRR, alguns dels quals s'han trobat sobreexpressats en lesions psoriàsiques (Madsen et al. 1991; Bowcock et al. 2001).

PSORS5 3q21

Aquest *locus* ha estat descrit per lligament i TDT en població escandinava (Samuelsson et al. 1999). La població va ser triada de forma esbiaixada amb pares no afectes per afavorir la detecció d'un model d'herència recessiva, proposat anteriorment pel mateix grup en estudis epidemiològics (Swanbeck et al. 1994). Mitjançant una cerca de baixa resolució (1 marcador cada 20 cM) prèvia en 20 famílies i confirmació per saturació de la zona en una mostra ampliada de 47 famílies, van confirmar el lligament (LOD=3,85) amb una herència AR assumint una alta freqüència gènica de la malaltia, reduïda penetració i una heterogeneïtat del 45% ($\alpha=0,45$). Un resultat similar es va observar amb l'anàlisi no paramètric, però curiosament amb un marcador allunyat 6 cM del primer. Rèpliques amb estudis de TDT en poblacions independents confirmaren el lligament amb marcadors de la mateixa regió (*D3S3552*, *D3S1551*) (Enlund et al. 1999b). Recentment el mateix grup ha descrit un gen candidat a la regió mitjançant mapatge per desequilibri de lligament (Hewett et al. 2002).

Aquest *locus* ha estat reportat de forma independent per a la dermatitis atòpica (Lee et al. 2000;

Cookson et al. 2001) i amb artritis reumatoide (Cornelis et al. 1998). Donada la resolució de les cerques globals, la regió delimitada en els estudis de psoriasi i dermatitis està encavalcada, per la qual cosa no es descarta que siguin dos gens diferents.

En aquesta regió s'han descrit gens que intervenen en l'activació limfocitària, i que podrien estar implicats en la desregulació de la resposta immune present en totes tres malalties (p.ex. *CD80* i *CD86* (*LocusID:481,482*)).

PSORS6 19p13.3

Aquest *locus* ha estat detectat en un estudi de 32 famílies multiplex d'origen germànic. La selecció de la mostra es va fer condicionada a l'edat. Tots els participants eren majors de 20 anys, donada la dependència de l'edat amb la penetració (penetració menor de 50% en els individus per sota de 20 anys). Mitjançant mètodes paramètrics i no paramètrics, detectaren lligament a la regió 19p13.3 (32cm pter), amb un model d'herència AR, amb alta freqüència gènica i una heterogeneïtat del 66%. Aquest *locus* coincideix amb altres *loci* de predisposició identificats per la malaltia inflamatòria de Bowel (Rioux et al. 2000) o *loci* que presenten lligament amb dermatitis atòpica (Lee et al. 2000).

Aquesta regió conté diversos gens, importants candidats funcionals; gens implicats en la fisiologia i metabolisme dels eicosanoids, tirosina quinases implicades en la transducció de senyal de diverses citocines (*TYK2* (*LocusID:7297*) i *JAK3* (*LocusID:3718*) i adhesines (*ICAM1* (*LocusID:3383*)).

PSORS7 1p32.2-p31.1

El grup de Trembath, en un estudi de parelles de germans i mitjançant mètodes no paramètrics, evidencià un nou *locus* a 1p32. En aquesta regió s'ha mapat *EPS15* (*LocusID:2060*), un gen implicat en la via de resposta a EGF, a més d'altres gens com la Janus quinasa 1 (*JAK1*: *LocusID:3716*) i la cadena beta del receptor d'IL-12 (*IL12Rb*: *Locus ID:3595*). Aquest *locus* també ha estat descrit com a suggestiu de predisposició a dermatitis atòpica en l'estudi de Lee en diferents poblacions europees (nòrdica, centreeuropea i mediterrània) (Lee et al. 2000).

Altres *loci* sense confirmar

Aquests *loci* han estat descrits en diversos estudis de cerca global de genoma, i encara que no presenten prou significació, presenten unes característiques que els

poden convertir en alguna cosa més que falsos positius (taula 4).

Taula 4
Loci de predisposició a psoriasi no confirmats

2p14	Trembath et al. 1997 ; Veal et al. 2001
7p15	Veal et al. 2001
8q24	Trembath et al. 1997, Lee et al. 2000.
16q	Nair et al. 1997
14q12	Daniels et al. 1996
14q32	Veal et al. 2001
20p	Nair et al. 1997; Trembath et al. 1997 ; Veal et al. 2001

2p14

Aquesta regió, descrita en diversos estudis (Trembath et al. 1997; Veal et al. 2001) és sintènica a la regió del cromosoma 17 de ratolí que conté la mutació *flaki*, mutació que reproduceix una afecció psoriasiforme en el ratolí (veure en models animals). Aquest *locus* actuaria de forma epistàtica amb el *locus PSORS1* (Veal et al. 2001).

7p15-12

Aquest *locus* ha estat detectat en l'estudi de Veal i col·l., 2001, per mètodes de compartició, i solapa amb un *locus* descrit lligat a asma en població fina (D7S484) (Laitinen et al. 2001).

8q24

Al 1994 el grup de Trembath va descriure una família on la psoriasi cosegregava amb l'Exostosi múltiple hereditària (HME) (MIM:133700) (Rosbotham et al. 1994), una malaltia AD no relacionada amb la psoriasi que es caracteritza per alteracions esquelètiques durant el creixement. El gen causant, *EXT1* (LocusID:2131) mapa a 8q24.11-q24.13. Aquesta cosegregació sembla confirmar un *locus* a la regió 8q24, que havia estat reportat com a potencialment lligat (Trembath et al. 1997).

16q

La malaltia inflamatòria intestinal (IBD de l'anglès *Inflammatory bowel disease*)(MIM:266600) es caracteritza per una inflamació recurrent de l'intestí de caràcter discontinu. Es diferencien dues formes clíniques; Malaltia de Crohn, amb afecció a qualsevol part de l'intestí, i colitis ulcerosa, restringida a la mucosa de l'intestí gruixut. La prevalença de la IBD està

augmentada en pacients amb psoriasi (Lee et al. 1990) i en altres condicions com l'espondilitis anquilosant i l'esclerosi múltiple, totes malalties amb una component immunològica important. L'herència és complexa i s'han localitzat diversos gens de predisposició, els dos principals a 16q i 12p13 i un tercer a 19p13 (Lee et al. 1990), altres *locus* de susceptibilitat estan presents a 1p36, 6p21, 5q, 7q21, 3p21.

El *locus* de 16q descrit per a IBD solapa amb un *locus* que presenta lligament suggestiu amb psoriasi, amb una herència AR (Nair et al. 1997), i el 19p13 i el 6p21 coincideixen amb les regions *PSORS6* i *PSORS1*, altres regions com la 3p21, 3q21 han estat descrites associades a dermatitis atòpica, i 7q31,5q33, 6p21 amb asma.

14p12

Descrit per Trembath, coincideix amb un marcador que presentava lligament per a asma (Daniels et al. 1996).

14q32

Descrit per Veal i col·l., 2001, sembla actuar de forma epistàtica amb el *locus PSORS1* (Veal et al. 2001). Aquest *locus* coincideix amb altres *loci* de predisposició a IDDM (diabetis mellitus dependent d'insulina) i Malaltia de Graves.

20p

Aquest *locus* ha estat reportat en estudis independents, encara que amb una significació reduïda (Nair et al. 1997; Trembath et al. 1997; Veal et al. 2001) i coincideix amb zones reportades en estudis fet en pacients amb asma (Wjst et al. 1999; Cookson et al. 2001).

Gens candidats

En aquest apartat s'ha descrit principalment els gens de la regió estudiada pel nostre grup, en 6p21. A més es descriu altres gens que funcionalment i posicional poden ser candidats interessants d'estudi.

Gens candidats de la regió 6p21: *locus PSORS1*

POU5F1. Factor de transcripció de classe 5 amb dominis POU, 1.

El *POU5F1* (OTF3 o OTF4) (*LocusID:5460*), mapa a 6p21, 90 kb aproximadament telomèric de HLA-C, és un gen que abraça aproximadament 7 kb i està organitzat en cinc exons que presenten *splicing* alternatiu generant dues isoformes, de 360 aa (Oct3A) i 265 aa (Oct3B), possiblement funcionalment distintes. S'expressa de forma ubiqua en teixits embrionaris, i amb nivells baixos a tots els teixits adults (Takeda et al. 1992). *POU5F1*, codifica per a un factor de transcripció amb dominis homeòtics de tipus POU. Factors de transcripció amb aquest tipus de domini han estat implicats en l'expressió específica en teixits limfoides, i desenvolupament embrionari. Treballs realitzats en models animals, han demostrat que Oct3 actua com a reguladors de la determinació, controlant la potencialitat en cèl·lules pluripotencials (Niwa et al. 2000)

Takeda i col·l., 1992 va descriure dos polimorfismes a la seqüència de *POU5F1*, encara que no s'ha realitzat un triatge global de variants. Un és a la zona 3' no traduïda, i l'altre al codó d'inici de la isoforma Oct3B. L'al·lel AGG, d'aquesta segona variant, causa la manca d'expressió de la forma Oct3B (Takeda et al. 1992).

Un estudi ha reportat associació amb psoriasi, amb un risc superior que el que està associat amb l'al·lel HLA-Cw*6 (Gonzalez et al. 2000).

TCF19: Factor de transcripció 19

TCF19 (anomenat anteriorment SC1) (*LocusID:6941*) mapa a 6p21, telomèric a *HLA-C* (aprox,100 kb) entre *POU5F1* i *HCR*. És un gen petit de 3,2 kb organitzat en tres exons que codifica per a una proteïna de 344 residus. La proteïna té dominis rics en prolina i es creu que actua com a un factor transactivador de la transcripció de gens implicats en les darreres fases de progressió cel·lular (Ku et al. 1991). El gen s'expressa de forma ubiqua durant les fases G1-S del cicle cel·lular.

A nivell genètic, un estudi de triatge de mutacions en la zona codificant en població japonesa ha identificat 4 polimorfismes, però no ha observat cap associació amb psoriasi (Teraoka et al. 2000). Altres estudis parcials no han detectat polimorfismes ni associacions en població caucàsica (Nair et al. 1999).

HCR: Alpha-Helix-Coiled-coil Rod Homolog

El gen *HCR* (*Alpha-Helix-Coiled-coil Rod Homolog*) (*LocusID:54535*), és un candidat posicional localitzat a 114 kb telomèric a *HLA-C* i 19 kb centromèric a *CDSN*. L'estructura genòmica d'aquest gen anomenat primitivament *Pg8* (gen putatiu 8) i més tard *HCR* (Oka et al. 1999), va ser deduïda per Asumalahti i col·l., (Asumalahti et al. 2000; Asumalahti et al. 2002). *HCR* abraça més de 14 kb i s'organitza en 16 exons petits de mides variables (entre 46 i 304 pb) amb llargues seqüències intròniques. Codifica per a una proteïna de 757 aminoàcid amb funció desconeguda; mentre uns li atribueixen funcions mecàniques en el citoesquelet per la seva semblança amb les plectines *HCR* (Oka et al. 1999), altres autors la descriuen com una proteïna nuclear amb dominis de tipus *zipper* de leucina (Asumalahti et al. 2000). L'expressió a nivell de mRNA no és restringida, detectant-se nivells variables en la majoria dels teixits. Mitjançant hibridació *in situ* s'ha detectat un increment de l'expressió de mRNA en els queratinòcits de les zones lesionades, però no en les zones no afectades dels pacients o en els pacients sans (Asumalahti et al. 2000).

A nivell genètic, el triatge de tots els exons i part de les zones intròniques ha posat de manifest l'elevat polimorfisme del gen *HCR*: 18 variants SNP en la regió codificant i 7 SNP en les regions intròniques analitzades (només 4 del total) (Asumalahti et al. 2000).

Un estudi limitat de tipus cas-control en població fina, ha demostrat l'associació de dos al·lels, que formen un haplotip denominat *HCR*Trp-Trp*, amb psoriasi, sent especialment significatiu en la forma de presentació primerenca. L'al·lel *HCR*Trp-Trp* presenta associació al·lèlica amb *Cw*6*. (Asumalahti et al. 2000). Hi ha dos estudis, però que no han replicat aquesta troballa (Chia et al. 2001; O'Brien et al. 2001).

CDSN: Corneodesmosina

El gen *CDSN* (*LocusID:1041*), és un excel·lent candidat, ja que compleix tant, els criteris posicionals com els funcionals per estar implicat en la predisposició a psoriasi. El gen mapa a 160 kb telomèric de *HLA-C*, abraça unes 3 kb i consta de dos exons que codifica per a una proteïna de 486 aminoàcid residus, anomenada corneodesmosina. Aquest gen correspon a l'anomenat anteriorment gen-S, (S de l'anglès *skin*), que s'havia identificat com d'expressió específica de pell (Zhou i Chaplin 1993).

La corneodesmosina (*CDSN*) és una glucoproteïna específica dels queratinòcits amb funcions d'adhesió cel·lular (Serre et al. 1991). L'expressió és

detecta a nivell citoplasmàtic com una molècula de 52-56 kd en l'estrat granulós, i amb un pes molecular menor, entre 30-45 kd (Simon et al. 1997) a la membrana cel·lular formant part dels desmosomes modificats de l'estrat corni (corneodesmosomes) (Serre et al. 1991). La modificació dels corneodesmosomes està relacionada amb els processos de descamació natural de les capes superiors de l'estrat corni. S'ha proposat que la proteòlisi de la CDSN, estaria implicada en els canvis de l'adhesivitat dels corneodesmosomes en les capes superiors de l'estrat corni (Simon et al. 1997).

En pacients amb psoriasi, l'expressió de la CDSN és normal en les zones no afectades de la pell, però en les zones lesionades l'expressió de la CDSN està incrementada i alterada en el seu patró d'expressió. La CDSN s'expressa a l'estrat corni i s'estén a múltiples capes dintre de l'estrat espinós, on es detecta tant en la seva forma citoplasmàtica com de membrana. A més s'ha demostrat que en les lesions la translocació a la membrana és anterior a la formació de l'embolcall corni (Allen et al. 2001). En altres malalties inflamatòries de la pell, existeix un lleuger augment de l'expressió de CDSN, però restringit a una poques capes de l'estrat granulós. Una anàlisi de l'expressió de diverses formes polimòrfiques del CDSN, no ha detectat diferències en l'expressió (Allen et al. 2001).

A nivell genètic, s'han identificat al menys 19 polimorfismes del gen CDSN en diverses poblacions (Ishihara et al. 1996; Guerrin et al. 1998; Jenisch et al. 1999), alguns específics de població. Les variants genètiques descrites es localitzen en la regió codificant de l'exó 2 (el més gran) encara que no es poden descartar canvis presents en altres zones codificants, intròniques, no traduïdes o del promotor (centromèric a HLA-C).

L'estudi més complet de 18 polimorfismes identificà 8 al·lels diferenciats, amb una seqüència d'aminoàcid única, (CD1a, 1b, CD2-6), els quals presentaven desequilibri de lligament amb al·lels HLA A/B/C i en menor mesura amb HLA D. L'al·lel denominat CD2, present a tots els haplotips Cw*6, presentà associació amb psoriasi (Jenisch et al. 1999).

L'estudi de variants específiques de CDSN, ha demostrat en dos estudis en població caucàsica associació psoriasi (Ahnini, 1999, Allen, 1999), demostrant un efecte de dosi i un risc incrementat respecte a la presència de Cw*6 (Ahnini, 1999), encara que altres han fallat en demostrar-la, tant en població japonesa com en caucàsica (Ishihara et al. 1996; Asumalahti et al. 2000; Gonzalez et al. 2000).

[Homo sapiens Map View build 29](#) [BLAST the Human Genome](#)
 Chromosome:
[1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [6](#) [7](#) [8](#) [9](#) [10](#) [11](#) [12](#) [13](#) [14](#) [15](#) [16](#) [17](#) [18](#) [19](#) [20](#) [21](#) [22](#) [X](#) [Y](#)

Master Map: Genes On Sequence [Maps & Options](#)
 Total Genes On Chromosome: 2708 [\[92 not localized\]](#)
 Region Displayed: 37,560-37,720
[hp](#) [Download/View Sequence/Evidence](#)
 Genes Labeled: 9 Total Genes in Region: 9
[genes_seq](#) [symbol](#) [orient.](#) [full name](#)

Figura 5

Mapa de la regió crítica PSORS1 en 6p21. Aquesta regió abraça aproximadament 260Kb, des de CDSN fins HLA-C. A més dels gens CDSN, HCR, TFC19, POU5F1 i HLA-C han estat descrits altres quatre seqüències. Aquest mapa ha estat modificat de la pàgina web del Genoma Humà publicada al NCBI web site

Altres gens de la regió 6p21

Dintre de la regió crítica de PSORS1, s'ha descrit altres seqüències entre HLA-C i CDSN. *SEEK1* que codifica per a una proteïna de funció desconeguda, i altres tres *loci* que no se sap si s'expressen. A la figura 5 es presenta el mapa de la regió 6p21 segons el *draft* del genoma humà actualitzat del mes de juliol de 2002.

Gens MIC: MICA i MICB.

Els dos gens MIC (de l'anglès *MHC class I polypeptide-related sequence*), separats 89 kb, mapen a la regió centromèrica a HLA-C, fora de la regió crítica delimitada com a potencialment de risc (Jenisch et al. 1999; Oka et al. 1999; Nair et al. 2000). Els gens MIC, *MICA* (LocusID:4276) i *MICB* (LocusID:4277) pertanyent a una família multigènica que codifiquen per a receptors transmembrana expressats de forma ubiqüa i representen formes específiques divergents dels gens de MHC de classe I (Bahram et al. 1994). Codifiquen per a una proteïna induïble per *estrès* que és expressada en la superfície cel·lular i és reconeguda per cèl·lules limfoides (cèl·lules T $\gamma\delta$, cèl·lules CD8⁺ i NK) (Steinle et al. 1998; Bauer et al. 1999; Groh et al. 2001). S'expressa de forma preferent en fibroblasts i cèl·lules epitelials i en la pell, s'ha descrit l'expressió en l'estrat basal i en les capes queratinitzades superiors.

MICA i *MICB* són gens polimòrfics, amb la majoria de les variants identificades codificants. En *MICA* s'ha identificat un triplet polimòrfic (GCT)_n en l'exó 5, que codifica para un número variable d'alanines dintre de la regió transmembrana. La presència de nou repeticions del triplet (GCT)₉ ha estat associada a artritis psoriàsica de forma independent a l'associació de psoriasis amb Cw*6 (Gonzalez, 1999), i un haplo-al·lel específic (composat per diversos polimorfismes de la regió transmembrana) amb psoriasis tipus I (Tay et al. 2000).

Gens candidats en 1q21. *PSORS4*

S100A7: Psoriasina

S100A7 (LocusID:6278) codifica per a la proteïna S100A7, també anomenada psoriasina que s'expressa principalment en determinats teixits fetals (pell, oïda i llengua) i està sobreexpressada en els queratinòcits de les lesions psoriàsiques (Madsen et al. 1991). És una proteïna de la família de S100, família que agrupa proteïnes que tenen una important funció en la regulació per calci del creixement i diferenciació cel·lular (Kligman i Hilt 1988). *S100A7* ha estat mapat físicament i genèticament a 1q21 (Hardas et al. 1996) i tots els membres de la família S100 (excepte dos gens localitzats a 21q i X) mapen a la mateixa regió (Engelkamp et al. 1993).

En les lesions psoriàsiques juntament amb la psoriasina (*S100A7*) es troben sobreexpressats altres gens localitzats a la regió 1q21; com la calgranulina A i B (*S100A8* i *S1009*), la calciolina (*S100A6*), la CaN19 (*S100A2*) així com d'altres pertanyents a la família de les proteïnes riques en prolina (SRPP) (Hardas et al. 1996). Existeix una expressió coordinada que ha suggerit la presència d'un *locus* regulador general o d'una duplicació dels elements de regulació (Hardas et al. 1996; Zhao i Elder 1997).

S100A7 i altres de les proteïnes del cluster (*S100A8* *S100A9*) han estat associades a la resposta inflamatòria. De forma específica, s'ha descrit que *S100A7* presenta propietats quimiotàctiques sobre cèl·lules CD4⁺ i neutròfils (Jinquan et al. 1996)

L'estudi mutacional del gen, només ha identificat canvis a nivell del promotor (-559G/A i -563A/G), que no han estat associats a psoriasis en famílies italianes lligades a la regió 1q21 (Semprini et al. 1999).

CRABP-II: Receptor cel·lular d'àcid retinoic

Els retinoides actuen com a moduladors de la proliferació i diferenciació dels queratinòcits, en un procés de múltiples passos on l'àcid retinoic regula

l'expressió de diversos gens (transglutaminasa, queratines, sulfotransferasa, etc) controlant la progressió de la diferenciació, (Jetten 1990). L'acció dels retinoides és via els receptors nuclears d'àcid retinoic (RAR).

CRABP1 i de CRABP2 (de l'anglès *cellular retinoic acid binding protein*), dos proteïnes citosòliques d'unió a àcid retinoic que regulen l'accés del retinoic als receptors nuclears (Jetten 1990). CRABP2, la forma majoritària presents en els queratinòcits, és induïda per retinoic i es creu que funciona com un regulador negatiu de l'efecte de àcid retinoic.

L'àcid retinoic és format de forma endògena a partir de retinol en les cèl·lules diana amb una proporció que depèn de l'estat de diferenciació cel·lular. En les plaques de psoriasis l'activitat enzimàtica formadora de retinoic és més alta, de igual forma que els nivells de receptor intracel·lular de àcid retinoic (CRABP2) (Siegenthaler et al. 1992). L'efecte inductor del retinoic és dependent de l'estructura estratificada de l'epidermis, i/o de les interaccions epidermis-dermis (Elder et al. 1992).

CRABP2 (LocusID:1382), mapa a 1q21, en el cluster d'EDC, i ha estat reportat en diversos estudis la seva sobreexpressió en teixit lesionat, encara que també es troba sobreexpressat en altres malalties dèrmiques inflamatòries, suggerint un efecte no específic de la psoriasis (Algermissen et al. 1996).

Estudis d'expressió

L'estudi d'expressió diferencial de zones no afectades de la pell de pacients ha revelat l'expressió diferencial de diversos gens en les zones lesionades. Rivas i col·l. van observar la sobreexpressió en les zones lesionades de tres gens: la connexina 26, l'antigen carcinogènic escamós de pell (SCC1) i els gens per a dos components del sistema NAD mitocondrial (Rivas et al. 1997). Recentment, un estudi d'expressió mitjançant microarrays ha posat de manifest l'expressió alterada d'una gran quantitat de gens en les lesions psoriàsiques; 177 gens presenten una expressió diferencial (16 presentaven una expressió reduïda) respecte a la pell d'un individu sà, però només 10 presenten una sobreexpressió en la pell de les zones no afectades dels pacients (Bowcock et al. 2001). Els gens identificats en l'estudi, tenen una funció aparentment diversa: psoriasina (*S100A7*), inhibidors de proteases (*SERPINE3*), factor de creixement endotelial (*ECGF1*), interleucina 8 (*IL8*), proteïna induïble per IFN- α (*IFI27*), o un defensina (*DEFB2*).

Models animals de psoriasi

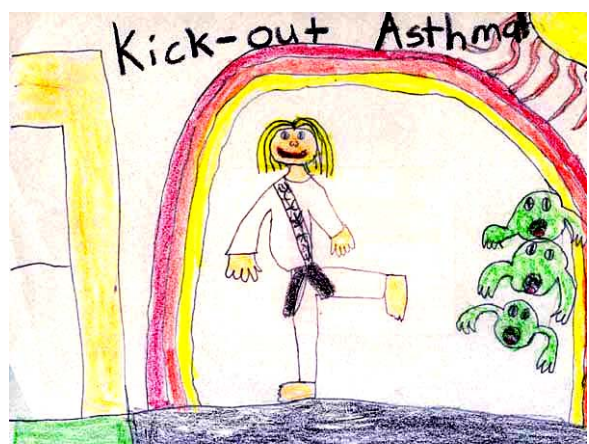
No existeix un model natural que reproduïx tots els esdeveniments (dèrmics i immunològics) que es produeixen en les lesions psoriàsiques. Els models animals són principalment ratolins amb mutacions espontànies que desenvolupen lesions psoriasiformes (flaky skin (*fsn*), dermatitis crònica proliferativa (*cpd*)) o bé ratolins/rates modificats genèticament, transgènics o models de falta de funció (*Knock out*), per a diverses de les proteïnes implicades en el procés patològic de la psoriasi (citocines: IL1- α , IL-6, IFN- γ , factors de creixement: KGF, VEGF o adhesines). A més també s'han establert models basats en el xenotransplantament i transferència limfocitària en ratolins SCID i *nude*. Tots aquests models tot i no reproduir completament les lesions, permeten reproduir algunes de les

característiques dèrmiques presents en la psoriasi; hiperproliferació, acantosi, paraqueratosi, i immunològiques; producció de citocines, infiltració i formació de microabcesos (revisat a Schön, 1999) (taula 5). Els ratolins flaki (*fsn*) desenvolupen lesions psoriasiformes de forma natural (Sundberg et al. 1997), a més s'ha vist que el transplantament de la pell afecta del ratolí *fsn* en ratolins immunodeficients (*nude*) reproduïx i manté el fenotip lesionat, demostrant-se suficients per al manteniment de la lesió. En canvi en ratolins SCID, es produeix una disminució en la proliferació. El gen heteròleg humà del *fsn*, mapa en 2p21-22. Els ratolins transgènics per a les integrines (Carrol, 1995), presenten una expressió ectòpica de la b1 integrina en les capes suprabassals de l'epidermis, desenvolupant un fenotip semblant a psoriasi.

	Proliferació i Acantosi	Diferènciació	Vascularitat	Infiltrat cèl·lular	Penetració
Esponatànies					
flaky (<i>fsn</i>)	severa	paraqueratosi focal	incrementada	cèl·lules T	100%
dermatitis (<i>cpd</i>)	alta	paraqueratosi focal	incrementada	n.d.	n.d.
Transgènics					
IL1- α	Rarament(en afecció severa)	rarament en afecció severa	n.d.	cèl·lules T (en severa)	poca
IL-6	hiperqueratosi	absent	NO	no	n.d.
IFN- γ	increment de 3-10 vegades en la proliferació	paraqueratosi en afecció severa	incrementada	cèl·lules T en dermis	5-20%
TGF- α	increment de 2 vegades en proliferació en estrat basal i acantosi	paraqueratosi local i diferènciació alterada	n.d.	cèl·lules T (variable)	n.d.
KGF	increment de 2 vegades en proliferació de queratinòcits	expressió queratines alterada	n.d.	no	n.d.
HLA-B27-h β m	alta	paraqueratosi focal	incrementada	cèl·lules T	10-80%
Integrines					
β_1	increment de 5-12 vegades en proliferació / acantosi variable (64-89%)	paraqueratosi i diferènciació alterada	incrementada	cèl·lules T	36-89%
$\alpha_2\beta_1$					
$\alpha_5\beta_1$					
K.O					
CD18	alta	paraqueratosi focal	incrementada	cèl·lules T	100%
Transferència					
CD4+	increment de 20 vegades en la proliferació	paraqueratosi i expressió de queratines alterada	incrementada		100%

Taula 5

Característiques de les lesions en els models de psoriasi (modificat de Schön, 1999).



Asma

Encara que tothom té una idea intuïtiva de què és l'asma, la definició de la malaltia és complexa, i alguns autors han comparat aquesta tasca amb la dificultat de definir la paraula amor (Gross 1980).

Inicialment el terme "asma" (del grec *asthma*, "ofec"), s'aplicava d'una forma molt laxa a les persones que tenien dificultats respiratòries. Posteriorment es va

1. Presència de símptomes respiratoris episòdics d'obstrucció de les vies respiratòries; sibilacions, respiracions curtes, opressió al pit i tos irritativa, generalment en un període de 12 mesos. La presència dels símptomes varia en el temps i al llarg del dia.
2. Presència d'obstrucció i reversibilitat mitjançant espirometria.
 - a) Obstrucció present si $FEV_1 < 80\%$ del valor predit; $FEV_1/FVC^* < 65\%$
 - b) Reversibilitat present si $FEV_1 > 12-15\%$ ($> 200\text{ml}$) després de provocació broncodilatadora.
3. Exclusió de diagnostics alternatius.

aplicar el terme asma bronquial per diferenciar-la de les dificultats respiratòries causades per la insuficiència cardíaca. Actualment però, tots dos termes són emprats com sinònims.

L'asma és una de les malalties cròniques més freqüents als països occidentals, afecta al 10% de la població general i la seva prevalença sembla augmentar de forma continuada (Burney et al. 1990). Presenta una distribució geogràfica universal i afecta a totes les edats tenint una incidència elevada en població infantil.

Malgrat les possibilitats reals de tractament, l'elevada variabilitat clínica de la malaltia i el desconeixement de les bases moleculars fan que sigui molt difícil d'establir les característiques essencials i definir uns sòlids criteris diagnòstics, de manera que l'avanç en el seu coneixement i en la millora de les teràpies ha estat limitat. La definició més consensuada és l'elaborada pel *National Heart, Lung and Blood Institute*

(NHLBI), aquesta posa l'accent en el caràcter inflamatori de la malaltia, definint l'asma com "... una malaltia inflamatòria crònica de les vies respiratòries en la qual intervenen molts tipus i elements cel·lulars, en particular, mastòcits; eosinòfils, cèl·lules T, macròfags, neutròfils i cèl·lules epitelials. En individus predisposats, factors ambientals i d'altre tipus, provoquen inflamació i dona lloc a episodis recorrents de sibilacions, dispnea, opressió al pit i tos, especialment a la nit o al matí. Aquests episodis estan generalment associats amb una obstrucció variable de les vies aèries generalment reversible, de forma espontània o després de tractament. La inflamació causa un increment de la resposta bronquial a una varietat d'estímuls; com al·lèrgens, irritants, aire fred i virus. Aquests estímuls donen lloc a una obstrucció del flux respiratori i els símptomes d'asma en el pacient amb asma..." (NHLBI 1999). Aquesta descripció engloba totes les característiques observades en la patologia asmàtica, ara bé, és de difícil aplicació en el moment d'establir criteris diagnòstics d'asma.

La diagnosi de l'asma és basa en els símptomes respiratoris i amb la presència de l'obstrucció reversible de les vies aèries (taula 6) (CIBA. Foundation Guest Symposium 1959; ATS. American Thoracic Society Committee on diagnostic standards for nontuberculous diseases 1962). Tot i que no existeixen unes característiques patològiques específiques presents en tots els pacients amb asma, la majoria presenten obstrucció variable de les vies respiratòries, una resposta positiva a teràpia antiasmàtica (broncodilatadors) i eosinofília en les parets i secrecions bronquials.

Taula 6

Criteris diagnòstics de l'asma, segons els criteris de l'NHLBI

* FEV_1 volum espiratori màxim del primer segons
FVC capacitat vital forçada

En l'estudi genètic de l'asma es poden utilitzar dues estratègies oposades per a la definició de l'asma: la utilització d'una definició molt estricta (amb la inclusió de l'edat aparició, fenotips extrems, història familiar, etc....) (Lander i Schork 1994) o bé, l'estudi dels fenotips intermedis de l'asma, en principi de naturalesa menys complexa.

Fenotips intermedis

Amb la definició de fenotips intermedis, s'engloben els diferents trets o aspectes inclosos dintre de l'etiqueta "asma", que són més fàcils de determinar, i permeten establir conjunts homogenis de característiques amb una base fisiològica comuna. Aquests fenotips consisteixen en mesures de la reversió de l'obstrucció,

mesures de la variació dels volums espiratoris, valoració de l'hiperresposta bronquial (HRB) i mesures de l'atòpia.

Síntomes respiratoris i funció pulmonar

Els símptomes respiratoris de l'asma consisteixen en sibilàncies, esbufecs, ofecs, opressió al pit, tos, atacs, els quals varien en intensitat i es presenten de forma intermitent, essent asimptomàtic entre episodis. Tant la incidència com la freqüència en què es presenten serveixen per fer una valoració de la gravetat, de manera que la descripció del patró d'aparició, duració (en els darrers dotze mesos o amb variacions estacionals) i moment de presentació (diürn o nocturn) és de gran utilitat.

Les mesures de la funció pulmonar estableixen categories del grau d'obstrucció i reversibilitat. Aquestes, s'efectuen mitjançant mètodes d'espirometria forçada amb, o sense provocació en les que es quantifica el volum espirat total o Capacitat vital forçada (FVC), el volum espirat màxim durant el primer segon (VEMS1 o en anglès FVE₁) i el quocient FEV₁/FVC. Un resultat positiu amb prova broncodilatadora (administració de broncodilatadors) és indicativa de reversibilitat de les vies. A més a més, també són utilitzades mesures continuades del flux espiratori: flux espiratori màxim (PEF) o la variació del PEF (PEFmax-PEFmim/ (100xPEFmax)).

Hiperresposta bronquial, atòpia i asma

Les relacions entre asma i aquests dos fenotips intermedis és variable i no sempre de la mateixa intensitat. Tradicionalment l'HRB i atòpia han estat considerades dos fenotips associats amb l'asma, i han estat utilitzats com a marcadors de la malaltia, encara que poden ser tractades com entitats separades amb un important grau d'encavalcament.

Hiperresposta bronquial

L'hiperresposta bronquial es defineix com la capacitat de resposta (broncoconstricció) exagerada que presenten els bronquis a una sèrie d'estímuls físics o químics inespecífics (fàrmacs, pol·lutants, aire fred, exercici, etc.).

Aquesta alteració de la resposta bronquial és una característica comuna a diverses malalties respiratòries,

però presenta una alta correlació amb asma, principalment en els casos més greus, tot i que no són dos diagnòstics intercanviables. Entre el 6-35 % de la població general presenta l'HRB (Jansen et al. 1997). La relació no és directa ni simple, la presència de l'HRB varia amb el temps, i no sempre es correlaciona amb els símptomes i les variacions en el flux espiratori. La presència d'HRB també s'ha associat amb una història d'atòpia (Soriano et al. 1996; Bodner et al. 1999).

L'avaluació de l'HRB, es pot fer de forma directa mitjançant proves de provocació amb estímuls farmacològics (administració de determinades dosi de metacolina (agonista colinèrgic), histamina, etc.) que actuen directament provocant una ràpida broncoconstricció, o mitjançant estímuls fisiològics (exercici, aire fred, etc.) que poden implicar fenòmens secundaris d'inflamació (condicionada pels mastòcits). Les mesures es fan mitjançant tècniques d'espirometria forçada, seguint uns estàndards de mesura.

La presència de l'HRB es distribueix de forma continua a la població general, no existint un punt clar de tall respecte als asmàtics. Per convenció s'accepta que un individu presenta HRB, si la FEV₁ decau un 20% del nivell basal, a una determinada dosi de *provocador* (metacolina, histamina, etc.) (PD₂₀) (Towney et al. 1979). S'ha establert un punt de tall per a la histamina de PD₂₀ < 10mg/ml d'histamina o PD₂₀ < 15/25mg/ml per la metacolina, encara que el seu ús com a llinar patològic varia entre estudis.

Atòpia

L'atòpia es caracteritza per una producció augmentada d'immunoglobulines de tipus E (IgE) en resposta a quantitats mínimes d'al·lergògens. Aquest fenomen no és exclusiu del fenotip asmàtic i es pot expressar en diferents òrgans: pell (dermatitis), vies respiratòries superiors (rinitis) o vies respiratòries inferiors (asma).

L'atòpia pot ser definida en funció dels fenotips intermedis associats: nivells elevats d'IgEs totals, presència d'IgEs específiques a determinats al·lergògens, i resultats positius de tests cutanis, enfront a una bateria d'aeroal·lergògens.

L'atòpia està present en gairebé el 80% dels pacients asmàtics però no es considera una regla d'or pel diagnòstic de l'asma, ja que no tots els individus atòpics desenvolupen asma. En els nens asmàtics, la correlació amb l'atòpia és molt alta; en canvi, no és tant evident en el cas adult. La prevalença d'atòpia en la població general s'ha estimat en 40%.

Les definicions d'atòpia, varien depenen de les consideracions de tres fenotips intermedis: nivells sèrics d'IgEs totals i/o IgEs específiques, i proves de SPT.

IgEs totals (IgEs)

Les concentracions són variables a la població general, a més, els nivells depenen de l'edat, sexe, hàbit fumador i altres malalties (Jarvis et al. 1995). Les IgEs ja són presents a les 11 setmanes de gestació i assoleixen els nivells adults a l'edat de 5 anys, mantenint-se constants durant la vida adulta, encara que amb un lleuger descens a partir dels 70 anys. En general la concentració és més alta en homes que en dones. Nivells elevats d'IgEs estan associats amb presència d'asma en població espanyola (Sunyer et al. 1996).

Les mesures es fan respecte a un patró internacional, i es referencien en kU/l, corresponent 1U a $2,4 \times 10^{-9}$ gr.

Tests cutanis (SPT)

En l'asma, els tests cutanis es realitzen de forma substitutiva a la provocació al·lèrgica en el teixit diana. La presència de positius es correlaciona amb els símptomes al·lèrgics, encara que no d'una forma inequívoca. Existeix una gran fracció d'asimptomàtics que són positius pels tests cutanis, la presència de positius és un factor de risc pel desenvolupament de rinitis, dermatitis i en menor mesura d'asma.

Els tests es realitzen col·locant a nivell de l'epidermis o de la dermis, una mostra concentrada de l'aeroal·lèrgen, i mesurant el nivell d'inflamació cutània produïda pels mastòcits de la pell. Existeixen variacions en el nivell de reactivitat (edat, sexe, raça, medicació, tipus de prova). Generalment el resultat de la prova es considera positiu de sensibilització si es forma una anella d'inflamació d'un diàmetre de >3 mm.

IgEs específiques (spIgEs)

Els nivells d'IgEs específiques en sèrum són baixos i normalment es determinen després de la determinació dels tests cutanis. Són difícils de quantificar, ja que els determinats antigènics específics no se separen fàcilment, i la seva avaluació no és tant informativa que els tests cutanis.

A la figura 6 s'indica quines són les relacions entre els distints fenotips intermedis, i l'asma.

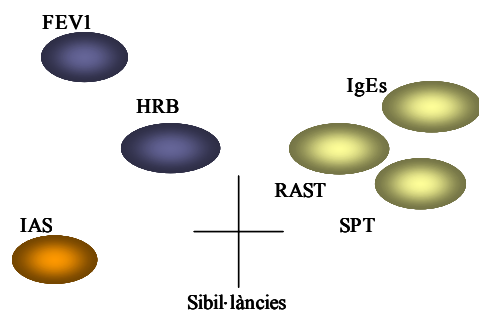


Figura 6

Relació entre els fenotips intermedis d'asma. La relació entre l'IAS i diversos fenotips parcials es mostra com un diagrama matricial. (FEV1, volum expiratori màxim en el primer segons; HRB, hiperresposta bronquial; RAST, proves de radioabsorció per a IgEs específiques; SPT, proves cutànies positives; Sibil·làncies, resposta sobre símptomes respiratoris el darrer any; IAS, índex estandarditzat d'asma) (Modificat de *Allergy*, 2001. S.Holgate)

Classificació de l'asma

L'asma és una malaltia fenotípicament heterogènia, amb una edat d'aparició, expressió clínica i progressió variable. Les classificacions que s'han fet es basen en criteris no excloents que reflecteixen aquesta variabilitat, i que alhora permeten classificar-lo en molts casos de cara a la pràctica clínica. La classificació de l'asma bronquial es pot fer en base a l'edat, etiologia o gravetat. L'ús d'algunes d'aquestes classificacions està molt estès a la literatura, però de vegades no totes tenen una significació biològica clara i diferenciada, i són de poca ajuda en els estudis genètics.

Segons la seva etiologia

Asma extrínsec: Es diferencia en atòpica i no atòpica, en el primer cas hi ha nivells elevats d'IgEs mentre que és absent en el segon cas, encara que amb tests cutanis positius.

Asma intrínsec: els nivells d'IgEs són normals i els tests cutanis negatius.

Asma induïda per aspirina: és una forma adulta, causada per una alteració de la via de síntesi de molècules proinflamatòries.

Asma induïda per exercici: és una forma principalment infantil, produïda a causa dels esforços físics ($>90\%$ infants asmàtics).

Segons l'edat

Asma del lactant, també anomenada bronquitis amb sibil·làncies, és una forma d'obstrucció bronquial amb uns components etiològics diferents a l'asma i amb un pronòstic diferent.

Asma infantil, és de presentació infantil (edat d'aparició >3 anys) amb un pronòstic menys greu que asma del lactant i amb un component al·lèrgic important. Existeix una marcada correlació entre atòpia i asma infantil.

Asma adult, és principalment de caràcter no-al·lèrgic, i diferenciada de l'obstrucció crònica molt freqüent en els adults (MOPC).

Segons la severitat

La Iniciativa Global per la prevenció i tractament de l'asma (GIA) (NHLBI 1995) establí diferències entre l'asma intermitent i l'asma persistent, distingint en aquesta darrera en asma lleu, moderada i intensa (o greu) segons la presència de símptomes respiratoris i per la mesura de la funció pulmonar (taula 7).

Taula 7
Classificació de l'asma, segons la severitat i els criteris del NHLBI

	Símptomes respiratoris	Funció pulmonar
Intermitent	intermitents, lleus <1/mes asíntomatic entre episodis	FEV ₁ >80% Var <20%
Persistent	lleu persistents, lleus >1/mes, <1/sem asma nocturna asíntomatic entre episodis	FEV ₁ >80% Var <20-30%
	moderada persistents >1/sem, <1/dia asma nocturna medicació diària	FEV ₁ >60-80% Var <30%
greu	> crisi freqüents síntomes diaris asma nocturna	FEV ₁ >60% Var <30%

Altres classificacions

Asma ocupacional o professional

Fa referència a l'asma produïda per la presència d'al·lèrgens al lloc de treball. Un 10 % de l'asma adult és de caràcter ocupacional, normalment desapareix després de l'eliminació de l'agent al·lèrgic. Aquests poden ser de tipus animal, vegetal i químic

Asma de risc vital

També anomenada fatal o mortal, fa referència als casos d'asma amb mort, encara que altres factors externs,

més que propis de la mateixa malaltia estan en la base del desenllaç.

Epidemiologia de l'asma

Les dades de l'epidemiologia de l'asma sovint fan referència d'una forma indistinta, i de vegades, confusa, a la presència de símptomes respiratoris i a l'asma diagnosticada sent molt important la comparació de les definicions per estandarditzar els resultats.

Prevalença

La prevalença dels símptomes i de l'asma diagnosticada varia entre diferents poblacions i també entre adults i infants, amb valors que oscil·len entre 1,9% i 20% (figura 7). Dos estudis multicèntrics realitzats en població general; adulta (20-44 anys) (*The European Community Respiratory health Survey, ECRHS.1994*) (Burney et al. 1994) (ECRHS 1996) i infantil (10-14 anys) (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, ISAAC*) (ISAAC 1998), han evidenciat una gran variació de la prevalença entre països i també dintre del mateix país. Ambdós posen de manifest que la prevalença d'asma és molt més alta en poblacions de parla anglesa (Regne Unit, Austràlia, Nova Zelanda, Irlanda i Canadà) i més baixa a països de l'Àsia i l'Àfrica. A Europa en general la prevalença és molt més baixa i heterogènia en el sud que en els països del centre i del nord. Quant a la variació dintre de països, la variació és molt menys important, encara que en alguns països s'ha observat grans variacions regionals, entre ells, Espanya (Grupo español del estudio europeo del asma 1995).

Les dades més fiables de la prevalença d'asma en població espanyola són el resultat de la col·laboració en els estudis ECHRS i ISAAC. En tots dos es posa de manifest la menor prevalença a Espanya respecte altres països europeus. En el cas de la població entre 20-44 anys l'asma en curs varia entre el 2,1% i el 6,3% (Grupo español del estudio europeo del asma 1996), mentre que en població escolar (6-14 anys) varia entre 6,3 i 16,3%.

Edat: asma infantil i asma adult

L'asma és una malaltia molt freqüent durant la infància (5-10%). Diversos estudis indiquen un 20-43% dels nens amb símptomes presenten la malaltia durant l'edat adulta (persistència) (Jenkins et al. 1994). Per sexe, la incidència és més alta en nois, però la persistència és

més alta en dones. La funció pulmonar disminuïda, la freqüència i numero d'atacs, l'edat d'aparició dels símptomes, la severitat de la malaltia, la presència d'atòpia, l'HRB i la presència d'antecedent amb asma a la família i a la infància, són factors de risc per a la persistència en edat adulta. Els casos de remissió són rars després dels 30 anys

Respecte a l'evolució dels símptomes d'asma des de la infància, s'ha diferenciat dos grups de nens, per etiopatogènia i evolució: asma del lactant (o bronquitis sibil·lant) i asma infantil (Martinez et al. 1995). Els primers són aquells que presenten símptomes abans del 3 anys i que desapareixen després dels sis, generalment associats a deficiències congènites de les vies respiratòries i problemes de viriasi, sense cap pronòstic d'asma adolescent o adulta, però que pot estar associat a malaltia pulmonar obstructiva crònica. Els altres presenten una funció pulmonar normal en néixer, i que poden ser sibilants tardans (edat superior a tres anys), presenten sibilacions als sis anys, i desenvolupen generalment asma en edat adolescent i adulta. Aquests nens asmàtics, tenen associats riscos com atòpia, HRB, familiars amb asma, i poden tenir una funció disminuïda (amb >6 anys) com a conseqüència del curs de la malaltia. No existeixen marcadors clars per diferenciar aquest dos grups, encara que s'ha proposat com a marcador del nen asmàtic uns nivells elevats d'IgEs en el primer any.

L'asma en adults és més difícil de classificar degut a l'encavalcament de la simptomatologia amb altres trastorns. Malgrat les dificultats en la definició de l'asma en adults (Dodge et al. 1986), s'ha estimat que el 50 % dels casos és d'aparició en edat adulta (Bodner et al. 1997). La presència d'atòpia és un dels factors de risc per l'asma d'aparició adulta (Bodner et al. 1998). Entre els adults el 30-70% són al·lèrgics, mentre que gairebé un 10% casos és asma ocupacional, lleugerament inferior en la població espanyola (Kogevinas et al. 1996). Entre els majors de 40 anys prop de la meitat presenten asma intrínsec amb proves SPT negatives però eosinofília persistent.

En el cas de la població espanyola, encara que amb una prevalença en adults més baixa que la mitjana europea, la incidència és similar a la de llocs amb més alta prevalença (Basagana et al. 2001), la qual cosa s'ha interpretat com indicador que els determinants de risc i les seves variacions poden ser importants a nivell de la població infantil més que en el cas de la població adulta (Sears 1997).

Figura 7
Prevalença màxima observada en asma adult i infantil en població espanyola i diverses poblacions. Dades dels estudis ISAAC i ECRHS.

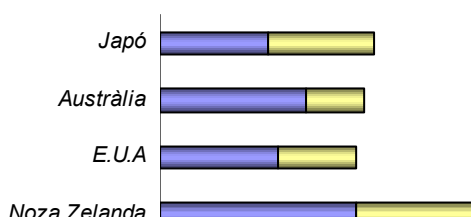
Sexe i raça

La prevalença és diferent per sexe, en l'edat infantil és més freqüent en homes. Aquesta tendència s'equilibra en l'adolescència i finalment és més freqüent en dones que en homes durant l'època adulta. La taxa d'incidència és més elevada en el sexe femení (Basagana et al. 2001).

Quant a les races, no sembla haver diferències importants, i quant s'han observat és difícil diferenciar l'efecte de les condicions socials, culturals i el grau d'educació en el coneixement i tractament de la malaltia, de les diferències en la predisposició genètica (Aligne et al. 2000).

Mortalitat i severitat Increment de la prevalença

La mortalitat de la malaltia és reduïda, aproximadament entre 0,2-6,8/100000 habitants i any per a edats entre 5 i 35 anys. En el cas d'Espanya, les dades són molt variables (però és una de les més baixes d'Europa, (0,1-0,4/100000 habitants) (Bellido iSunyer 1997).



La prevalença de l'asma ha augmentat en les darreres dècades (Burney et al. 1990). Estudis epidemiològics de tall longitudinal en la mateixa població han posat de manifest, variacions del 4% al 10% (Ninan i Russell 1992). Malgrat les estimacions discordants de la taxa d'augment i les dificultats en l'homologació d'aquest tipus d'estudis, no n'hi cap que hagi posat de manifest un descens de la prevalença.

Les raons per aquest augment s'atribueixen a diverses causes no excloents: canvis en l'estil de vida, augment de la càrrega d'al·lèrgens, augment de la pol·lució, canvis de dieta (p.ex. increment en l'ús d'antioxidants, consum de sal) o la disminució de les infeccions infantils han estat proposats com a causa de l'increment de la prevalença.

Estudis comparatius en poblacions rurals/urbanes de l'Àfrica, i en ciutats alemanyes de l'est/oest, posen de manifest que certs aspectes de l'estil de vida occidental tenen incidència en una major prevalença de l'asma tant en poblacions africanes com europees (von Mutius et al. 1994; Yemaneberhan et al. 1997). A més, en estudis de cohorts s'ha observat un augment de la prevalença durant el procés d'occidentalització dels hàbits en les ciutats de l'antiga Alemanya de l'est (von Mutius et al. 1998).

Juntament amb l'augment de la prevalença, s'ha observat un augment de la morbiditat i de la mortalitat. Aquest, s'ha atribuït a l'increment general de la prevalença (i per tant de la mortalitat associada), o bé directament del grau de severitat de la malaltia. Des de la meitat de la dècada dels anys 70 i meitat dels 80 es va observar un augment de la mortalitat en la franja de població d'entre 5-34 anys en molt països (amb l'excepció de pocs països, entre els quals hi és Espanya entre d'altres) (Sears 1992). En el cas de les epidèmies observades a Nova Zelanda durant els anys 60 i 70, els increments de la taxa de mortalitat es van associar amb canvis en la medicació (introducció de determinats beta-agonistes en el tractament), però en altres casos hi va haver present un efecte en successives generacions, no atribuïble a l'efecte de la medicació, la qual cosa és atribuïble a un increment de la incidència (Burney 1998).

Factors com l'accessibilitat a l'ajuda mèdica, tipus d'ajuda mèdica, factors socioeconòmics i factors ètnics poden afectar la mortalitat, més enllà d'un increment directe de la severitat de la malaltia (Gottlieb et al. 1995a). Respecte a la mortalitat, diverses causes artefactuals alienes a la mateixa malaltia poden afectar l'estimació de les taxes de mortalitat: canvis en el grau de reconeixement de la malaltia pels propis malalts, canvis en la diagnosi per part dels metges fins i tot canvis administratius com la manera de codificar les defuncions

per asma sotmesa a uns criteris canviants al llarg del temps (*The International Code Disease (ICD)*).

Factors de risc de l'asma

Els factors de risc agrupen totes les circumstàncies que d'una forma directa produeixen l'asma, o bé l'aparició dels símptomes de la malaltia.

Es diferencia entre factors *predisposants* (p.ex. atòpia), *causants* (p.ex. al·lèrgens) i *contribuents* (p.ex. pol·lutants, tabac, infeccions, dieta). Factors *causants* i *contribuents* s'anomenen com a factors secundaris (provoquen l'aparició dels símptomes i increment de la severitat) en front dels factors predisposants o primaris que serien els causants de l'aparició de nous casos (taula 8). L'efecte de risc d'aquests factors varia en els diferents estadis de la vida, i depenent de la raça (Becklake i Ernst 1997).

Al·lèrgens

Els al·lèrgens generalment són petites partícules respirables de distribució ubiqua, l'exposició als quals incrementa el risc de sensibilització, i també el risc d'empitjoraments episòdics. Els més comuns són proteïnes que provenen de diverses fonts; d'ambients tancats "interns", com proteïnes dels àcars de la pols, d'escarabats, de la pell dels animals o fongs, o bé d'ambients "oberts" com el pol·len de plantes (*Parietaria*, *Chenopodium*, *Artemisa*, *Ambrosia*, *Plantago*, etc.) i arbres (*Olea*, *Cupressus*, *Platanus*, etc.). La seva distribució i persistència determina un diferent grau de sensibilització en els individus. Un cas apart, per la seva especial localització, són els anomenats al·lèrgens ocupacionals, el risc dels quals depèn de l'exposició en el lloc laboral.

La sensibilització als àcars de la pols és la de major prevalença al món. La causalitat entre la presència de l'al·lèrgen varia depenent de la zona. En el cas espanyol, el 32% dels pacients d'asma tenen una component al·lèrgica (mesurada per spIgEs i SPT). De manera similar a la resta de món, la prevalença a l'àcar de la pols és la més alta, sent més important la dels al·lèrgens interns que exteriors. Només la presència de tres al·lèrgens (àcars de la pols, herba comuna i pol·len d'olivera) determina el 92,6% dels casos afectes (Soriano et al. 1996).

Alguns autors hipotetitzen que l'augment de prevalença de la malaltia es deu a un augment de la càrrega al·lèrgica de l'ambient, i encara que no s'ha demostrat una major càrrega, sí que han variat determinades característiques que poden estar associades

a una sensibilització més eficient, com l'aïllament de les cases, la calefacció, l'ús de moquetes, etc.)

Taula 8

Principals riscos per l'inici i desenvolupament de l'asma (Beckale, 1997). Marcats amb negreta estan els factors de risc establerts com a riscos primaris

	determinants	Tipus*
Hoste	factors genètics	P
	història d'al·lèrgies (materna)	P
	atòpia	P
	raça i origen ètnic	P
Ambientals	exposicions laborals (isotociants)	P
	pol·lució per al·lèrgen extern	P
	exposició postnatal a al·lèrgens de la llar	P/S
	infeccions víriques	S/P
	exposició al tabac	S/P
	estils de vida canviants	
	pol·lució dels cotxes	
	dietes, manca d'al·letament, falta d'infeccions	S/P
	característiques de la llar; humitat, gas, moquetes,	S
	desavantatges socioeconòmic	S

Pol·lutants: tabac, trànsit

Entre els pol·lutants més importants estan els derivats de la contaminació deguda al trànsit, elements com el biòxid de nitrogen (NO₂) i biòxid de sulfur (SO₂) aporten un risc a la severitat de la malaltia (Sunyer et al. 1997). Respecte el NO₂, experiments de laboratori han demostrat que l'exposició a NO₂ augmenta els efectes de l'exposició a al·lèrgens.

Pel que fa al fum del tabac, encara que no hi ha evidències clares que els fumadors tinguin una predisposició a patir asma, diversos estudis l'han relacionat amb la presència d'HRB. Seria més un factor secundari. En el cas dels infants (fumadors passius) la presència d'un pare fumador està relacionada amb el grau de severitat de la malaltia, amb pitjors símptomes en fills de mares que fumen (Murray i Morrison 1988). Els nens amb un pare fumador (principalment si és la mare) tenen un risc augmentat de patir asma (20%) o sibilàncies (40%). L'efecte pre i post natal és difícil de distingir, però els fills de les mares fumadores tenen una funció pulmonar disminuïda poc després del naixement, la qual cosa es relaciona amb un risc de patir sibilàncies (Martinez et al. 1995).

Infeccions

Les infeccions víriques determinen episodis d'empitjorament tant en adult com en infants. Existeixen estudis contradictoris en els que certes infeccions (xarampió) en l'infant tenen caràcter protector per a una posterior sensibilització, atribuït a un canvi en patró de resposta immune, mentre que altres infeccions, com la del virus respiratori sincicial (VRS) té un efecte contrari, augmentant el risc de sibilàncies (Martinez, 1999).

Altres causes de risc

Factors de característiques diverses han estat reportats com a factors de risc: tempestes elèctriques, edat materna, al·letament matern (relacionat en patró d'infeccions associades a sibil·lacions), la dieta (sal, magnesi, antioxidants, etc.), etc.

El fenotip asma en els estudis genètics

La definició de què és un pacient asmàtic és important per al metge en el moment de determinar el protocol més adient de tractament, però en el cas del genetista no és pas menys important. La classificació errònia dels pacients dificulta l'establiment d'un grup homogeni, i incrementa la presència de variables de confusió.

En la major part dels estudis epidemiològics i genètics, l'asma es defineix com la presència d'un o més símptomes respiratoris, referits a un període de temps recent que sol ser de 12 mesos, i una prova d'HRB, generalment a la metacolina, positiva; és el que s'anomena "*current astma*" o asma en curs (Toelle et al. 1992).

En els estudis genètics s'han utilitzat diverses formes de definició del "fenotip genètic" asma, revisat a Koppelman *i col·l.*, 1999 (Koppelman et al. 1999). A continuació, es llisten alguns dels procediments més comuns

Diagnòstic

El diagnòstic d'asma depèn de l'edat del pacient i es basa en la història clínica del pacient, de la família i en mesures de fenotips intermedis. El diagnòstic pot estar basat en els símptomes (diagnòstic clínic), en l'anàlisi de certs paràmetres analítics (diagnòstic analític) (en pacients de més d'un any) o bé en l'estudi de la funció respiratòria (diagnòstic funcional) (en pacients a partir de 5-6 anys).

Qüestionaris

Són procediments que incorporen una sèrie de preguntes amb criteris unificats de diagnòstic sobre la presència dels símptomes d'asma (sibilàncies, esbufecs, opressió al pit i tos), la presència d'atacs, presència diürna o nocturna dels símptomes, freqüència dels atacs i la medicació en ús. Els que tenen un ús més generalitzat són: el proposat per l'International Study of Asthma and Allergy in Children (ISAAC) en el cas d'asma infantil i el de l'European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) i el de l'International Union Against Tuberculosis and lung Disease (IUATLD) en cas de l'asma en adults. A més, s'han desenvolupat vídeoqüestionaris, per tal d'evitar possibles problemes lingüístics, en aquests casos s'ha observat una correlació molt alta en quant al grau de detecció dels símptomes.

Fenotips intermedis

Alguns dels fenotips intermedis tenen una distribució continua (p.ex. nivells d'IgEs, PD₂₀) per la qual cosa s'han assumit un valor llindar per consens, encara que els nivells bassals poden ser diferents en cada població (p.ex. nivells patològics d'IgEs).

Funció respiratòria

Les mesures de la funció han d'estar perfectament estandarditzades, degut a la variació respecte la tècnica i diversos paràmetres modificadors (p.ex. sexe, edat, etc.).

Mesures d'atòpia

La definició d'atòpia varia en diversos estudis, englobant una o més mesures de l'atòpia. La comparació objectiva de cadascuna per separat millora l'objectivitat de l'estudi.

Resposta a medicació

Amb això es fa referència a un diagnòstic a posteriori, per la medicació. El diagnòstic per la resposta a la medicació afegeix un grau d'incertesa a l'homogeneïtat de la mostra.

Mesures d'asma: "score"

Són maneres d'establir una mesura objectiva que englobi diverses mesures de l'asma. Han estat utilitzats en diversos estudis i són combinacions de qüestionaris i/o mesures de fenotips intermedis.

Malalties obstructives relacionades amb l'asma

L'asma és una malaltia obstructiva de les vies aèries que degut a la seva expressió variable pot ser confós amb altres manifestacions obstructives, principalment en els individus adults. Les malalties pulmonars d'obstrucció són aquelles en les que hi ha present una limitació del flux espiratori màxim, i es caracteritzen per tenir un quocient FVE₁/FVC <70% sense reducció de la capacitat pulmonar total (Barbera J.A i Cosío M.G 1995).

A continuació es resumeixen algunes de les malalties obstructives diferenciades de l'asma.

Malaltia pulmonar d'obstrucció crònica (MPOC)

La MPOC, és una malaltia obstructiva crònica que és caracteritzada per un augment de la resistència al pas d'aire i una pèrdua d'elasticitat pulmonar, però que a diferència de l'asma, un cop establerta no presenta recuperació completa del flux aeri, a més és característica d'individus adults (>50anys) normalment homes amb antecedents de fumador. El tabac el factor de risc més important, a més d'altres, com la contaminació ambiental, l'exposició laboral, les infeccions virals infantils i el tabac passiu.

La seva alta prevalença en l'edat adulta, fa que pugui confondre's amb asma en els casos d'individus de risc (fumadors), encara que la falta de reversió de l'obstrucció és definitiva de la MPOC.

La bronquitis crònica (BC), definida com la presència de tos i d'expectoracions (>3 mesos seguits) i l'emfisema pulmonar (eixamplament dels alvèols per destrucció de parènquima pulmonar), són dos característiques presents a MPOC, encara que no en són diagnòstiques.

Es considera que l'asma, la bronquitis crònica i l'emfisema són expressions diferents d'una mateixa malaltia. Considerant l'asma com un pas intermedi dintre de l'evolució global de la patologia obstructiva respiratòria crònica. Aquesta idea formulada originàriament per metges holandesos es coneix com la hipòtesi holandesa (DH). Factors determinants de l'hoste (predisposició a HRB o atòpia), modulats per edat i sexe interaccionen amb factors ambientals en l'origen de la MPOC. L'HRB, s'ha demostrat un factor de risc per MPOC, en tant que disminueix la funció respiratòria, mentre que el paper de l'atòpia és menys clar. Malgrat que no ha pogut ser demostrada, alguns autors proposen

que els termes asma, bronquitis i emfisema no han de ser considerats com a entitats patològiques separades (Sluiter et al. 1991).

Enfront a aquesta consideració, l'escola anglesa, separa entre patologies d'obstrucció variable respecte de les d'obstrucció crònica, per la diferent etiologia, fisiopatologia i curs evolutiu de la malaltia.

Bronquiectàsies, Sarcoïdosi, Fibrosi Quística

Aquestes malalties s'engloben en el que s'anomena alteracions obstructives mixtes, que més d'una disminució dels fluxos espiratoris, causen una disminució del volum pulmonar.

Bronquiectàsies

Són dilatacions anòmales i permanents dels bronquis cartilaginosa amb destrucció del component muscular i elàstic de la paret bronquial. És una alteració produïda per diverses malalties que modifiquen o destrueixen les estructures de suport de la paret bronquial (p.ex., infeccions permanents o factors de predisposició). Pot presentar-se en processos al·lèrgics com l'aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica (ABPA), processos d'obstrucció bronquial (bronquitis crònica, fibrosi quística), com a resultat de dèficits de antitripsina o en processos associats a immunodeficiències.

Sarcoïdosi

És una malaltia d'etiologia desconeguda caracteritzada per l'acumulació de cèl·lules limfoides Th i monòcits, i la formació de granulomes en els teixits afectes (pulmó, ganglis mediastí, pell i ulls).

Fibrosi quística (FQ)

La presència de cicles d'inflamació i d'infecció continuada que caracteritza el curs de la malaltia pot produir obstrucció, amb el desenvolupament de bronquiectàsies. Més endavant s'introdueix de forma específica la relació de la FQ amb l'asma.

Anatomia i fisiologia dels bronquis

Les vies respiratòries superiors són l'òrgan diana de l'asma. A continuació es fa una breu descripció dels components estructurals i dels principals tipus cel·lulars que es troben a les vies aèries.

Les vies estan disposades de forma ramificada en el que s'anomena l'arbre traqueobronquial. L'arbre es diferencia entre vies superiors i inferiors, les primeres abracen des de les fosses nasals fins a la carena traqueal mentre que les inferiors comprenen la resta, fins als alvèols. Els conductes superiors es caracteritzen per tenir un suport cartilaginós que a la tràquea es presenta en forma d'anells complets i que a les parts distals (bronquis) són de forma irregular o absent (bronquíols).

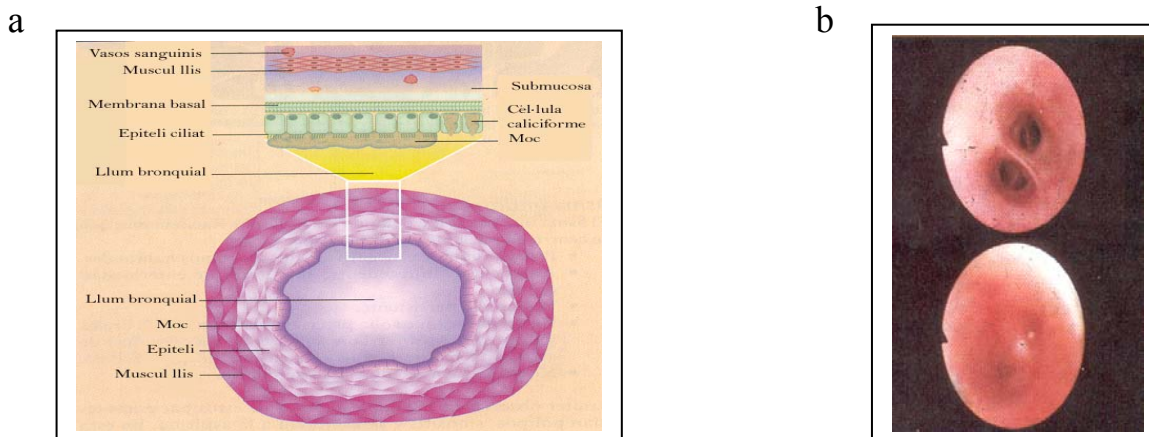


Figura 8

Estructura de les vies aèries. (a) esquema d'una secció transversal d'un bronqui amb els principals components presents a la paret, i (b) aspecte real dels conductes respiratoris en situació normal (superior) i en una condició d'obstrucció (inferior).

Tots ells formen el que s'anomena la part conductora de les vies, sense cap mena de funció en l'intercanvi gasós. Les darreres divisions dels bronquíols ja tenen funcions pròpiament respiratòries (bronquíols respiratoris) i de cadascun d'ells en surt la unitat respiratòria, anomenada

acinus respiratori, formada pels conductes i sacs alveolars.

Composició de la paret bronquial

Es distingeix des de la llum de la via, dues capes (mucosa i submucosa) envoltades per una membrana serosa (membrana adventícia). La mucosa es diferencia en epitelí i el teixit subjacent, i esta formada per teixit connectiu, limfoide, vascular i nerviós. En la submucosa, es troben els nervis, músculs i les glàndules mucoses. A la figura 8 s'esquematitza l'estructura de la paret bronquial, i l'aspecte normal i patològic dels bronquis. A la taula 9 es troben indicades algunes dels tipus cel·lulars presents a la paret bronquial.

Taula 9

Tipus cel·lulars presents a la paret bronquial i principal funció.

Epitelí	Funcions
cèl·lula ciliada	moviment mucus / fluid periciliar /secretora
cèl·lula mucosa	secreció mucus acid/absorció / proliferativa
cèl·lula serosa	secreció mucuds neutre / fluid periciliar / proliferativa
cèl·lula clara DCG	surfactant / proliferativa neurosecretora
cèl·lula basal	proliferativa
limfòcit	immunoreactiva
leucòcit	inflamació
Submucosa	
cèl·lula serosa	secreció mucus neutre / lactoferrina / lisozima / antiproteases
cèl·lula mucosa oncòcit	secreció mucus acid / proliferativa regulació de l'equilibri iònic
mioepitelials	expulsió mucus
cèl·lula endocrina	reguladora de secreció i vasculatura
limfòcit	immunoreactiva
nervi	reguladora de la secreció
intraacinar	
Neuronal	
NEB*	regulació del to bronquial i vascular / control de la secreció
terminals nervioses	broncoconstricció / secreció / moviment cilíar

*NEB, cossos neuroepitelials

L'epitelí està cobert d'una superfície humida i estèril degut a les secrecions de les cèl·lules caliciformes, les glàndules mucoses, proteïnes derivades del torrent sanguini, diverses secrecions de les cèl·lules plasmàtiques i epitelials (IgA i IgM) que formen una barrera de defensa física, que atrapa les partícules nocives i permet la seva mitjançant l'activitat cilíar de l'epitelí. L'epitelí descansa sobre la membrana basal, absent en l'edat fetal, que es diferencia en dues capes (*lamina lúcida* i *lamina bassal*) els components principals de les quals són el col·lagen tipus IV, proteoglicans, laminina i fibronectina. En humans es pot distingir una tercera capa externa a la lamina basal, anomenada *lamina reticularis*, que conté fibres de col·lagen de tipus III i V a més de fibronectina.

Les glàndules submucoses estan presents en totes les vies aèries cartilaginoses, ja presents des del naixement i el seu número no varia en l'edat adulta. La descarrega es produeix l'acció de cèl·lules mioepitelials controlades per terminacions nervioses adjacents; tant de les fibres adrenèrgiques com NANC (no adrenergic-no colinèrgic).

A l'epitelí hi ha presents terminacions nervioses lliures, que corresponen a les fibres sensorials "C", relacionades amb reflexos locals que produeixen una estimulació de la secreció mucosa, broncoconstricció i vasodilatació. A la submucosa es troben fibres eferents del sistema autònom (colinèrgiques i adrenèrgiques) i fibres aferents (sensorials). El control colinèrgic i adrenèrgic de les estructures efectores dels bronquis; glàndules submucoses, múscul llis i vasculatura, és de caràcter estimulador (muscarínic colinèrgic, α -adrenèrgic) i inhibidor (β -adrenèrgic). A més del clàssic control colinèrgic i adrenèrgic, les fibres NANC, implicant neuropèptids i derivats d'ATP com a neurotransmissors en el sistema respiratori, té funcions estimuladores (broncoconstrictor) i inhibidores (broncodilatador). Entre els pèptids reguladors hi ha: CGRP (de l'anglès *calcitonin gen related peptide*), Neuropeptid Y, neurokinines (NKA/NKB), SP (substància P), VIP (de l'anglès, *vasoactive intestinal polypeptide*).

Cèl·lules immunocompetents

En condicions normals es poden trobar com a cèl·lules residents a l'epitelí diverses cèl·lules immunocompetents. Mastòcits (aprox. 2% de superfície epitelial), cèl·lules dendrítiques (DC), limfòcits (IEL; limfòcits intraepitelials), tant limfòcits de tipus α/β com γ/δ .

En el subepitelí i en la submucosa la presència de cèl·lules immunocompetents està més organitzada, presentant-se organitzats en nòduls limfàtics, nòduls limfoepitelials o BALT (de l'anglès, *bronchial associated lymphoid tissue*) i agregats limforeticulars. A part es poden trobar diversos tipus cel·lulars lliures, residents o en trànsit: Cèl·lules plasmàtiques, limfòcits T ($CD4^+$, $CD8^+$), macròfags i mastòcits (la major part associats als teixits subepitelials).

Patofisiologia de l'asma

Les lesions presents a nivell bronquial es caracteritzen per una pèrdua per descamació de l'epitelí respiratori, augment del gruix de la *lamina reticularis*, hipertròfia i hiperplàsia del múscul llis i de les glàndules submucoses, augment de cèl·lules caliciformes, canvis en la composició del mucus, alteracions en la capacitat mucociliar de l'epitelí, oclusió de la llum bronquial per

un cúmul de mucus i infiltració inflamatòria massiva de les vies respiratòries (tant a la paret com a la llum),

Com a conseqüència de la inflamació persistent a les vies aèries es produeix un engrossiment i remodelació de l'estructura de la paret, remodelació difícilment reversible i que és més important en els bronquïols on provoca un increment de resistència al pas de l'aire i un augment de la sensibilitat a estímuls constrictors. Aquesta remodelació es produeix per diversos mecanismes (edema, deposició de col·lagen, factors de creixement, etc) (Elias, 1999).

Inflamació al·lèrgica i hiperreactivitat bronquial són les principals alteracions presents en la patologia asmàtica. A la figura 9 s'han resumit les principals vies implicades en el procés patològic de l'asma. A continuació es descriuen quines són les característiques d'aquests processos.

Inflamació

La inflamació massiva de la paret i de la llum bronquial és molt important en els pacients amb asma. En l'asma la natura de l'infiltrat cel·lular és específica de l'asma i difereix d'altres processos obstructius similars (p.ex., MPOC) (Barnes 2000) i a diferència d'altres malalties obstructives existeix una deposició d'IgEs en la paret (epiteli, glàndules submucoses, lamina basal).

Es poden distingir dues fases (primerenca/tardana) en la inflamació, cadascuna de les quals es caracteritza per una població de cèl·lules implicades diferent: mastòcits, basòfils, eosinòfils i limfòcits.

Limfòcits

Són presents tant en la fase primerenca com en la tardana. La població de limfòcits T estan augmentada en número i presenta un estat d'activació en els pacients amb asma. Més endavant es parlarà específicament d'aquesta població de cèl·lules.

Mastòcits i Basòfils

Són les cèl·lules responsables de la fase primerenca de la reacció al·lèrgica. El seu paper en l'asma ve determinat per l'activació produïda per la presència de receptors d'IgEs a la membrana. La unió "al·lèrgen-receptor", produeix l'activació, amb l'alliberació i síntesi de mediadors. Els mastòcits són presents en gran nombre a la mucosa respiratòria i encara

que el seu número no sembla augmentar en asma, presenten un estat de continuada activació. Aquesta produeix una alliberació de mediadors inflamatoris i immunològics (sintetitzats i *de novo*), procés que és coneix com a reacció anafilàctica, amb alliberació diverses citocines (IL-4, 5, 6, 13 i TNF), mediadors lipídics de la inflamació (PGD₂, LTC₄, PAF) i altres mediadors (histamina, heparina, triptasa, quimasa).

Els efectes patològics de l'acció dels basòfils són principalment a nivell de disrupció de l'epiteli, deposició de col·lagen (activació de fibroblasts), secreció mucosa, contracció muscular, eosinofília i augment de la permeabilitat vascular.

Aquestes cèl·lules poden respondre a diversos estímuls no-IgE, suggerint que poden estar implicades en fenòmens d'homeostasi i immunoregulació.

Eosinòfils

Són les principals cèl·lules implicades en la fase tardana de la inflamació asmàtica, i les que estan més augmentades en número, la qual cosa freqüentment ha fet que es parlés de l'asma com a bronquitis eosinòfila. Diversos estudis han demostrat una important associació entre la severitat de l'asma (FEV₁ i l'HRB) amb el número d'eosinòfils i la quantitat dels productes alliberats pels eosinòfils (Bentley et al. 1992).

La infiltració i activació d'eosinòfils és produïda per l'acció combinada de molècules d'adhesió, citocines i quimocines (GM-CSF, IL-3 i 5, i eotaxina), que actuen a diferents nivells; (a) induint la diferenciació a nivell de medul·la d'os, (b) per quimiotaxis d'eosinòfils del torrent sanguini i (c) per l'activació *in situ* de les cèl·lules.

Els eosinòfils activats alliberen múltiples mediadors inflamatoris: grànuls de proteïnes, enzims proteolítics, mediadors lipídics, metabòlits d'O₂, citocines i quimocines. L'alliberació de les proteïnes dels grànuls i els metabòlits d'O₂ produeix un important dany epitelial. Els grànuls proteics contenen productes citotòxics entre els quals hi ha hidrolases lisosòmiques i diverses proteïnes específiques; proteïna catiònica major (MBP), proteïna catiònica d'eosinòfils (ECP), peroxidasa (EPO), neurotoxina (EDN). Els principals mediadors farmacològics produïts pels eosinòfils són el PAF i els leucotriens LTC₄, LTD₄ i LTE₄. A més certes poblacions tenen la capacitat de sintetitzar mediadors immunològics: citocines i quimocines (IL-3, IL-5, GM-CSF, RANTES, etc.) de forma poden retroalimentar la inflamació.

A la taula 10 es resumeixen algunes de les funcions dels mediadors immunològics rellevants en el desenvolupament i/o progressió de l'asma.

Al·lèrgia

La presència de reaccions d'hipersensibilitat immediata (al·lèrgica) és una de les causes de l'asma, i la que produeix la inflamació eosinofílica característica.

Aquest fenomen d'hipersensibilitat es deu a la sensibilització no patològica en front determinats antigens ambientals. En les vies respiratòries normals, la presència d'un al·lèrgogen provoca una ràpida resposta d'obstrucció bronquial, que en el cas dels asmàtics és exagerada i pot convertir-se en crònica.

La presència d'un al·lèrgogen a les vies respiratòries en un primer contacte, es detecta a nivell de les cèl·lules dendrítiques presents a l'epiteli, les quals processen l'antigen i migren als nòduls limfàtics locals sensibilitzant una població de cèl·lules T. En un segon contacte antigènic, al·lèrgogen és presentat per les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) a les cèl·lules T sensibilitzades (o cèl·lules memòria) (CR45RO⁺), en un procés que presenta restricció per molècules de MHC de classe II. A més de les dendrítiques altres cèl·lules presents als bronquis expressen aquestes molècules; cèl·lules epitelials, limfòcits T activats, limfòcits B, macròfags i fibroblasts. Com a conseqüència d'aquest segon contacte, es desencadena la resposta d'hipersensibilitat, amb l'alliberació de citocines

proinflamatòries (IL5, IL3) i de l'IL4 que intervé en la regulació de la producció d'IgEs.

Hiperresposta bronquial

L'HRB implica, tant fenòmens d'hipersensibilitat com d'hiperreactivitat. El seu origen ha estat associat amb la presència de la inflamació i també amb alteracions del sistema de control neuronal; adrenèrgic, colinèrgic i NANC. Els mecanismes nerviosos, musculars, mecànics, estructurals i inflamatoris que causen l'hiperresposta bronquial poden actuar de forma conjunta. Existeix una correlació entre la inflamació i la severitat de l'HRB. Molts dels factors irritants que provoquen l'aparició de l'HRB (p.ex. tabac, gasos irritants), produeixen una degradació de l'epiteli i l'exposició de les terminals neurogèniques, contribuint a l'HRB (fenomen d'inflamació neurogènica). Aquesta degradació afavoreix el contacte amb al·lèrgogens, productors de la inflamació, i el manteniment del cicle. Models animals murins han implicat les quimocines en els processos d'HRB (revisat a Blease, 2000). D'altra banda el remodelatge de les vies aèries, pot contribuir de forma important al seu desenvolupament (Boulet et al. 1997).

També s'ha relacionat amb les cèl·lules limfoides T γ/δ i el control que exerceixen sobre el to muscular, encara que es desconeix a través de quin mecanisme (De sanctis, 1995).

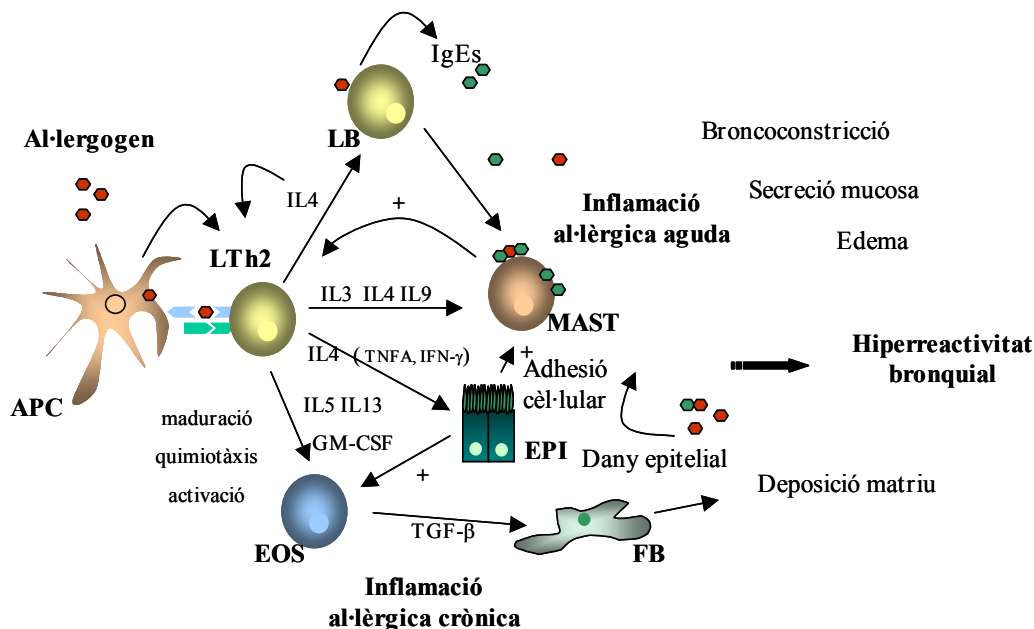


Figura 9
Mecanisme molecular i cel·lular implicat en la patologia de l'asma. Moltes de les alteracions observades en l'asma estan produïdes per l'exposició a una molècula al·lèrgica i l'aparició d'una resposta inflamatòria. El caracter crònic d'aquesta pot comportar canvis en la matriu extracel·lular de la paret bronquial i un increment de l'HRB. APC, cèl·lula presentadora d'antigen; L, limfòcit; MAST, mastòcit; EOS, eosinòfil; EPI, cèl·lula epitelial; FB, fibroblast. +, quimiotàxis.

Taula 10

Funcions de les citocines i quimocines rellevants a la progressió de l'asma. Les citocines tenen una funció pleotropla i redundat. A la taula s'indica les funcions implicades en l'orquestració de la resposta al·lèrgica

Citocines	Origen cel·lular	Funció	gen
IL-1	Monòcits, macrofags	Activació de cèl·ls T. Proliferació de cèl·ls B	2q13-21
IL-2	cèl·lules T	Proliferació i activació cèl·ls T	5q23-31
IL-3		Activació eosinòfils	4q26-27
IL-4	cèl·lules Th ₂	Creixement /activació cèl·lules B. IgE "switch". Promoció Th ₂ / inhibició Th ₁ . Promoció CD8. Expressió CAMs, quimocines	5q23-31
IL-5	cèl·lules T	Diferenciació eosinòfils	5q23-31
IL-6	Monòcits, macrofags, eosinòfils	Diferenciació cèl·ls. B i T.	7p21
IL-9	cèl·lules T	Creixement mastocits	5q31
IL-10	cèl·lules T	Producció IgE	1q31
IL-12	monòcits macrofags	Antiinflamatòria	5q31
IL-13	cèl·lules Th ₂	Producció IFN- γ / TNF/ IL-2. Inhibició IL-4, IL-5 i IL-10	5q31
IFN- γ	cèl·lules Th ₁	Creixement /activació cèl·lules B. Regulació síntesi IgE. Inhibició IL-2, IL-1 i TNF	12q
TGFb	eosinòfils	Expressió CAMs, quimocines	
GM-CSF	diverses	Diferenciació i activació macrofags. Promoció Th ₁ / inhibició Th ₂ .	
		Activació CD8 i NK	
		Profibròtic, quimiotàctic de mastocits i factor de creixement d'eosinòfils	
		Hematopoiesi	5q23-31
Quimocines			
CC			
Eotaxina, RANTES, CXC	Endotelials, epitelials, múscul i fibroblasts	Diferenciació i quimiotàctic d'eosinòfils	
IL-8		Quimiotàctic d'eosinòfils	4q12-13

Limfòcits. IgEs

Els limfòcits T i B, via la presència dels seus receptors específics (TCR i BCR), són els mediadors de la resposta immune específica. D'una forma simplificada es pot dir que les cèl·lules B són les encarregades de la producció d'anticossos específics i les cèl·lules T tenen capacitats citotòxiques específiques (CD8⁺) i de regulació de la resposta; supressores (CD8⁺) i d'ajuda (o helper) (CD4⁺). Altres poblacions de cèl·lules T (cel T γ/δ) i no T (NK) poden tenir implicacions en els símptomes o desenvolupament del fenotip asma.

Poblacions de cèl·lules T

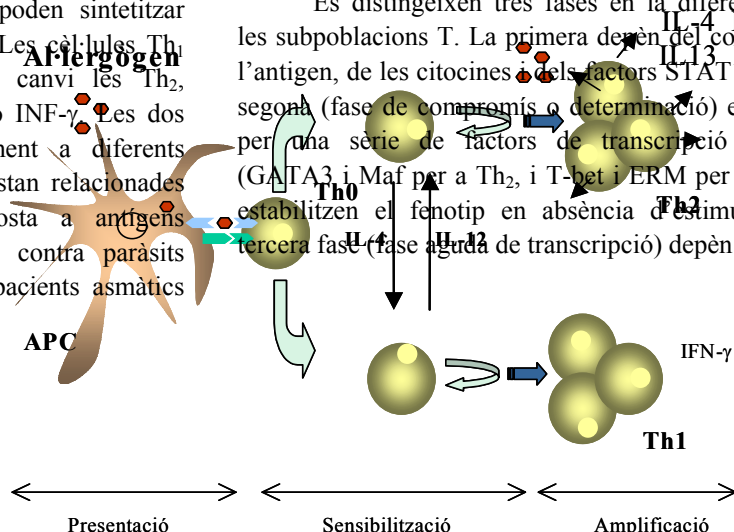
S'ha distingit dues subpoblacions de cèl·lules T helper. Les diferències són principalment funcionals i es basen en el patró de citocines que poden sintetitzar (Romagnani 1991; Romagnani 2001). Les cèl·lules Th₁ desenvolupament de la resposta produïxen IFN- γ però no IL-4, en canvi les Th₂, de sensibilització i cèl·lules educades (TH0) és determinen a poblacions Th₁ i Th₂. Aquestes poblacions estan associades a diferents tipus de resposta, mentre que les Th₁ estan relacionades amb la immunitat cel·lular i resposta a antígens bacterians, mentre que les Th₂ estan relacionades amb la immunitat humoral i resposta contra paràsits helmítics i reaccions al·lèrgiques. En pacients asmàtics cèl·lules Th madures transcriuen i secreten diferents tipus de citocines: IL-4, IL-9, IL-13, IL-5 les de tipus Th₂ i IFN- γ , IL-12 i TNF les de tipus TH1. La presentació per part de les cèl·lules dendrítiques (APC) és essencial en la maduració de la resposta.

s'ha observat un increment del número de cèl·lules Th₂ en BALF respecte als individus sans, en canvi no existeix cap diferència respecte la població Th₁ (Robinson et al. 1992).

Diferenciació de les poblacions Th

Les poblacions de cèl·lules T helper verges (Th₀) es determinen després d'un primer contacte cap a un "llinatge funcional". Els patrons d'expressió possible depenen de les citocines presents localment en el procés de diferenciació. L'IL-12 potencia les Th₁, mentre que Th₂ és promoguda per IL-4. Aquest procés no és definitiu, i és reversible principalment en les primeres fases. El procés de diferenciació de les cèl·lules T està molt influenciat pel patró de citocines presents en el moment de l'estimulació antigènica (Romagnani 1991; Romagnani 2001) (figura 10).

Es distingeixen tres fases en la diferenciació de les subpoblacions T. La primera depèn del contacte amb l'antigen, de les citocines i dels factors STAT induïts. La segona (fase de compromís o determinació) es produeix per una sèrie de factors de transcripció específica (GATA3 i Maf per a Th₂, i T-bet i ERM per a Th₁) que estableixen el fenotip en absència d'estimulació i la tercera fase (fase aguda de transcripció) depèn del segon



contacte antigènic i requereix la presència del factor de transcripció NFAT (Agarwal i col.l., 2000). Després de la determinació, la posterior estimulació antigènica i l'augment de la transcripció determinat per NFAT serà específic de "llinatge".

Funció efectora de les IgEs: receptors d'IgEs

La funció efectora de les IgEs es produeix via els receptors de la fracció constant. S'han identificat dos receptors de superfície: FcεRI (receptor d'alta afinitat) i FcεRII (receptor de baixa afinitat).

FcεRI està format per quatre cadenes (α , β i 2γ). La cadena α conté els dominis d'unió a l'IgE, i les altres tres cadenes estan relacionades amb la transducció de senyal. Aquest receptor s'expressa principalment a mastòcits i basòfils, i en menor mesura en eosinòfils. L'activació es produeix per una la unió de receptors a un antigen multivalent, provocant en les cèl·lules portadores l'alliberament dels mediadors de la inflamació.

FcεRII també anomenat CD23, no pertany a la superfamília de les Igs i està format per oligòmers (dímers o trímers) d'una proteïna integral de membrana amb un domini extracel·lular lectina-like. Per proteòlisi, es pot trobar una forma soluble (sFcεRII) totalment funcional. S'expressa principalment en cèl·lules B, i en menor mesura en basòfils, cèl·lules dendrítiques i

cèl·lules T. Aquest receptor té funcions relacionades amb la regulació de la resposta; presentació antigens, modulació de resposta.

Síntesi i regulació de les IgEs

La síntesi a gran escala d'IgEs requereix un pas previ en les cèl·lules B; el que es coneix com a canvi de classe ("switching class"). Aquest fenomen significa el reordenament genòmic dels fragments que codifiquen per a l'isotip IgE. El canvi de classe es produeix en el primer contacte antigènic, normalment en el centres nodulars. Tanmateix, altres cèl·lules (mastòcits activats) es creu que poden aportar els dos factors clau pel canvi de classe, de forma que no estaria restringit a les zones nodulars. Per una altra banda el canvi de classe pot ser afectat per la presència de diferents estímuls: LPS, citocines.

La producció (i canvi de classe) de les IgEs per les cèl·lules B es determina per la presència i activació de les cèl·lules ajudadores del patró Th₂. Després de reconèixer i processar l'antigen, aquest es presenta per les cèl·lules B a les Th₂ mitjançant el seu receptor. Aquesta unió resulta en l'expressió d'una sèrie de molècules d'activació i adhesió per part de la cèl·lula Th₂ (CD40L, CD28) i per les cèl·lules B (B7) que resulta en la producció d'alts nivells d'IL-4, que en la cèl·lula B, juntament amb el senyal via CD40 resulta en l'expressió de l'IgE específica. A la figura 11 s'esquematitza els principals senyals involucrats en la via síntesi de les IgEs.

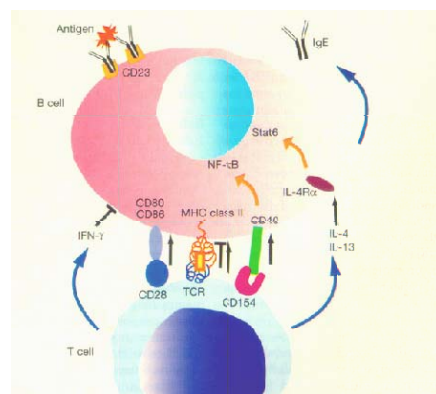


Figura 11

Síntesi d'IgEs. Principals senyals implicats en la síntesi i regulació de les IgEs.

Receptors de citocines

Les citocines tenen unes funcions molt diverses i a la vegada força redundants (taula 10). Això és degut en part al fet que els receptors de moltes citocines pertanyent a la mateixa família compartint les mateixes característiques de la transducció de senyal.

Transducció de senyals: Junk, STAT i altres amics

Els receptors de citocines són específics de lligant i tenen la capacitat de transduir el senyal internament. En la fracció citoplasmàtica del receptor hi ha associada una tirosin-quinasa, quinasa de la família Janus (entre les quals es coneixen les Jak1, Jak2, Jak3 i Tik 2). La unió de la citocina produeix l'oligomerització del receptor i l'activació de les Jak quinases, les quals fosforil·len el receptor i una segona proteïna (STAT) adherida al receptor activat (Liu et al. 1998).

Les proteïnes STAT (de l'anglès, *Signals Transducers and Activators of Transcription*) formen una família de factors de transcripció conservades evolutivament i presents en els primers eucariotes, de les quals n'han estat identificat 7 gens *STAT* diferents en mamífers, aquest estan organitzats en tres clusters: *STAT1* i 4 (2q32), *STAT2* i 6 (12q12), i *STAT3*, 5a i 5b (17q21) (O'Shea et al. 2000) (O'Shea et al. 2002). Les STATs són activades per fosforil·lació de residus específics de tirosina. Es transposa directament al nucli en forma de dímers i s'uneix directament a seqüències diana, on de forma independent o sinèrgica amb altres factors, activen la transcripció específica de gens. L'especificitat de resposta de les STATs és determinada pels dominis específics denominats SH2 (taula 11).

Poblacions Th i molècules STAT

Estudis funcionals en ratolins de manca de funció, indiquen que la majoria dels STATs tenen una funció relacionada amb la senyalització de citocines. Les STAT4 i STAT6 són essencials en la diferenciació de cèl·lules T (Takeda i Akira 2000).

STAT 6 s'expressa de forma ubiqua mentre que STAT4 s'expressa principalment en testis i limfòcits. Ratolins deficientes en STAT6 no presenten una diferenciació de la subpoblació de cèl·lules Th₂ en resposta a IL-4 (Takeda et al. 1997). A més presenten una proliferació reduïda de les cèl·lules B i una deficient producció d'IgEs. Per contra, els deficientes en STAT4 són incapaços de desenvolupar la població Th₁ en resposta a IL-12, i a més presenten una producció reduïda de IFN- γ en resposta a IL-12 (Hoey i Schindler 1998).

Taula 11

Família STAT i principals activadors específics

	Principals activadors	Gen
STAT1	IFN- γ , IFN- β , altres citocines i GF	2q32
STAT2	IFN- γ	12q12
STAT3	IL-6, IL-10, altres citocines i GF	17q21
STAT4	IL-12, IFN- γ	2q32
STAT5a/b	IL-2, IL-3, altres citocines i GF, GH	17q21
STAT6	IL-4, IL13	12q12

Models murins d'asma

L'estudi de l'asma en humans s'ha vist limitat per la gran variabilitat tant a nivell patològic com clínic de la malaltia la qual cosa dificulta l'experimentació en humans.

Només es coneixen dos animals que desenvolupen asma o els símptomes d'asma, de forma natural; el primat *Macaca fasciculata* i el ca Basemji. En els models de primats, aquests desenvolupen símptomes respiratoris semblants als humans, principalment en resposta a aeroal·lergògens. Altres models no primats, com els porcs de Guinea, presenten alteracions histològiques similars a les descrites en humans. Quant als rosegadors, el més desenvolupat és el model murí, ja que les rates no desenvolupen una resposta específica d'IgEs.

No existeix el que podien anomenar un "ratolí asmàtic", sí, en canvi tenim a l'abast models que incorporen algunes de les característiques essencials de l'asma: HRB, inflamació i remodelació de les vies aèries, diversos models de forma natural o induïda serveixen com a models per a l'asma i fenotips associats (HRB, sIgEs) (Drazen et al. 1999). Han estat creades soques

congènites de ratolins per a demostrar moltes de les característiques de l'asma en humans, incloent els nivells elevats d'IgEs, inflamació infiltració eosinofílica del pulmó i reactivitat bronquial. A més, s'han desenvolupat models que mimetitzen els efectes observats en els pacients amb asma després de l'exposició aguda o crònica a al·lèrgens.

Contribució genètica a l'asma

Heretabilitat de l'asma

Concordança familiar: Risc

El primer gran estudi sobre l'herència de les malalties anomenades "al·lèrgiques" va ser realitzat per Cooke i col·l., (Cooke i Van der Veer 1916), confirmant la tendència de l'asma a agregar-se en famílies. Però molt abans, durant la primera meitat del segle XVII, tal i com descriu Wiener (Wiener et al. 1936) aquest fenomen ja havia estat observat al 1650 per Sennertus, en observar que la seva dona, tres de les seves germanes i una neboda patien d'asma.

L'increment de la freqüència de l'asma, l'atòpia i de l'HRB en familiars de primer grau respecte la població general ha estat descrit en diversos estudis (Sibbald i Turner-Warwick 1979; Hopp et al. 1984; Bruderman et al. 1987) estimant el risc en familiars de primer grau entre 5 i 6, i l'heretabilitat entre valors que oscil·len entre mínims de 0,60 i 1. Aquestes estimacions estan influïdes tant per l'ambient que comparteixen els membres de la família com per la presència de fenocòpies a la població (Sandford et al. 1996).

Concordança en bessons: Heretabilitat

Dels estudis de concordança en bessons monozigòtics (MZ) i dizigòtics (DZ) s'han descrit valors d'heretabilitat entre 0,36 (Nieminen et al. 1991) i 0,79 (Bazaral M et al. 1974). Les variacions observades depenen tant de la forma de selecció de la mostra com del mètode emprat per calcular-la (Allen et al. 1967); en general la concordança és menor en estudis poblacionals (Edfors-Lubs 1971; Duffy et al. 1990; Nieminen et al. 1991) que en estudis dirigits (Hopp et al. 1984; Hanson et al. 1991).

En estudis de concordança per a asma i fenotips intermedis en bessons criats junts o separats no s'ha

trobat diferències, deduint-ne una major component genètica que ambiental (Hanson et al. 1991). Aquests resultats s'han interpretat com un argument a favor d'un control genètic dels nivells d'IgEs (Sandford et al. 1996).

Estudis de segregació: Patró d'herència

Així, poc ha variat des que al 1916 Cook i col·l., varen suggerir un patró d'herència autosòmica dominant per l'atòpia, considerant l'acció de múltiples factors heretats separadament, per tal d'explicar les diferències en la severitat i l'edat de presentació de la malaltia. Aquesta idea va ser represa posteriorment al 1954 quan es va suggerir una herència *poligènica* (Tipps 1954).

La major part dels estudis de segregació han estat realitzats amb els fenotips intermedis d'atòpia i d'HRB. Respecte l'atòpia, la majoria s'han fixat en el nivell total d'IgEs, essent pocs els que consideren altres mesures intermèdies de la condició al·lèrgica (SPT positius, spIgEs o eosinofília). A continuació es resumeixen els principals estudis de segregació, les conclusions i les característiques principals de l'estudi (taula 12).

Atòpia

Considerant els nivells de concentració total d'IgEs, s'ha suggerit diferents models d'herència, fins i tot contradictoris.

Cookson i col·l., basant-se en una definició d'*atòpia* determinada per: >1 test SPT positius ≥ 2 mm o nivells elevats d'IgEs o nivells d'IgEs específiques, va proposar un model d'herència autosòmic dominant (AD) amb penetració incompleta (Cookson i Hopkin 1988). El mateix grup, més tard proposà l'efecte d'un gen major controlant els nivells totals d'IgEs, de forma independent a la resposta d'IgEs específiques (spIgEs), amb una herència autosòmica recessiva (AR) (i una contribució genètica relativa del 28%) (Dizier et al. 1995). En canvi altres estudis han observat que el patró que s'ajusta millor a la seva població és un model codominant d'herència (Martinez et al. 1994), un model que ja havia estat proposat en un estudi de la població Amish de Pensilvània (E.U.A) (Meyers et al. 1982).

Taula 12

Models proposats d'herència per a l'asma i fenotips intermedis. En cada cas l'estudi pot diferir en la forma de diagnosi i en la població estudiada

		Model genètic	Diagnòstic	Població
Asma	Lawrence,1994	poligènic amb gens de baix efecte gen bial·lelic amb codominància oligogènic	qüestionari	general
	ECRHS,1997 Jenkins,1997		qüestionari qüestionari	història d'asma general infantil
HRB	Longo, 1987	dominant baixa penetració dominant alta penetració, independent d'IgEs poligènic amb gens de baix efecte	carbacol	història d'asma
	Panhuisen, 1996 Lawrence,1994		histamina histamina	general
IgEs totals	Marsh,1974 Gerrad, 1978 Meyers, 1982 Hastedt, 1983 Meyers, 1987 Cookson, 1988 Martinez, 1994	poligènic, recessiu poligènic, recessiu codominant poligènic model mixte recessiu dominant codominant		famílies Amish
	Lawrence,1994 Dizier, 1995 Xu, 2000			general història d'asma

Models de tipus *poligènic pur* (Blumenthal et al. 1981; Hasstedt et al. 1983) o mixtes, amb un gen major que actuaria de forma recessiva en un context poligènic també han estat proposats (Marsh et al. 1974; Gerrard et al. 1978; Meyers et al. 1987; Meyers et al. 1994).

Finalment, també s'ha suggerit l'herència de dos *loci locus* (Lawrence et al. 1994). Xu i col·l.,(2000), han evidenciat dos gens majors no lligats; un *locus* que explicaria el 50% de la variació dels nivells d'IgEs i actuaria de forma recessiva, i un segon, amb un efecte estimat del 19%, que actuaria com a modificador del primer.

Hiperresposta bronquial

Respecte a l'HRB, Longo i col·l., estudiant la resposta específica a *carbacol* en pacients asmàtics, pares sans de nens asmàtics i en controls sense història familiar d'asma, han suggerit un model d'herència de caràcter autosòmic dominant amb una baixa penetració (Longo et al. 1987). D'altra banda, Panhuisen i col·l., emprant famílies triades a partir d'un membre afecte, i analitzant la resposta específica a la histamina, evidencien un patró dominant amb elevada penetració (Panhuisen et al. 1995), a més suggereixen una herència independent de l'HRB i dels nivells d'IgEs.

Resumint, els estudis de segregació posen de manifest una clara predisposició genètica, tant per a l'atòpia, com per l'HRB, però no queda clar quina és la forma d'herència ni quants són els gens implicats. Pel

que fa a l'atòpia, la major part dels estudis realitzats en diferents països postulen la presència d'un o més gens majors regulant el nivell total d'IgEs i, en un estudi es diferencia entre el control genètic de la resposta d'IgEs específiques de la d'IgEs totals.

Les diferències observades poden ser atribuïdes a factors com herència materna (Cookson et al. 1992) o la presència d'heterogeneïtat genètica en diferents poblacions. A més, diferències en la definició del fenotip atòpic o en el mètode de seleccionar els participants i els controls poden explicar els resultats tant diversos.

Lligament

En la següent secció, es fa una descripció de les principals regions del genoma descrites mitjançant tècniques de lligament genètic. Les regions reportades de forma més consistent es localitzen a les regions cromosòmiques 11q, 5q i 12q.

Aquestes regions han estat definides utilitzant diferents aproximacions, ja sigui respecte a les característiques de les mostres analitzades, de la definició del fenotip, del tipus d'anàlisi genètica o del punt de partida de l'estudi. En cada cas es descriu quina és la tècnica emprada, la població estudiada, les diferències en el mètode de selecció dels individus i el fenotip usat a l'estudi. A la taula 13 es resumeix els resultats dels principals estudis realitzats.

Cromosoma 11

La regió 11q, va ser la primera regió de predisposició en ser descrita. Cookson *i col-l.*, confirmaren el lligament de set famílies amb un marcador del cromosoma 11 i un LOD màxim de 5,58, compatible amb una herència de caràcter autosòmic i dominant (AD) (Cookson et al. 1989). Aquests resultats van ser replicats pel mateix grup en poblacions diferents. Al 1992, amb un grup més extens de famílies de tipus nuclear, en una mostra de la població australiana, van evidenciar una heterogeneïtat genètica del 60%, i en població britànica, mitjançant l'anàlisi de compartició d'al·lels, trobaren lligament amb el marcador *DIIS97* independentment de la definició d'atòpia emprada (Cookson et al. 1992). Al 1996 membres del mateix grup, en una cerca global aleatòria del genoma confirmaren aquest *locus* de predisposició (Daniels et al. 1996).

La definició tant ampla d'atòpia usada pel grup de Cookson i la falta de replicació del resultat per altres grups, (Amelung et al. 1992; Hizawa et al. 1992) (Rich et al. 1992) (amb famílies amb herència paterna) va portar controvèrsia sobre la versemblança d'aquesta troballa (Morton 1992). En canvi altres grups, en poblacions diferents, sí que han trobat lligament mitjançant mètodes diversos; de *lod score* i amb una definició d'atòpia molt estricta, en població japonesa (Shirakawa et al. 1994a), o per mètodes de compartició d'al·lels, en població holandesa (Collee et al. 1993) i australiana (van Herwerden et al. 1995). En aquest darrer estudi es va confirmar un *locus* per a asma, definit a partir d'una història recent de símptomes, però no lligat amb atòpia sinó amb l'HRB.

Cromosoma 5

Al 1994, de forma independent, dos grups van suggerir la presència d'un *locus* a la regió 5q31 que regularia la producció d'IgEs (Meyers et al. 1994) (Marsh et al. 1994). Meyers *i col-l.* a partir de 92 famílies seleccionades a partir d'un pare amb asma i Marsh *i col-l.*, a partir d'11 famílies extenses, d'un grup de població relativament aïllat dels E.U.A (Amish de Pensilvània), seleccionades a partir de nens amb al·lèrgia. En el cas de les famílies Amish, el *locus* identificat regulava la producció d'IgEs d'una forma antigen-independent. Els dos estudis diferien en la localització exacta del *locus*, així com en el model de segregació, fent pensar en la presència de dos *loci* diferents dintre de la regió 5q. Al 1995, el grup de Meyers, identificà en un estudi de "sib-pairs", l'herència conjunta de l'HRB amb

l'atòpia, i la identificació d'un *locus* per a l'HRB a 5q31 (Postma et al. 1995), la qual cosa explicaria la relació entre tots dos trets, manifestada en diversos estudis epidemiològics.

Altres estudis en diverses poblacions, han evidenciat lligament a la regió 5q31 per atòpia, amb marcadors d'atòpia, tant quantitius (spIgEs específiques, IgEs total, eosinòfils) (Marquet et al. 1996; Martinez et al. 1998; Palmer et al. 1998) com qualitius (SPT test) (Hizawa et al. 1998), i per a asma clínic (encara que seleccionats a partir d'un nen al·lèrgic) (Noguchi et al. 1997). Indicant la importància interètnica d'aquest *locus* en la regulació del fenotip atòpic, tot i que la falta de replicació en tots els estudis (Kamitani et al. 1997; Laitinen et al. 1997) (Luo et al. 1999; Holloway et al. 2001) indiquen la presència d'heterogeneïtat genètica en l'asma i fenotips associats.

Cromosoma 12

A 1996, en una cerca dirigida del genoma, Barnes *i col-l.*, van analitzar dues poblacions molt diferents tant des del punt de vista geogràfic com ètnic (afrocaribenys de Barbados, i caucàsics del grup Amish de Pensilvània (EUA)) amb diversos marcadors del 12q15. Es va estudiar els individus amb asma (diagnòstic mèdic) i amb nivells sèrics elevats d'IgEs. En totes dues es va trobar lligament amb els nivells d'IgEs totals, i en les famílies de Barbados, amb asma. Els resultats observats respecte els nivells d'IgEs eren independents del fenotip asma, suggerint diferents bases genètiques per als nivells d'IgEs i l'asma (Barnes et al. 1996).

Altres estudis han confirmat aquest *locus* a 12q. Nickel *et al.*, mitjançant test d'associació (TDT) en població alemanya i lligat a nivells alts d'IgEs (Nickel et al. 1997), asma (Wjst et al. 1999; Immervoll et al. 2001), asma i IgEs en població britànica (Thomas et al. 1997), i a l'HRB, asma, IgEs total i spIgEs en població italiana (Malerba et al. 2000).

Els resultats en aquesta regió han estat reproduïts per molts grups, en estudis d'un *locus* o en cerques globals del genoma, la qual cosa indica de l'existència d'un veritable *locus* a 12q15. Les regions cromosòmiques implicades en els diferents estudis no coincideixen totalment, per la qual cosa no es pot descartar la presència de més d'un *locus* a 12q. Els resultats negatius en un estudi alemany, que no considerà el fenotip asma (Heinzmann et al. 2000a), podria indicar que el *locus* pot ser important respecte els aspectes inflamatoris de l'asma, més que pels al·lèrgics.

Dintre de la regió es localitza nombrosos gens que poden tenir un paper important en la regulació de la patologia present en l'asma: *STAT6*, *NOS2*, *LTA4H*, *IFN- γ* .

Cromosoma 13

Marcadors de la regió 13q12-34 presenten lligament amb asma atòpic en diverses poblacions. En població australiana i britànica en una cerca global (Daniels et al. 1996), i en població japonesa, en un estudi dirigit del cromosoma 13 (Kimura et al. 1999) i confirmat més tard en una cerca global (Yokouchi et al. 2000). Kimura *i col.*, mitjançant TDT van observar la transmissió preferent d'un al·lel del marcador de la regió (*D13S153*) a nens amb asma atòpic.

Altres marcadors de la regió 13q12-34 presenten lligament amb asma en tres estudis en població caucàsica (CSGA 1997; Ober et al. 1998; Ober et al. 2000b) i amb marcadors d'atòpia; resposta específica envers àcars en un estudi japonès (Hizawa et al. 1998), número d'eosinòfils en població francesa (Dizier et al. 2000) i dermatitis atòpica amb marcadors de la regió 13q12-14 (Beyer et al. 2000).

La major part dels resultats confirmen aquest *locus* com un *locus* d'atòpia, el qual pot ser comú en població caucàsica i asiàtica. La localització dels marcadors no permet aclarir si hi ha més d'un *locus* a la zona, ja que la zona abraçada és molt ampla.

Cromosoma 6

La major part dels estudis centrats en aquest cromosoma consisteixen en estudis d'associació, entre antígens de l'HLA de classe I i II, en la regió 6p21, i la resposta específica envers determinats aeroal·lergògens. Molts estudis han posat de manifest l'associació de certs antígens de classe I i d'haplotips de la regió amb respostes antígen-específiques (Fischer et al. 1992; D'Amato et al. 1996; Donfack et al. 2000), les quals constitueixen un risc pel desenvolupament de l'asma i l'HRB (Sears et al. 1989). D'altra banda, en estudis que consideren el fenotip IgE-independent els resultats no són tant evidents.

Gens candidats

A continuació es fa una descripció de la funció i dels estudis genètics realitzats en els principals gens candidats per asma. Aquests gens són rellevants funcionalment a l'asma o han estat localitzats en regions cromosòmiques lligades a asma.

Receptors d'antígens de cèl·lules T

Els receptors específics d'antigen de cèl·lules T (TCR, de l'anglès *T cell receptor*) estan compostats per dues cadenes, que poden ser de quatre classes; α , β , γ , δ . La major part de les cèl·lules T porten receptors de tipus α/β , essent les γ/δ una població minoritària. La combinació de les múltiples regions variables de les cadenes confereixen especificitat de reconeixement al TCR.

Respostes al·lèrgies específiques (principalment a àcars) han estat descrites en diversos estudis com un factor de risc pel desenvolupament de l'asma i l'HRB (Sears et al. 1989).

Gens per al TCR: *TCR- α* /*TCR- δ* i *TCR- β*

La cadena beta de TCR està codificada pel gen *TCR- β* (*locusID*:3957), que mapa al cromosoma 7q34 i la cadena alfa per un complex genètic al cromosoma 14q (*TCR- α*) (*locusID*:6955), que a més conté el gen per la cadena delta (*TCR- δ*).

Estudis de lligament dirigits en ambdues regions han evidenciat la seva relació amb la regulació dels nivells d'IgEs. Al 1994, Moffat *i col.* en dos grups independents de famílies de diferent origen (britànic i australià), amb 312 parelles de germans varen observar lligament amb marcadors interns del gen *TCR α* (TCRA1 i TCRA2) amb la resposta d'IgEs específica (Moffatt et al. 1994). En un altre estudi en població japonesa no es va obtenir confirmació, però en canvi va evidenciar lligament amb asma, nivells elevats d'IgEs i la resposta específica d'IgEs, amb marcadors interns del gen *TCR- β* (per a asma) i marcadors propers (*D7S684*) (per a IgEs) (Noguchi et al. 1998a). Aquests resultats no han estat replicats de forma independent en cap altre estudi, només en estudis posteriors, de cerca global de genoma, s'ha posat de manifest la presència d'un o més *loci* implicats amb asma o fenotips associats, en aquestes regions, encara que no específicament amb els complexos TCR (URL/Asthma Gene Database).

Taula 13

Resum dels resultats de les regions 11q, 5q, 12q i 13q que presenten lligament amb asma i fenotips intermedis (atòpia, HRB)

		Fenotip	Diagnòstic	Comentaris	Població
11q+	Cookson, 1989	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'iges o spiges	Heterogeneïtat 60% Herència materna	Britànica Australiana Britànica
	Young, 1992	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'iges o spiges		
	Cookson, 1992	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'iges o spiges		
	Moffat, 1992	Atòpia	Atòpia	Cerca global aleatoria	Britànica / Australiana Holandesa Japonesa
	Daniels, 1996	Total Iges	>1 SPT o nivells alts d'iges o spiges		
	Collee, 1993	Atòpia	Iges elevades (400 ui) i >3 spt		
	Shirakawa, 1994	Atòpia			
Van Herwerden, 1995	HRB	Histamina	Independent atòpia	Australiana Australiana	
	Asma	Síntomes i medicació			
11q-	Amelung, 1992	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'Iges o spIges	No confirmat, possible 2n locus distant	Holandesa
	Amelung, 1998	Iges / HRB	Famílies a partir de proband amb asma	Anàlisi dos-locus	Holandesa Japonesa
	Hizawa, 1992	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'iges o spiges		
	Lympani, 1992	Atòpia / HRB	Famílies a partir de proband amb asma	Possible herència paterna en dos famílies Famílies a partir de proband amb dermatitis atòpica	
	Rich, 1992	Atòpia			
	Coleman, 1992	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'Iges o spIges		
	Martinatti, 1996	Atòpia	>1 spt o nivells alts d'Iges o spIges	Asma intermitent / Iges elevades (400 UI)	Italiana Japonesa
Noguchi, 1997	Iges /asma				
5q+	Meyers, 1994	Asma	<i>Cas index</i> amb asma	Herència conjunta Anàlisi dos-locus	Holandesa Amish Holandesa
	Marsh, 1994	Iges	<i>Cas index</i> amb alèrgia		
	Postma, 1995	Atòpia/HRB	<i>Cas index</i> amb asma		
	Xu, 1995			Famílies a partir de proband amb asma	Americana Japonesa Japonesa
	Marquet, 1996	spIges			
	Palmer, 1998	Iges			
	Martinez, 1998	Eosinòfils			
Hizawa, 1998	SPT				
Noguchi, 1997	Asma/atòpia	Asma intermitent / Iges elevades (400 UI)			
5q-	Laitinen, 1997	Atòpia			Finesa
	Kamitani, 1997	Atòpia	SPT		Australiana
	Lu, 1999				
	Holooway, 2001				
12q+	Barnes, 1996	Iges		Independent d'Iges	Afrocaribenys / Amish Afrocaribenys Germànica Britànica Italiana
	Nickel, 1997	Asma	<i>Cas index</i> seleccionats per Iges elevades		
	Thomas, 1997	Iges			
	Malerba, 2000	Asma/ iges HRB, asma, iges			
12q-	Heinzman, 2000	Atopia			Germànica
13 q+	Daniels, 1997	Atòpia	>1 SPT o nivells alts d'Iges o spIges	Cerca global aleatoria	Britànica / australiana Japonesa Japonesa Francesa
	Kimura, 1999	Atòpia			
	Hizawa, 1998	SpIges			
	Dizier, 2000	Atòpia	Eosinòfils		

Serpines: α -1-antitripsina i α -1-antiquimotripsina.

Dintre de la regió 14q hi mapen els gens de les serpines: α -1-antitripsina (*SERPINA1*) (*locusID*:5265) i la α -1-antiquimotripsina (*SERPINA3*) (*locusID*:12). Aquestes proteïnes actuen com a inhibidors de proteases sèriques. El paper principal de la α -1-antitripsina es el d'inhibir les elastases alliberades pels neutròfils durant la inflamació. Dèficits de *SERPINA1* han estat associats al desenvolupament d'emfisema pulmonar i un risc de desenvolupar MPOC i variants gèniques n'han estat associades a MPOC (Poller, 1992).

Malerba i col·l., 2001, mitjançant TDT han observat la transmissió preferent d'un al·lel (Thr15Ala) de la *SERPINA1* amb tots els fenotips d'asma analitzats (asma al·lèrgic, l'HRB i IgEs totals i IgEs específiques).

Receptors d'IgEs: Fc ϵ RI i Fc ϵ RII

La reacció al·lèrgica és una dels components essencials del procés asmàtic, i les IgEs el lligam entre el desencadenant de la resposta (al·lergogen) i la part efectora de la resposta (mastòcits, eosinòfils, etc.). Els dos receptors de les IgEs (Fc ϵ RI i Fc ϵ RII), juguen un paper decisiu en la funció de les IgEs, i a grans trets complementari en l'autoregulació de la síntesi d'IgEs.

Receptor d'alta afinitat: FCER1B

El Fc ϵ RI, és un tetràmer compost per tres cadenes (cadena α , β i dues cadenes γ unides per ponts disulfur) (Blank et al. 1989). La cadena α i γ estan codificades per un gen localitzat al cromosoma 1 i la β al cromosoma 11. Estudis de lligament genètic han posat de manifest la presència d'un *locus* d'asma al cromosoma 11 però no a l'1. Sandford i *col·l.*, 1993, van identificar el gen candidat pel *locus* 11q13, com el que codifica per la cadena β del receptor d'alta afinitat per les IgEs.

El gen per a la cadena β , *FCER1B*, (*locusID*:2206) és un gen d'una sola còpia, amb 7 exons, que codifica per a una proteïna amb quatre dominis transmembrana i dos llargs dominis intracitoplasmàtics que intervenen en la senyalització interna (Kuster et al. 1992).

A continuació es fa una descripció dels canvis presents a la zona codificant que poden tenir una relació directa en la funció.

Variants Leu181 i Leu183

Les variants L181I i L183V estan localitzades al 4rt domini transmembrana de la cadena β del receptor, corresponent al 6è exó del gen. Alteracions en aquests dominis poden causar canvis significatius en l'expressió i funció del receptor (Varin-Blank i Metzger 1990). La cadena β , com la γ , conté en els dominis intracitoplasmàtics, els motius anomenats ARAM (presents a molts immunoreceptors (TCR/CD3, FcRs, etc.), necessaris els processos de senyalització (Weiss i Littman 1994). A més, estudis comparatius (en ratolí i en receptors homòlegs) han posat de manifest la importància de la subunitat β en l'ensamblatge del receptor.

En un estudi en població britànica el 15% de pacients amb asma eren portadors de la variant Leu181 i cap de la variant Leu183. Leu181 presentava una forta associació amb els nivells elevats d'IgEs, així com SPT positius. A més l'estudi de la segregació en 60 famílies va demostrar una alt component matern (Shirakawa et al. 1994b). La mateixa variant ha estat identificada en població australiana, amb una menor freqüència de portadors (4%), però també amb un risc augmentat d'atòpia en el cas d'herència materna de l'al·lel, (Hill et al. 1995). Altres estudis en diversos grups ètnics han descrit associació amb asma; àrabs (Hijazi et al. 1998), negres (Green et al. 1998), encara que no de forma universal en tots els grups (Duffy et al. 1995; Hizawa et al. 1995).

Variant Gly237Glu

Localitzada en l'exó 7, corresponent al domini intracitoplasmàtic del FCER1B, la variant Gly237 amb una freqüència del 5,3%, s'ha observat associada amb atòpia (SPT positius) i l'HRB en un estudi en població caucàsica australiana (Hill i Cookson 1996). De forma similar, en població japonesa (6% Gly237) ha estat associada amb asma atòpic (essent més important en asma infantil que en adult), a més, d'estar fortament associada amb nivells molt elevats d'IgEs totals (>1000UI/ml), però no amb una resposta específica (spIgEs a àcars de la pols) (Shirakawa et al. 1996b).

Receptor d'IgEs de baixa afinitat: FCER2

La proteïna (321 aminoàcids) és similar a la subunitat γ del receptor d'alta afinitat i té una alta homologia amb algunes lectines. Estructuralment és diferent al receptor de alta afinitat i només està format

per una sola cadena, a més també és pot trobar en una forma soluble (FCER2) a més de la típica de membrana. El gen *FCER2* (*locus* ID:2208) mapa a 19p13.3, té una llargada de 13 kb i conté 11 exons (Ludin et al. 1987).

Aquest receptor està relacionat amb la regulació de la resposta i síntesi d'IgEs. Diverses evidències apunten a un paper en la regulació de la producció d'IgEs (Stief et al. 1994) i la seva implicació en malalties al·lèrgiques o en l'HRB (Haczku et al. 1997).

L'estudi de 8 marcadors en una regió de 10 cM al voltant del gen, detectà l'associació d'un haplotip amb asma (definició basada en símptomes amb qüestionaris), però no detectà cap variant polimòrfica dintre de la zona codificant (Laitinen et al. 1997).

Clara Cell 16: CC16

CC16 mapa a 11q13 és un mediador de la inflamació derivat de les cèl·lules anomenades Clara, presents en la regió distal de la mucosa bronquial. Nivells reduïts han estat associats a inflamació (Lensmar et al. 2000). Dos estudis contradictoris, han analitzat un polimorfisme de la regió 5' del promotor (G38A), un de positiu en població australiana, respecte a asma al·lèrgic (Laing et al. 1998; Laing et al. 2000) i dos amb resultat negatiu en població japonesa i britànica (Gao et al. 1998; Mao et al. 1998).

Cluster 5q

El *cluster* 5q, *citokine cluster* o *cluster* de l'IL4, inclou una sèrie heterogènia de gens rellevants per a la fisiologia i/o patologia de l'asma; modulació de la resposta nerviosa i humoral de la musculatura bronquial, i inici, maduració, ampliació, modulació, especificitat de la resposta d'IgEs. Entre els gens inclosos en aquesta regió, es troben els gens que codifiquen per a: IL-4, IL-13, IL-5, IRF-1 (factor de regulació d'interferó), IL-3, CSF-2 (factor estimulator de colònies), IL-9, EGR-1 (factor primerenc de creixement), CD14, ADRB2, FGF-A (factor de creixement de fibroblasts), GRL-1 (receptor de glucocorticoids específic de limfòcits), PDGR-R (receptor de factor de creixement derivat de plaquetes), l'IL-12 β (cadena β d'IL-12), HAVCR (receptor de virus de la hepatitis A).

Diverses línies d'evidència apunten a un paper rellevant dels gens d'aquesta regió en la patologia de l'asma. Estudis en ratolins transgènics per a *YACs* han identificat un QTL relacionat amb l'HRB i els nivells d'IgEs a la regió 5q31 (Symula et al. 1999). També en ratolins, s'ha posat de manifest elements reguladors comuns que produeixen l'activació d'una forma

coordinada i específica de llinatge de les citocines 4, 5 i 13 (Lacy et al. 2000).

Cluster de citocines

Nombroses citocines estan sobreexpressades en les vies aèries i en molt tipus cel·lulars de pacients asmàtics (limfòcits T, eosinòfils, mastòcits, macròfags cèl·lules epitelials, fibroblasts, endoteli, múscul llis) (revisat a "Citokines in allergic airway disease". Asthma and Rhinitis). Es pot diferenciar entre dos grups de citocines en relació al llinatge de les cèl·lules T: Th₁ i Th₂. El llinatge Th1 secreta IL-2 i TNF i INF γ , i són les principals efectores de defensa contra paràsits intracel·lulars. Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, i actuarien com a defensa de paràsits complexos (hel·mints, paràsits extracel·lulars). IL-4 i IL-13, estimulen la producció d'IgEs i d'IgG4; IL-5, diferencia i manté els eosinòfils; IL-4 i IL-10, actuen com factors de creixement de mastòcits; i IL-4, 13 i 10 inhibeixen certes funcions de macròfags, a més de Th1, disminuint les probabilitats de danys per inflamació continuada, comportant-se com a reguladors de les respostes immunes. De forma comú, els dos llinatges T produeixen IL-3, TNF i GM-CSF. A la taula 10 (pàgina 39) ja s'han resumit les principals funcions.

Les citocines produïdes o relacionades amb l'acció predominant de tipus Th2: IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 es denominen *cluster* Th2. A continuació es fa un resum dels estudis específics en alguns dels gens de les citocines del *cluster* Th2 i la seva relació amb asma.

Interleucina 5 (IL-5)

IL-5 té un paper clau en el desenvolupament i manteniment de l'eosinofília (Hamelmann and Gelfand 1999). Un estudi mutacional de la regió codificant del gen de l'IL-5 (*locus* ID:3567), no ha trobat polimorfismes associats en la regió (Pereira et al. 1998).

Interleucina 4 (IL-4)

La interleucina 4 té un paper essencial en la generació de la resposta d'IgEs, models animals de falta de funció (Kopf et al. 1993) Brusselle et al. 1994) presenten una manca de resposta IgEs específica.

IL-4: regió del promotor (-509 C/T)

La variant (-509 T) del gen de l'IL-4 (*locusID:3565*) ha estat associada amb una major activació del promotor i amb nivells elevats d'IgEs (Rosenwasser et al. 1995). Estudis en població japonesa en la que han identificat lligament a la regió 5q, s'ha observat associació amb dermatitis atòpica i asma, però per una via diferent de la regulació d'IgEs (Noguchi et al. 1999). De forma similar, un estudi fet en població caucàsica l'ha exclòs com a regulador dels nivells d'IgEs (Dizier et al. 1999).

Interleucina 13:IL-13

Estudis en models murins suggereixen un paper central en el desenvolupament de l'asma, mitjançant diferents mecanismes, incloent inducció d'IgEs, eosinofília a les vies aèries i hiperreactivitat (Wills-Karp et al. 1998). Ratolins transgènics que expressen el receptor de l'IL-13 en bronquis desenvolupen un model d'asma amb HRB (Zhu et al. 1999) d'una forma independent d'IL4R α (Mattes et al. 2001).

IL-13: Arg130Gln

L'al·lel Gln130 del gen *IL-13* (*locusID: 3596*), ha estat associat amb nivells elevats d'IgEs (Graves et al. 2000) i amb asma atòpic i no atòpica, a més l'homozigositat per la variant està associada amb un nivell sèric elevat d'IL-13. Estudis de predicció de funció suggereix que el canvi produeix una resposta augmentada degut a una variació en l'afinitat per l'IL-13 (Heinzmann et al. 2000b).

Interleucina 9: IL-9

IL9 (*locusID:3578*) codifica per a una citocina pleotrópica, que actua sobre moltes de les cèl·lules implicades en asma; cèl·lules T, cèl·lules B, mastòcits, eosinòfils, neutròfils i cèl·lules epitelials. Estudis en ratolins han demostrat lligament del gen *IL-9* amb l'HRB, a més d'observar uns nivells sèrics d'IL-9 més baixos en el teixit bronquial d'una soca hiporreactiva (Nicolaidis et al. 1997).

D'altra banda la sobreexpressió d'IL-9 en ratolins transgènics, causa inflamació eosinofílica, nivells elevats d'IgEs, increment de secreció mucosa i l'HRB (Temann et al. 1998), a més d'una sobreexpressió de quimocines d'eosinòfils (CC-quimocines) en les cèl·lules epitelials (Dong et al. 1999).

Encara que molts estudis de lligament han posat de manifest la presència de lligament a la regió 5q (taula 20b, 20c), només un n'ha detectat específicament

lligament amb IL-9 (Doull et al. 1996), mentre que un altre estudi en població fina va descriure una variant gènica (T113M) però no associada amb asma (o fenotips intermedis) (Laitinen et al. 1997).

Altres gen del Cluster 5q

Gen per l'antigen de diferenciació CD14

CD14, és un receptor multifuncional amb alta afinitat per LPS (lipopolisacàrid) i altres productes derivats de la membrana bacteriana. CD14 és expressat de forma constitutiva en la superfície de monòcits, macròfags i neutròfils i a més és també es troba en forma soluble (sCD14) en el sèrum com a resultat d'una secreció o del clivatge enzimàtic de la forma de membrana (mCD14).

El gen *CD14* (*locus ID:929*), d'1,5 kb amb un petit intró (Ferrero i Goyert 1988), mapa a la part telomèrica terminal del *Cluster 5q*. Diversos polimorfismes han estat descrits en la regió 5' del promotor (en les posicions -1619, -1359, -1145, -809, -159 de l'inici de transcripció) (Baldini et al. 1999; Vercelli et al. 2001) i en l'exó 2 (G1344C) (Hayden et al. 2000).

Un estudi en població infantil d'E.U.A, ha observat associació de la variant -159C del promotor amb els nivells de sCD14, els nivells d'IgEs i la severitat del fenotip al·lèrgic, però no amb asma o atòpia. Quant al model d'acció també hi ha discrepàncies; dominant codominant o recessiu (Baldini et al. 2002).

Receptor β_2 -adrenèrgic

El receptor β_2 -adrenèrgic, és un membre de la família dels receptors d'unió a proteïna G. L'estructura com la majoria d'aquests receptors, és de set dominis intracitoplasmàtics (TM1-7), tres dominis de llaç extracitoplasmàtics (ECL1-3) i intracitoplasmàtics (ICL1-3), a més de dues cues terminals, la aminoterminal externa i la carboxiterminal interna.

El receptor s'expressa al múscul llis, i també a cèl·lules epitelials del tronc respiratori, així com diverses cèl·lules inflamatòries (limfòcits, neutròfils, eosinòfils i macròfags) (Nijkamp et al. 1992). L'activació continuada produeix una regulació de contracció del múscul llis. Agonistes del receptor són broncodilatadors o protegeixen contra la broncoconstricció.

El gen per al receptor β_2 -adrenèrgic (*BADR2*) (*locusID*:154) és un gen sense introns, de 1,2 kb, que codifica per a una proteïna de 413 aminoàcid. En aquest gen s'han identificat nou polimorfismes puntuals en la regió codificant (Reihnsaus et al. 1993) dels quals quatre són variants d'aminoàcid: Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met (domini aminoterminal) i Thr164Ile (TM4). Tres d'aquestes variants (Arg16Gly, Gln27Glu i Thr164Ile) són rellevants per a la funció del receptor, i han estat associades amb asma i fenotips relacionats. A més s'han descrit polimorfismes en la regió 5', que afecta l'expressió del receptor (McGraw, 1998).

Variant Ile164

Estudis funcionals han posat de manifest una reducció de l'afinitat per l'agonista (Green et al. 1995b).

Variants Arg16Gly/ Gln27Glu

Els polimorfismes 16 i 27 afecten la severitat de l'asma, funció pulmonar, hiperreactivitat bronquial, resposta a certs agonistes o la manifestació de certs fenotips asmàtics (asma nocturn). Estudis *in vitro* han demostrat que la presència de la variant Gly16, produeix un augment de la *downregulació* per contacte amb l'agonista, mentre que la presència en homozigosi de la variant Glu27 presenta una resistència incrementada a la *downregulació* (Green et al. 1995a).

Gly16 ha estat associada amb un augment de la hiperreactivitat bronquial, en població general (D'Amato et al. 1998), en pacients amb asma (Hall et al. 1995) i amb el grau de severitat de l'asma (Weir et al. 1998) especialment en el cas d'asma nocturn (Turki et al. 1995). En el cas del fenotip nocturn ja s'havia descrit una disminució de la densitat de BADR en leucòcits circulants (Szeffler et al. 1991). D'altra banda, la variant Gly16 ha estat associada amb una resposta disminuïda enfront a certs agonistes (Martinez et al. 1997), i a una disminució de la funció pulmonar (Summerhill et al. 2000).

Glu27 es correlaciona amb una menor reactivitat bronquial, tant en individus asmàtics (Hall et al. 1995) com de la població general (Ramsay et al. 1999a). D'altra banda la variant Gln27 s'ha observat associada amb nivells elevats d'IgEs en famílies asmàtiques, però no amb asma o atòpia *per se* (Dewar et al. 1998; Deichmann et al. 1999).

Gens candidats en regió 6p21

Estudis de cerca global del genoma han posat de manifest la presència de lligament de l'asma i fenotips intermedis amb la regió 6p21 (taula 20b). En aquesta

regió mapa el complex major d'histocompatibilitat (MHC), que és pot considerar un *locus* major per les malalties al·lèrgiques.

La regió del MHC o HLA s'estén en 4000 kb i conté nombrosos gens, principalment implicats en la immunitat innata i específica. Dintre dels gens de l'HLA, podem distingir, els de classe I (Clàssics *A*, *B*, *C* i no-clàssics *E*, *F*, *G*), II (*DR*, *DP*, *DQ*) i els de classe III (gens No-HLA; *TNF*, *HSP70*, *C4*, etc...). A més el complex MHC conté altres gens No-HLA dintre de les regions de Classe I i II (*TAP*, etc.) (figura 12).

Gens HLA

Aquí es fa referència al gens clàssics de l'HLA. Els productes de classe I intervenen en la restricció de la resposta cel·lular i s'expressen a totes les cèl·lules, mentre que els de classe II, que s'expressen principalment en cèl·lules B, cèl·lules T activades, monòcits i macròfags, intervenen en la restricció de la resposta humoral.

La relació amb asma o fenotips intermedis es manifesta des de fa molt temps, amb l'associació de certs serotips amb la resposta específica a determinats al·lèrgens en l'era pre-DNA, i amb haplotips específics en l'era actual, principalment amb *loci* de classe II com el DR (el més polimòrfic), però també del DQ i DP, amb la resposta d'IgEs a diversos al·lèrgens purificats. Pel que fa als antígens de classe I, en certs casos les associacions han estat degudes al desequilibri de lligament amb els de classe II. Com és el cas de l'al·lel B8, associat en certs estudis amb atòpia, i lligat a DR3, estudis *in vitro* han demostrat que limfòcits amb aquest haplotip (B8-DR3) produeixen menys IFN- γ i més IL-4, en resposta a PHA, aportant una base fisiològica a aquesta associació.

Respecte als de classe II, l'associació més forta i consistent ha estat la demostrada entre Amb aV i DRB1*1501 (Marsh i Huang 1991), però, diferents al·lels del mateix *locus* han estat correlacionats amb distints al·lèrgens en diferents poblacions (revisat en Moffat i Cookson 1996). Aquestes associacions es fan extensibles a casos d'asma ocupacional, com en el cas de l'asma induïda per isotiocianats (IAA), però són menys consistents.

Gens no-HLA: Cluster TNF

El Factor de Necrosi Tumoral (TNF) és una citocina pleotròpica descrita primerament per la seva capacitat citotòxica sobre cèl·lules tumorals, encara que

moltes altres i diverses funcions n'han estat descrites (revisat en Aiyer i Aggarwal, 1987 (Aiyer i Aggarwal 1987)). Una de les funcions principals és el seu paper director de l'inici i modulació de la reacció inflamatòria.

La concentració de TNF s'ha trobat augmentada en la submucosa bronquial de pacients amb asma i en l'esput, el fluid broncoalveolar (BALF) i en el sèrum de pacients amb asma agut. A més se l'ha relacionat amb els processos inicials de broncoconstricció i amb els fenòmens tardans de flux i activació de les cèl·lules inflamatòries, la qual cosa l'impliquen en el procés patològic de l'asma.

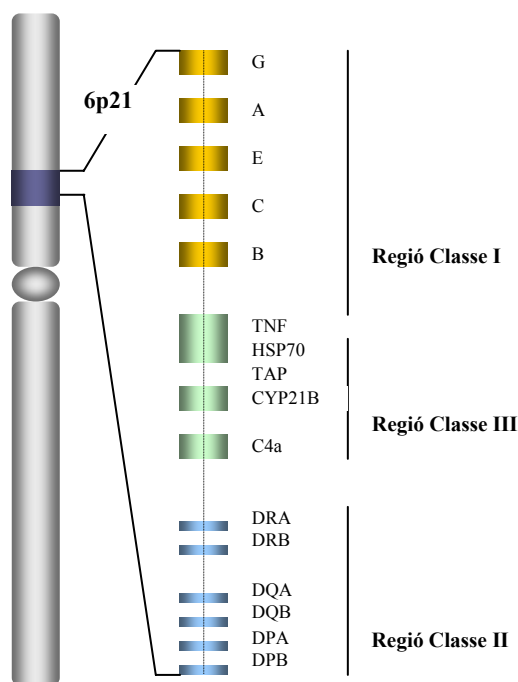


Figura 12

Complex de gens HLA en el braç curt del cromosoma 6 (CYP, enzims del citocrom p450; TNF, Factor de Necrosi tumoral; HSP. Proteïnes de xoc termic; C, proteïnes del complement)

El cluster TNF, situat dintre de la regió MHC III i telomèric als gens de classe II, abraça unes 7 kb. En aquest cluster es troben tres gens: *LTα* (locusID:4049), *LTβ* (locusID:4050) (Limfotòxina alfa i beta) i *TNF* (locusID:7124) (Nedwin et al. 1985).

La *Ltβ* té una alta homologia amb *Ltα*, i forma amb aquest, un heterodímer que intervé en processos de selecció del repertori immune (Crowe et al. 1994), via un receptor diferent del de *Ltα* i TNF.

Ltα i TNF, es troben en forma soluble (el TNF també unit a membrana), com un monòmer i un trímer respectivament. Tenen una alta homologia, principalment en la part secretada, compartint els mateixos receptors i

amb unes activitats biològiques similars. TNF deriva principalment dels macròfags activats, i en menor mesura d'eosinòfils i mastòcits, en canvi *LTα* es produeix principalment per limfòcits activats.

Dos polimorfismes dintre d'aquesta regió han estat relacionats amb asma i fenotips associats.

*Ltα*NcoI en el primer intró de *Ltα*. Aquest canvi no sembla alterar la funció del gen però s'ha trobat associat a un canvi en la posició 26 que *in vitro* es relaciona amb els nivells de *Ltα* (Messer et al. 1991). El segon, -308*TNF* G/A està en la regió del promotor de *TNF* i sembla influir la transcripció del gen (Wilson et al. 1993). L'al·lel menys freqüent (*TNF2*) ha estat associat amb uns nivells elevats de TNF, confirmat en estudis *in vitro* (Wilson et al. 1997).

Receptors d'IL-4, IL-13 i IL-9

Ja s'ha esmentat l'important paper que tenen l'IL-4, IL-13 i IL-9 en els processos relacionats amb asma. Alteracions dels receptors poden de igual forma ser importants en la regulació de la via que controlen. Estudis de cerca global del genoma o dirigits han posat de manifest la importància d'aquestes regions (veure taula 20b i 20c).

Receptor de l'IL-4 (IL-4R)

El receptor està format per un complex de dues cadenes, alfa (α) i gamma (γ): la primera que també forma part del receptor d'IL-13 s'uneix a l'IL-4, la segona, que és comú a diversos receptors de citocines (receptors d'IL-2, 4, 7, 9 i 15), amplifica el senyal de la cadena alfa. Estudis funcionals *in vitro* han posat de manifest la relació de variants gèniques del gen de la cadena α del receptor (IL-4R α) amb un guany de funció del receptor (Hershey et al. 1997).

De forma independent, diversos estudis de lligament genètic i de cerca global del genoma (URL/Asthma Gene Database), han posat de manifest la presència de lligament amb l'atòpia a la regió 16p12, on mapa el gen *IL-4Rα* (locusID:3566), però no amb l'IL2R (LocusID:3536) que mapa en Xq13.

S'han detectat nombroses variants en el gen de la cadena alfa, la majoria estan en la part intracitoplasmàtica (veure taula 14).

Variants i asma: Q551R, I50V i S478P

La variant I50 ha estat associada amb asma atòpic i nivells elevats d'IgEs en població japonesa, encara que altres estudis en la mateixa població no han pogut confirmar aquesta associació (Noguchi et al. 1999).

Funcionalment, la variant I50 causa una sobreactivació de STAT6, un augment de la proliferació cel·lular i una activació de la transcripció de la cadena ϵ de les IgEs, a més d'un augment d'IgEs i de CD23 en PBL *ex vivo*. L'efecte de la variant no cursa via un augment de l'afinitat ni del número de receptors presents a la membrana (Mitsuyasu et al. 1998; Mitsuyasu et al. 1999).

La variant Q551R va ser descrita en pacients amb Síndrome de Job (Síndrome de hiper-IgEs) (MIM:243700), una malaltia caracteritzada per la presència d'infeccions recurrents i uns nivells elevats d'IgEs, però no d'IL-4. La variant R551, associada amb la Síndrome de Job i amb atòpia, produeix un guany de funció amb uns nivells incrementats de CD23 (Fc ϵ R2), respecte a la variant salvatge. La variant R551 provoca un augment de dissociació de la fosfatasa SH-1 (regulador negatiu del receptor), però no una sobreactivació de STAT6 (Hershey et al. 1997). Malgrat aquesta evidència funcional, altres estudis genètics no han confirmat aquesta associació amb la Síndrome de Job (Grimbacher et al. 1998) o amb asma/atòpia (Mitsuyasu et al. 1999; Dupre et al. 2000), i d'altres, encara que han observat una relació, han assignat un paper contrari a la variant R551. Aquests, han detectat *in vitro* que la variant R551 junt amb el canvi P503, està associada a nivells baixos d'IgEs (via augment de IRS1/2 fosforil·lació i no unió de Stat6) (Kruse et al. 2000).

Ober i col·l, han estudiat 11 canvis en diferents poblacions; *inbred* (hutterites) i *outbred* (hispanos, negres i caucàsics no hispanos), i han observat la presència de desequilibri de lligament entre les variants estudiades, però només limitat a la regió corresponent a la part intracitoplasmàtica del receptor.

Receptor de l'IL-9

IL-9R és un receptor heterodimèric ($\alpha\gamma$), format per la cadena IL-9R α i la cadena γ (IL2R γ) comú amb diversos receptors de citocines. El gen *IL9R* (locusID:3581) mapa a la regió pseudoautosòmica Xq28, i s'expressa de forma independent del sexe (Vermeesch et al. 1997). A més s'han descrit quatre pseudogens sense cap activitat funcional a 9q, 10p, 16p i 18p. IL-9R s'expressa en moltes cèl·lules hematopoiètiques (cèl·lules T, mastòcits, macròfags) i de forma específica en cèl·lules polimorfonuclears (PMN) de pacients asmàtics (Abdelilah et al. 2001).

Estudis de lligament i d'associació mitjançant haplotips, han evidenciat una relació d'*IL9R* amb asma i HRB en dos poblacions independents i diferents, tant

geogràficament com genèticament (Holroyd et al. 1998; Kauppi et al. 2000).

Taula 14

Variants identificades en la seqüència codificant del gen de l'IL4RA.

Posició	Domini	Variant	
148	EC	I50V	Deichmann, 1997
426	EC	N142N	Deichmann, 1997
474	EC	L249L	Deichmann, 1997
864	EC	F288F	Deichmann, 1997
1124	IC	E375A	Deichmann, 1997
1167	IC	L389L	Deichmann, 1997
1216	IC	C406R	Deichmann, 1997
1218	IC	C406C	Deichmann, 1997
1224	IC	L408L	Deichmann, 1997
1232	IC	S411L	Deichmann, 1997
1432	IC	S478P	Kruse,1999
1645	IC	Q551R	Hershey,1998
1654	IC	V554I	Lozano,2001
2180	IC	S727P	Ober,2000
2281	IC	S761P	Deichmann, 1997

EC domini extracel·lular; IC domini intracel·lular

Receptor de l'IL-13

Els gens per a les cadenes IL-13R α 1 (locusID:3597) i IL-13R α 2 (locusID:3598) mapen a Xq24 i Xq13-q28 respectivament. El receptor de l'IL-13 s'expressa a cèl·lules epitelials i múscul llis de bronquis i està format per un heterodímer d'IL-4R α i IL-13R α 1. Aquest receptor híbrid comparteix senyals de senyalització que estan relacionades amb les activitats biològiques comunes entre IL-4 i IL-13.

Una variant de la zona codificant d'IL13R α 1, A1389G, ha estat associada amb nivells elevats d'IgEs però no amb asma, essent molt important el risc especialment en la població masculina (Heinzmann et al. 2000b).

Cerques Globals del genoma

Cerques globals aleatòries del genoma han estat realitzades per l'asma en poblacions diverses però les variades metodologies aplicades en cada cas fan difícil fer una valoració conjunta de les troballes. Un resum de les característiques i resultats dels principals estudis

reportats des de l'aparició de la primera cerca global al 1997 es troba resumit a les taules 21a, 21b i 21c.

Regions candidates en els models animals

L'ús de soques hiperreactives i models amb HRB induïda han servit per localitzar regions homologues en humans (De Sanctis et al. 1995; Levitt et al. 1995). De Sanctis i col·l., van detectar tres loci (20, 22 i 6p) influint l'HRB. Altres han mapat un *locus* per a la resistència a l'HRB per ozó en la regió prop del TNF (Kleeberger et al. 1997). També regulant l'HRB s'ha identificat un locus anomenat Tapr que té un homòleg a la regió 5q23-35 (McIntire et al. 2001). L'anàlisi de QTL ha identificat una regió de susceptibilitat a HRB, identificant Tlr4 com a possible candidat (Kleeberger et al. 2000). L'homòleg en humans, TLR4, ha estat implicat en la resposta diferencial a LPS i HSP70 (Asea et al. 2002). Entre els candidats identificats hi ha citocines, receptors de citocines, factors de creixement, proteases (I11b, I13b1, I13b2, PDGF, TNF i proteasa de mastòcits), molts dels quals corresponen a regions identificades en les anàlisi en humans.

Taula 15

Estudis de lligament realitzats en models murins d'asma o fenotips associats

Fenotip	De Sanctis, 1995	Levitt, 1995	Zhang, 1999	
	HRB	HRB	IgEs	HRB
Regió en ratolins	2,15,17	13	1, 2	9, 10, 1,17
Sintènia en humans	20, 22, 6p	5q31-33	2, 11	11q23, 12q22, 5q31, 17q12, 6p21
comentaris	Ratolins hiporreactius	HRB induïda		Models d'asma

Fibrosi quística i asma

La fibrosi quística (FQ) (MIM:219700) és una malaltia multisistèmica monogènica causada per mutacions el gen *CFTR* (de l'anglès *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (MIM:602421)

que afecta a gran nombre d'òrgans, incloent les vies respiratòries, el tracte gastrointestinal, el pàncrees, el fetge, les glàndules de la suor i el tracte genitourinari. Diversos efectes secundaris poden acompanyar a la disfunció en aquests òrgans; diabetis, complicacions reumàtiques, osteoporosi, risc de tumors en el tracte digestiu o conseqüències en el ritme de creixement degut les anormalitats nutricionals i respiratòries (Welsh et al. 2001).

La FQ, encara que multisistèmica, afecta principalment les vies respiratòries inferiors. En el cas de malaltia pulmonar existeix una gran variabilitat fenotípica, atribuïda a l'efecte tant de factors ambientals com genètics. En aquesta línia diverses variants dels gens implicats en processos inflamatoris i immunològics han estat relacionats amb el grau de severitat de la malaltia (Hull i Thomson 1998). D'altra banda l'elevada freqüència de determinades mutacions de *CFTR*, com la F508del, ha estat atribuïda, entre d'altres alternatives, a un possible avantatge dels individus portadors, havent-se proposat com una protecció envers malalties infeccioses com el còlera (Gabriel et al. 1994), febre tifoide (Pier et al. 1998) i també per altres no infeccioses com l'asma (Schroeder et al. 1995). Tot plegat s'ha atribuït a *CFTR* el paper de candidat funcional dintre del complex patró d'interaccions gèniques que contribueixen a l'asma.

A continuació es fa un resum de les alteracions principals observades en pacients de FQ, i encara que en relació amb asma l'afecció pulmonar és la més rellevant, s'ha inclòs un resum de les alteracions més importants observades en altres òrgans.

Patologia de FQ en el tracte respiratori

La malaltia pulmonar és la principal causa de morbiditat i mortalitat en els pacients de FQ (Welsh et al. 2001). Els pacients tenen un progressiu declivi de la funció respiratòria, arribant en darrer terme a una parada respiratòria i la mort. Els pulmons són histològicament normals al naixement, amb el progrés de la malaltia s'arriba a produir un eixamplament dels bronquis i bronquíols (bronquièctasies i bronquiolectàsies) i aparició de quists amb secrecions mucoses. Els lòbuls superiors presenten una afectació major, i a diferència dels bronquis, els intersticis i els alvèols no estan molt afectats.

Les pedres de toc de la patologia respiratòria són la secreció de moc, la infecció i la inflamació. En les zones peribronquials i peribronquiolars afectades es produeixen processos fibròtics, i al lumen és troben secrecions mucoses amb un important infiltrat de neutròfils. Les parets de les vies respiratòries tenen una

pèrdua important de cèl·lules epitelials, junt amb un important infiltrat de limfòcits a la part intramural. En aquestes zones amb l'epiteli danyat prop de la paret dels bronquis i bronquíols es localitzen bacteris, junt amb el mucus intraluminal. En el curs de la malaltia el dany tissular s'incrementa produint bronquièctasies i bronquiolectàsies així com quists amb secrecions mucoses, per acabar en les fases terminals amb una destrucció massiva de l'estructura pulmonar i una fibrosi del parènquima pulmonar al voltant de les vies respiratòries. Els productes derivats de la inflamació (citocines, proteases, productes citotòxics), són els causants de la fibrosi i dany observat.

Quant al temps d'aparició dels símptomes respiratoris, aquests generalment es presenten durant la infància, però poden presentar-se ja en l'edat adulta. La presència de tos crònica és comú en totes les edats, així com la d'esputs encara que de forma puntual. Quant a l'afecció de les vies superiors, aquesta va associada a la presència de pòlips nasals i sinusitis. En la infància en certs casos es poden observar sibilàncies, i és de destacar que en més del 90% dels casos de pacients FQ es produeixen episodis d'hiperreactivitat bronquial (Welsh et al. 2001).

Altres òrgans afectes

El pàncrees té una pèrdua de funció amb una reducció aquosa, de bicarbonat i d'enzims en la secreció pancreàtica. El 80% dels pacients tenen una funció exocrina anormal (insuficiència pancreàtica (IP)), mentre que la resta presenten una suficiència pancreàtica (SP) amb una funció disminuïda (<50%).

A nivell de l'aparell digestiu, la malaltia també afecta als conductes biliars amb manifestacions que van des d'una elevació asimptomàtica dels enzims hepàtics a una cirrosi hepàtica. En l'intestí prim s'observa una dilatació i hiperplàsia de les glàndules submucoses, amb acumulació de secrecions en el lumen i en les criptes. Una manifestació molt comú en els nounats, és l'aparició del meconi ileal (*Meconium Ileus*; MI), present en el 10-20% dels pacients FQ nounats.

A les glàndules de la suor existeix un augment de les concentracions de Cl^- , Na^+ i K^+ , aquest augment de la salinitat de la suor és una de les alteracions funcionals més consistents de la clínica de FQ. Aquesta anormalitat és present des del naixement i durant tota la vida adulta. La delimitació dels nivells normals s'ha establert en concentracions menors de 40 mmol/l, però no existeix una correlació perfecta. Hi ha un 2% de pacients amb

manifestacions atípiques de FQ que tenen uns nivells normals o límits de Cl^- a la suor.

El 97% dels homes FQ tenen infertilitat degut a una azoospermia per una absència bilateral dels conductes deferens ABCD (o *CBAVD* en anglès). En el cas de les dones no hi ha cap anormalitat anatòmica present, però un canvi en la naturalesa del mucus cervical s'ha hipotetitzat com a causa d'una reducció en la fertilitat.

CFTR

El gen CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (GDB:P13569) (Kerem et al. 1989; Riordan et al. 1989; Rommens et al. 1989) abraça 250 kb al braç llarg del cromosoma 7 (7q) i està compost de 27 exons. Es transcriu en un RNA missatger de 6,5 kb que codifica per una proteïna de 1480 aa d'una massa de 168 kd, amb una glicosil·latzió de la proteïna molt reduïda (Welsh et al. 2001).

El lloc majoritari d'expressió és en la membrana apical de les cèl·lules epitelials. Quant a l'epiteli respiratori, l'expressió no és uniforme. En les cèl·lules ciliades de l'epiteli de superfície s'expressa en un número reduït de còpies i la quantitat present en membrana és baixa, en canvi l'expressió és molt alta en un petit grup de cèl·lules no ciliades (<1%) de l'epiteli de superfície distal i les cèl·lules distals de les glàndules submucoses. En altres tipus cel·lulars també s'ha detectat expressió de CFTR, encara que d'una forma minoritària: neutròfils (Yoshimura et al. 1991) o limfòcits (Bubien 2001).

L'expressió de CFTR està fortament regulada durant el desenvolupament i és específica de teixit i de tipus cel·lular. El patró d'expressió està conservat en les diferents espècies de mamífer. Les seqüències a 5' determinen els nivells basals de la transcripció de CFTR i la comparació, ha posat de manifest la presència d'elements reguladors en cis en una zona de 34 pb al voltant del codó +1. S'han identificat dos seqüències consens que corresponen a una caixa CCAAT invertida i una variant de l'element de resposta a cAMP (*CRE*).

A part de la generació de transcrits amb regions no traduïdes a 5' degut a l'ús de diversos inicis de la transcripció, hi ha fenòmens d'*splicing* alternatiu que produeixen diferents isoformes, encara que no sempre amb una significació biològica: la deleció de l'exó 5 produeix en humans una isoforma que no s'expressa a membrana, però que és present en altres espècies (múscul cardíac de conill), la incorporació d'un exó nou (exó10a) sembla produir una proteïna no funcional més curta, i la deleció de l'exó 13 i part del 14a en ronyó, també present

en rata, produeix una isoforma funcional. Tot i així aquests són fenòmens poc freqüents però que posen de manifest la diferent regulació depenen de teixit i d'espècie.

La forma més comú d'*splicing* en humans és la deleció completa de l'exó 9. Existeix una variació important quant a la quantitat de transcrits amb la deleció de l'exó 9; des de l'absència fins al 92% del total. La variabilitat és produïda per la diferent llargada d'una cua de polipirimidines (cua poli-T) en el lloc acceptor d'*splicing* davant de l'exó 9. La llargada determina l'eficiència de l'*splicing* de l'exó 9. La menor eficiència és en el cas dels homozigots 5T/5T, amb un rang de 89-92% de transcrits mutats. Les altres variants 7T i 9T estan associades a una millor eficiència en l'*splicing*. La freqüència al·lèlica de l'al·lel 5T és prop del 5% en població caucasiana i en afroamericana, un 10% per al 9T i 85% per a l'al·lel 7T. Factors específics de teixit modifiquen la eficiència de l'*splicing*, així en el vas deferens i l'epiteli nasal la proporció de transcrits sense l'exó 9, de forma independent de la seqüència de pirimidines, és menor que en altres teixits (Chiba-Falek et al. 1999).

Funcions de CFTR

CFTR és un membre de la família dels transportadors *ATP-Binding-Cassette* (ABC) (Hyde et al. 1990), que funciona com un canal epitelial d'ions clorur dependent de fosforil·lació. Es troba localitzat predominantment a la membrana apical de les cèl·lules epitelials, on té un paper important en el transport transepitelial de sal, flux de fluid i concentracions d'ions; ja sigui en la seva absorció (conduïda de la glàndula de la suor i en epitel respiratori) o secreció (intestí, pàncrees i cargol secretor de la glàndula de la suor). L'absència de CFTR, o de la seva correcta funció, comporta una alteració de les propietats físiques o bioquímiques de les cèl·lules de l'epiteli i del seu microentorn (Frizzell 1995). Així doncs, el CFTR

- ✓ A nivell apical i com a canal d'ions clorur té un paper essencial en la regulació de les característiques del transport iònic transepitelial, a més actua com a regulador d'altres canals d'ions (ORCC, EnaC, ROMK2).
- ✓ A nivell dels compartiments intracel·lulars és present en les membranes d'òrgans interns podent actuar i modificar les característiques dels fluids interns, d'aquesta forma pot alterar els mecanismes de processament de diverses molècules, modificar les seves propietats, alterar processos de apoptosi, produir productes

antioxidants contra dany titular, etc. A més, s'ha observat que CFTR interacciona amb el citoesquelet i que pot tenir una funció activa en l'endocitosi i l'exocitosi.

- ✓ Té un paper actiu (directe i indirecte) en la immunitat innata contra infeccions bacterianes.

Estructura molecular del canal CFTR

El model de la seva estructura es basa en la seqüència primària (Riordan et al. 1989) i en l'estructura d'altres membres de la mateixa família. La família de transportadors anomenada ABC es defineix per la presència de dominis d'unió a nucleòtids (NBD) molt conservats i la presència de dominis transmembrana (MSD) amb una mateixa estructura encara que amb seqüències diferents. El CFTR està compost per dos dominis MSD (MSD1 i MSD2), que consten de sis segments transmembrana cadascun (M1-6 i M7-12), i dos dominis NBD (NBD1 i NBD2) que conté seqüències que interaccionen amb ATP (figura 13). MSD1 i MSD2 estan units per un únic domini regulador (R) que conté múltiples seqüències consens de fosforil·lació. Els dominis R i NBD estan a la part intracitoplasmàtica, encara que el NBD també s'ha descrit associat a membrana (Sheppard i Welsh 1999).

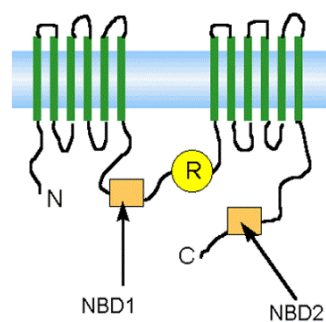


Figura 13
Model dels dominis proposats per al CFTR. MSD, MT, NBD, R, ATP)

Estudis de mutagènesi han permès assignar un paper a cadascun dels dominis de CFTR (revisat a Sheppard, 1999 (Sheppard i Welsh 1999). Els dominis NBD regulen l'inici i duració de l'obertura del canal. NBDs tenen uns motius altament conservats, entre ells els dominis Walker (1 i 2) que uneixen ATP, i els dominis LSSGGQ, que són comuns a altres GTP-binding proteins. Els dos dominis NBD, no són equivalents; NBD-2 pot actuar com a regulador negatiu, unint-se d'una forma competitiva a ADP.

Els dominis MSD, contribueixen a formar el canal del porus; un canal estret amb dos vestibuls (extern i intern) que determinen la conducció i la permeabilitat passiva dels ions, així com el bloqueig per altres (p.ex., iodur). Aquests dominis són els que determinen l'especificitat del transportador, activant-se mitjançant canvis conformacionals a partir de la hidròlisi d'ATP que té lloc en el domini NBD.

El domini regulador R conté múltiples seqüències de fosforil·lació per a PKA (proteïna quinasa A), però d'altres quinases també poden actuar, com la PKC (proteïna quinasa C), la fosforil·lació de la qual es creu necessària per a l'acció de la PKA. La fosforil·lació d'aquestes seqüències R estimula l'activitat ATPasa al NBD, que queda inhibida per l'acció de diverses fosfatases, com la PP2C α , que és present a intestí i epitelí respiratori. El procés de fosforil·lació és gradual, permeten una fina regulació de l'obertura del canal. Basats en la seqüència, s'han descrit dos dominis dintre de R (1 i 2), el primer, a diferència del segon està molt conservat, encara que la majoria de llocs de fosforil·lació estan al R2.

El control de l'obertura està regulat pel balanç de l'activitat quinasa-fosfatasa i pels nivells d'ATP a la cèl·lula. L'activació de la PKA regulada pel cAMP, produeix la fosforil·lació de múltiples residus serina al domini R, i aquesta fosforil·lació és regulada per cicles d'hidròlisi d'ATP als dominis NBD.

CFTR en la malaltia respiratòria

Basats en la seva funció com a canal d'ions clorur en la membrana apical, la seva disfunció comporta una alteració de la composició i volum del LSR (líquid de la superfície respiratòria), la qual cosa provoca una alteració de la correcta neteja del mucus per part dels cilis.

La funció en els compartiments intracel·lulars, produeix alteracions en els processos de maduració (sialització, sulfatació) de les glicoproteïnes de l'embolcall extracel·lular, que un cop secretades provoquen canvis en la composició del LSR; la qual cosa d'una banda proveeix de nous lligands als bacteris, i per altra banda produeix una obstrucció de les glàndules submucoses, impedit la correcta funció de la major part de les defenses antibacterianes respiratòries (p.ex., lisozima, lactoferrines, betadefensines, IgAs,

peroxidases) i altres productes del LSR (p.ex., inhibidors de proteases, albúmina).

La resposta inflamatòria es veu influïda per alteracions en el CFTR, ja que afecta als processos d'opsonització o d'apoptosi, desequilibris en la producció d'agents oxidants, disminució d'antioxidants (glutatió) o desregulació de la producció de citocines. D'altra banda els bacteris, mitjançant la producció d'exoproducció i de la inducció de gens de mucines, poden col·laborar en el manteniment persistent de la infecció. Infecció i inflamació són dos processos cabdals en l'establiment de la patologia respiratòria. La repetició de cicles d'infecció, inflamació i la incorrecta neteja ciliar comporta alteracions morfològiques dels pulmons i a la pèrdua de funcionalitat. En la figura 14 es resumeixen com les disfuncions en el canal de CFTR poden produir la malaltia respiratòria (revisat a Pilewski i Frizzel, 1999).

Mutacions al gen *CFTR*

La Fibrosi Quística és una malaltia monogènica recessiva causada per mutacions a *CFTR*. És la malaltia recessiva més comú en la població caucasiana, amb una incidència que en poblacions europees és per mitjana entre 1/2000 i 1/4000 naixements (Welsh et al. 2001). Aquestes dades d'incidència han estat confirmades en estudis de triatge neonatal en diferents poblacions. La FQ és menys freqüent en poblacions africanes i americanes: 1/9000 en població mexicana, 1/15000 en població afroamericana, i molt poc freqüents en poblacions asiàtiques; 1/ 90000 a Hawaii i 1/323000 en població japonesa. Per contra en determinades poblacions europees (o derivades) s'han reportat dades amb una incidència molt alta, com la descrita en determinades zones de la Bretanya francesa i de la regió franc-canadenca del Quebec, ja amb unes incidències altes; 1/377 i 1/891 respectivament.

S'han descrit més de 1000 mutacions en el gen des de la seva caracterització, i la seva classificació atent a diferents criteris: des del punt de vista funcional, genètic o de la freqüència que s'observen.

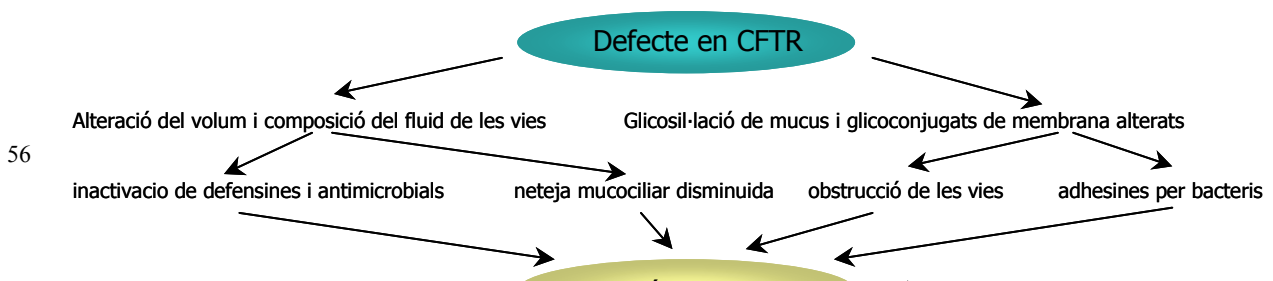


Figura 14

Sumari de les alteracions produïdes en les vies respiratòries per un defecte en CFTR (modificat de Pilewski i Frizzel, 1999). Cicles d'infecció i inflamació porten a una obstrucció respiratòria important.

Funcionalment

Segons el tipus de disfunció que ocasiona; les mutacions es poden classificar en cinc classes (I-V), tot i que moltes vegades una mutació causi més d'un tipus de disfunció.

Classe I: Manca o reducció de la quantitat de proteïna. Són mutacions sense sentit o insercions o delecions que produeixen una aturada prematura de la síntesi degut a alteracions de la pauta de lectura.

Classe II: Processament defectiu de la proteïna. Aquestes mutacions afecten al correcte processament de la proteïna. En condicions normals només un 30% de la proteïna sintetitzada és correctament processada, essent degradada abans de sortir del reticle endoplàsmic. Seqüències específiques del gen han estat relacionades amb el correcte plegament, i mutacions en aquests dominis poden actuar com a mutacions supressores. Una part de la proteïna pot arribar a la membrana encara que amb una funció disminuïda (pex, F508del).

Classe III: Regulació defectiva. Les proteïnes són presents a la membrana, però mutacions als dominis NBD, i R afecten a la correcta regulació del canal. Depenen del grau de disfunció del canal, hi ha una severitat més o menys forta.

Classe IV: Conductivitat defectiva. En aquesta categoria també es detecta proteïna a la membrana, però

tenen una conductivitat reduïda. Són mutacions que afecten principalment als dominis transmembrana que formen el porus del canal.

Classe V: Nivells de RNA missatger. Són mutacions que afecten el nivell de transcripció o l'*splicing*.

Genèticament

La major part de les variants de seqüència detectades consisteixen en canvis puntuals o petites delecions de pocs nucleòtids. Només un 1% de les variants patològiques associades a FQ són reordenacions per delecions o insercions de centenars a milers pb. Les altres són: mutacions amb error de sentit (44%), mutacions de canvi de pauta de lectura (22%), mutacions d'*splicing*, (16%), mutacions de final de lectura (14%), mutacions de delecions en pauta (2%). Només un 1% de les mutacions detectades es troben en la part 5' no traduïda del gen (Welsh et al. 2001).

Freqüència

Una classificació molt emprada es basa en la freqüència amb la que es presenten a la població estudiada, es diferencien de major a menor prevalença entre; mutacions comunes, poc comunes i rares. Les mutacions més comuns són poques: amb una freqüència menor del 0,1%. El 94% de les mutacions són classificades com a rares, i només un petit grup de 20 mutacions (5%) tenen una freqüència per sobre del 0,1%.

Aquesta classificació depèn de la població; així algunes mutacions són específiques o bé són comuns, mentre que en altres poblacions són rares o absents.

Mutacions o polimorfismes

Generalment les mutacions són reportades a nivell d'ADN, amb la descripció del pacient o grup de pacients en el que ha estat identificada, però no existeix una base funcional per classificar-les. Existeixen, però, una sèrie de criteris per assignar un paper als canvis de seqüència (Welsh et al. 2001).

- a) Evidència d'una alteració de la funció en el teixit diana o altres.
- b) Afecció de residus que estan molt conservats evolutivament en el CFTR o en altres membres de la família dels transportadors ABC.
- c) Coincidència d'altres mutacions demostrades en el mateix codó.
- d) Absència de la mutació en 100 cromosomes d'individus sans de la mateixa població i grup ètnic.
- e) Absència d'altres canvis en la seqüència.

Correlació genotip-fenotip en FQ

En el cas de *CFTR* existeix una correlació clara amb la malaltia pancreàtica i les anormalitats en el tracte reproductiu masculí, però no amb les manifestacions pulmonars o el meconi. Aquestes correlacions es basen principalment en la quantitat de funció que reté el canal mutant i en els requeriments per a la funció correcta de l'òrgan. Mutacions que causen la forma clàssica de FQ presenten uns nivells entre 1-3% del normal (Chu et al. 1993), mentre que la retenció de part de la funció està associat a formes atípiques de la malaltia. El grau d'afecció depèn del teixit implicat (Estivill 1996).

A continuació s'exposa breument les correlacions que s'ha pogut establir en algunes de les mutacions de *CFTR*.

Malaltia pancreàtica

Germans amb genotips idèntics, tenen més d'un 95% de concordança en el cas de la SP. Les mutacions relacionades amb la SP es caracteritzen per

presentar una funció residual, mentre que les de IP presenten una absència de funció.

Infertilitat masculina

El 97% dels homes afectes de FQ pateixen infertilitat degut a CBAVD. Els pacients amb CBAVD presenten, des d'anormalitats aïllades del tracte reproductiu, fins a formes lleus de FQ amb infertilitat, i el 75-85% dels individus presenten mutacions al gen de *CFTR*, encara que l'espectre mutacional associat és diferent (Anguiano et al. 1992; Chillon et al. 1995). La mutació d'*splicing* IVS8-(T)₅ és molt més freqüent en CBAVD que a la població general. Les formes de FQ estan causades per la presència de la forma (T)₅ a més d'una segona mutació.

Malaltia pulmonar

Existeix una correlació amb la severitat de la malaltia, mesurada per la funció pulmonar (FEV₁), però aquesta només és present en casos de mutacions que mantenen una certa funció. La correlació més alta és en casos de SP (suficiència pancreàtica), indicant que la menor severitat de la malaltia pulmonar és deguda a l'estat nutritiu, mes que al genotip. També s'ha correlacionat la presència d'infecció per *Pseudomonas aeruginosa*, encara que en estar associada a SP, no es pot deslligar de la millora nutritiva. En el cas de la mutació R117H, aquesta en un determinat *background* genètic (combinació amb al·lel IVS8-(T)₇) permet un funcionament pulmonar normal, independentment de l'estat nutritiu.

Freqüència de les mutacions

La taxa de noves mutacions és molt baixa, la majoria han passat una vegada durant l'evolució humana i apareixen agrupades en determinats haplotips (Morrall et al. 1994; Bertranpetit i Calafell 1996; Mateu et al. 2002). La mutació més freqüent a la població caucàsica és la deleció del codó 508 (F508del). La seva freqüència és de 70% en les poblacions caucàsiques amb ancestres europeus, en canvi és absent en algunes poblacions africanes o asiàtiques. En les poblacions europees hi ha un efecte geogràfic amb una prevalença que augmenta progressivament des del sud-est al nord-oest d'Europa.

Taula 16

Freqüència de les mutacions més comuns de *CFTR* en els diferents continents (dades modificades a partir de l'informe de *The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*, 1997)

	G85E	R117H	621+1G>T	711+1G>T	1078delT	R334W	R347P	A455E	I507del	F508del	1717-1G>T	G542X	S549N	G551D	R553X	R560T	1898+1G>A	2184delA	2789+5G>A	R1162X	3659delC	3849+10kbC	W1282X	N1303K
Europa Nord	0,1	0,2	0,4	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,26	70,2	0,7	2,07	0,0	1,68	0,7	0,1	0,19	0,0	0,1	0,1	0,18	0,1	0,56	0,98
Europa Sud	0,1	0,0	0,5	0,1	0,02	0,2	0,3		0,06	55	0,8	3,6	0,2	0,5	0,6		0,13	0,0	0,1	0,9	0,01	0,1	0,6	2,45
Amèrica	0,1	0,5	1,4	0,2	0,00	0,1	0,2	0,2	0,19	66,1	0,4	2,2	0,0	1,0	0,0	0,2	0,01	0,0	0,1	0,1	0,13	0,5	2,34	1,24

La freqüència és de 30% a Turquia, 40-50% al sud d'Itàlia, 53% a Espanya, 70% en la població centreeuropea fins a nivells del 85-88% a Dinamarca i les Illes Britàniques (Estivill et al. 1997). La meitat dels pacients de FQ són homozigots per a la F508del, en la seva absència, la FQ tindria gairebé la mateixa incidència en totes les races. A la taula 16 es resumeixen algunes de les mutacions més freqüents en diverses poblacions del mon. Per a explicar l'alta freqüència de la mutació F508del. S'ha proposat un efecte dominant de l'al·lel mutant, amb un avantatge de l'heterozigot FQ. Estudis *in vitro* han demostrat la major resistència a la infecció per diversos patògens; protegint contra la deshidratació produïda per *Vibrio cholerae* (Gabriel et al. 1994), o bé contra l'adhesió a *Salmonella typhi* (Pier 2000). Altres hipòtesis proposen, de forma alternativa, que els al·lells mutats haurien estat seleccionats degut a l'efecte d'un gen en desequilibri de lligament amb la mutació. Recolzant aquesta hipòtesi un estudi en població centreeuropea ha demostrat que dones portadores dels haplotips associats a les mutacions freqüents (F508del i altres mutacions) tenen una taxa de supervivència més elevada (Welsh et al. 2001).

Mutacions al gen CFTR en patologia no FQ

Afeccions respiratòries

Ja abans de la descripció del gen *CFTR*, als anys 60 es va investigar la hipòtesi que els parents sans dels malalts presentessin predisposició a desenvolupar malalties respiratòries. Els resultats varen ser diversos i contradictoris; així alguns estudis no varen detectar diferències en la funció pulmonar, bronquitis crònica o asma (Batten et al. 1963; Hallett et al. 1965; Sandford et al. 1997), en canvi d'altres varen observar un increment de l'HRB i de les sibilàncies amb reducció de la funció pulmonar (FEV₁) (Davis i Vargo 1987).

Respecte la presència de símptomes al·lèrgics en pacients amb FQ, els estudis també són contradictoris, no detectant increment en la prevalença de l'atòpia

(Counahan i Mearns 1975) o bé detectant un increment de pacients amb història de malalties al·lèrgiques o amb tests SPT positius (Lowenfels et al. 1998; Warner 1998).

Després de la identificació del gen *CFTR* i amb les noves tècniques de triatge s'ha produït la identificació de nombroses variants gèniques. Encara que s'ha establert un consens per determinar si una variant pot ser considerada com una mutació de FQ (Rosenstein i Cutting 1998), l'espectre clínic de la FQ i de les malalties associades a mutacions de *CFTR* s'ha incrementat molt.

A continuació es fa una relació de les malalties associades a variants de *CFTR* que poden presentar-se de forma independent o bé associades a formes atípiques de FQ. D'aquesta llista s'ha exclòs la infertilitat produïda per CBAVD, per estar clarament demostrada la seva relació amb les mutacions en *CFTR*. En canvi en les altres malalties, no s'ha pogut encara demostrar la implicació directa de les mutacions descrites amb el desenvolupament de la malaltia.

La majoria són malalties associades a alteracions respiratòries (de les vies superiors i inferiors): sarcoïdosi pulmonar, bronquitis crònica i emfisema (COPD), bronquiectàsies, aspergil·losi al·lèrgica broncopulmonar (ABPA), asma bronquial, atòpia, poliposi nasal, rinosinusitis o bé de naturalesa digestiva; pancreatitis crònica idiopàtica i hipertripsinèmia.

Vies superiors

S'ha observat que pacients amb afecció de les vies respiratòries superiors, com la rinosinusitis presenten mutacions a *CFTR* (Wang et al. 2000).

Vies inferiors

La relació de *CFTR* amb les malalties respiratòries obstructives ha estat estudiada en diverses poblacions mitjançant estudis de lligament (Gasparini et al. 1990) o de forma directa mitjançant la cerca de mutacions al gen (Dumur et al. 1990; Poller et al. 1991; Akai et al. 1992; Gervais et al. 1993). Pignatti *i col·l.*, en

un estudi d'una sèrie de pacients amb diverses patologies respiratòries van detectar un increment de mutacions en pacients amb bronquiectàsies i amb sarcoïdosi pulmonar (Pignatti et al. 1995; Bombieri et al. 1998; Bombieri et al. 2000b) (taula 18).

L'ABPA és una malaltia inflamatòria de les vies aèries causada per la sensibilització al fong *Aspergillus fumigatus* (*Af*) que pot conduir a l'aparició de bronquiectàsies (Greenberger 1988). Generalment es presenta com una complicació del procés patològic de la FQ i s'ha observat que entre el 2 i el 11% dels pacients de FQ la pateixen, encara que la població sensibilitzada a *Af* és més alta (Becker et al. 1996). En l'anàlisi completa de la regió codificant del *CFTR* en pacients amb ABPA (amb nivells normals de suor), es va observar un increment de variants (Miller et al. 1996), d'igual forma que en l'estudi parcial de 13 mutacions comunes (Marchand et al. 2001) (taula 17). Pignatti i col·l, en l'estudi d'una sèrie de pacients amb malalties pulmonars

també han identificat portadors de variants en pacients amb ABPA (Pignatti et al. 1995).

Afeccions no respiratòries

Altres malalties no respiratòries relacionades amb alteracions de la funció pancreàtica han estat associades amb un increment de la freqüència de mutacions en el gen: pancreatitis idiopàtica i la hipertripsinèmia del nounat. La hipertripsinèmia del nounat, es caracteritza per la presència de tripsinogen en sang, com una conseqüència d'una disfunció obstructiva del pàncrees. La pancreatitis crònica està associada a manifestacions lleus de la FQ (FQ amb suficiència pancreàtica) i té com a principal factor etiològic l'alcohol (i d'altres factors com el tabac, etc..) sent idiopàtica en el 40% dels casos.

Diversos estudis han observat una alta freqüència de mutacions en pacients amb hipertripsinèmia del nounat (Castellani et al. 1999; Castellani et al. 2001) i en la pancreatitis crònica idiopàtica (Cohn et al. 1998; Sharer et al. 1998; Castellani et al. 2001).

Taula 17

Mutacions i variants descrites en els principals estudis de ABPA

	Miller, 1996	Marchand, 2001	Eaton, 2002
	parcial (15 mutacions i part de la zona codificant)	dirigida (13 mutacions)	dirigida (13 mutacions i total en 6 individus)
ABPA	11 individus	21 individus	34 individus
mutacions	F508del/R347H R117H-7T	F508del G542X R1162X 1717-1G R117H	F508del R117H
variants	R75Q 129 G/C 5T		
grup comparatiu	53 pacients amb bronquitis	43 asma negatius per a <i>Af</i> 142 població general	21 asma positius per a <i>Af</i> i no ABPA 28 asma negatius per a <i>Af</i>

Taula 18

Mutacions i variants descrites en els principals estudis realitzats en pacients amb malalties respiratòries. Els estudis s'han centrat en l'estudi d'una regió del gen o en determinades variants (parcial) o bé en l'estudi complet de la part codificant del *CFTR* (total). En negreta estan remarcades les variants classificades com a mutacions per a FQ.

	Poller 1991	Girodon 1996	Bombieri 1998	Bombieri 2000	Wang 2000	Tzetis 2001
Tipus de cerca	Parcial (Exó 10 i 11)	Total i haplotip TG _m -T _n	Total i TG _m -T _n	Total i TG _m -T _n	Parcial (16 mutacions) i TG _m -T _n	Total i TG _m -T _n
Test de la suor NPD	No fet No fet	Negatiu No fet	Negatiu No fet	Negatiu No fet		Negatiu No fet
Grup afecte	10	32		26	147	19
BE	F508del	F508del I507del 1717-1G>4 G551D 2183AA>G 3849+10kbC>T 406-2A>C D192N I556V H949Y R31C L997F T1220I R75Q E528E	23 F508del R75Q G576A R668C L997F R1066C 5T 3667insA M1137V 2736A>G 2736A>G **875+40G>T 125G>C TTGA 2694T>G 4521G>A			F508del I1027T D565G R668C T896I I148T S977T 5T
MOPC			27 ind. (BC)			12 ind. F502V S1235R 5T
			P11L R117H E585X P1072L R668C 5T 3271+18C>T 1716G>A 3041-71G>C 2377C>T 4002G>A 4404C>T 4029A>G grup**			
i Sarcoïdosis			8 ind.	F508del E826K 4382delA L997F V754M grup**	R75Q R347P 621+3 A>G 1898+3A>G L997F G1069R 1991V	
Altres malalties pulmonars no obstructives			26 CP	I148T D1270N R74W Y301C 5T grup**		
Rino-sinusitis					F508del G542X N1303 K L997F L967S	
Grup control	No	No	33 població general	89	123	52 població general
controls				L997F R31C I506V 5T 1716G>A 3690A>G 4002G>A 4404C>T **		F5085del F1052V R668C D565G R75Q R297Q L997F 5T

Abreviatures en la taula: BE (bronquièctasies disseminades), MOPC (malaltia pulmonar obstructiva crònica), BC (bronquitis crònica), CP (càncer de pulmó), NPD (test de potencial nasal)
 ** grup de variants comuns detectades en l'estudi de Bombieri 1998 en diversos grups de pacients i en controls

Taula 19a
Característiques dels principals estudis de lligament genètic de cerca global del genoma realitzats amb psoriasi

	Tomfohrde 1994	Matthews 1996	Nair 1997	Trembath 1997	Capon 1999	2001	Enlund 1999	Samuelsson 1999	Lee 2000	Veal 2001
Població	Caucàsica (EUA)	Nord-est Regne Unit i Irlanda)	EUA (Alemanya)	Caucàsica (Regne Unit)	Caucàsica (Itàlia)		Caucàsica (Suècia, sud-est)	Caucàsica (Suècia, sud-est)	Nord d'Alemanya	Caucàsica (Regne Unit)
	outbred	outbred	outbred	outbred	outbred		outbred	outbred	outbred	outbred
Criteria psoriasi	Plaques	Plaques	≥ 2 lesions de psoriasi o 1 lesió ≥1% superfície corporal	Plaques	Plaques		Plaques	Plaques	≥ 2 lesions de psoriasi o 1 lesió de ≥1% superfície corporal	Plaques en el moment de diagnòstic
Estratègia de selecció			Edat <40 >1 germà afectat o ≥4 membres afectes en famílies extenses	≥2 membres afectes Premsa, metge i agrupació	>1 germà afectat o al menys un altre afectat a la família		Els dos pares no afectes Agrupació	Els dos pares no afectes Agrupació	≥3 afectes en dos o quatre generacions	≥ 1 parell de familiars informatius Metge
Famílies (individus)	8 famílies (n=151)	1 de 6 famílies	115 famílies (n=726)	41 famílies (n=262) 28 famílies (n=61)	1 (n=21) de 22 famílies (n=224)		20 i 104 famílies (n=440)		32 famílies (n=354)	158 famílies
Tipus de família	Extensa	Extenses	86 nuclears 29 extenses	Extenses	Extenses		Nuclears (múltiples afectes)	Nuclears (múltiples afectes)	Extenses	Nuclears
Característiques de l'estudi		No afectes <30 anys com desconeguts			No afectes <30 anys com desconeguts		Estratificació origen geogràfic	Estratificació clínica	Clínica pustulosa exclosa No afectes <20 anys exclosos	Fenotip desconegut inclosos Imprinting Epístasi Estratificació lligament
Població replica	On stage	two stages	alemanya-americana Two stages	one stage	two stages		two stages i associació independent		one stage	one stage
Anàlisi estadística	AO, LOD (two points) APM APM Multipoint	LOD (two points) ARM (Genehunter; NPL Multipoint)	LOD (two points) SP ARM (Genehunter; NPL Multipoint)	LOD (two points) IBD HRR	LOD (two points) ARM (Genehunter; NPL Multipoint)		LOD (two points) ARM (Genehunter; LOD i NPL Multipoint) TDT	ARM (Genehunter; LOD i NPL Multipoint)	ARM (Genehunter; LOD i NPL Multipoint)	SP ARM (Genehunter; NPL Multipoint)
Marcadors	1/10 cM	180	1/12,5 cM (n=287) + 53	1/14,1 cM (n=260)	1/10 cM (n=198)		1/10 cM	1/10 cM	1/10 cM (n=70)	1/13 cM (n=271)

Abreviatures

Outbreed / imbreed; poblacions genèticament obertes / tancades

AO; "affected only". APM "Affected pedigree member". ARP "Affected relative pair". NP; anàlisi no paramètric. SP; sib-pairs; anàlisi de compartició d'al·lels en parelles de germans

TDT; anàlisi d'associació pel test de desequilibri de la transmissió

IBD; idèntics per descendència

two-stage; estudi genètic de lligament que inclou la repetició i saturació de marcadors en una segona mostra

Taula 19b
Resultat de les cerques globals del genoma realitzades per a la psoriasi

	Tomfohrde 1994	Bhalerao 1998*	Matthews 1996	Nair 1997	Trembath 1997	Capon 1999**	Capon 2001	Enlund 1999	Samuelsson 1999	Lee 2000	Veal 2001
1p											D1S197 D1S200
1q	+					D1S514 D1S498 D1S1664 D1S2346					
2p					D2S134						
3p			D3S1285								
3q						+		D3S1269 D3S1551	D3S1269 D3S1551 (no afecció de les articulacions)		D3S1314 (telomèric a D3S1551)
4p					D4S418						
4q		D4S1535 D4S408 D4S1540	D4S1551 D4S413 (centromèric a D4S1535) D6S276 D6S291 D6S270			+			++		
6p					D6S276 D6S273	++		++	++ (no afecció de les articulacions)	D6S260 D6S422	D6S276 D6S273 D6S291
7p											D7S519
8q					D8S284					D8S286 (centromeric a D8S284)	
10q			D10S569 D10S583								
12p					D12S99						
14q					D14S50						+
16q			D16S3032 D16S3110		D16S422 D16S289						
17q	D17S784 D17S928	D17S795	D17S785 D17S802			++		++	++		
18q			D18S474								D18S59 D18S1150
19p										D19S916 D19S865	D19S901 D19S922
20p			D20S882 D20S900 D20S851 D20S917		D20S186						
21q										D21S1256	

* anàlisi preliminar d'una cerca global realitzada pel mateix grup
 ** anàlisi preliminar d'un triatge previ de les regions *PSORS* en 1999
 +/++ resultats suggestius de lligament e les regions indicades

Taula 20a

Característiques dels principals estudis de lligament genètic de cerca global del genoma realitzats per a l'asma

	Daniels 1997	CSGA 1998	Ober 1999	Ober 1999	Ober 2000	Wjst 1999	Malerba 1999	Mathias 2000	Dizier 2000	Laitinen 2001
Població	Caucàsica (Austràlia)	Diversos grups ètnics Afroamericans (AA) Caucàsics (C) Hispanos (H)	Caucàsica Hutterittes EUA (Alemanya)	Caucàsica Hutterittes EUA (Alemanya)	Caucàsica Hutterittes EUA (Alemanya)	Caucàsica (Alemanya/ Suècia)	Caucàsica (Itàlia)	Hutterittes (EUA- Alemanya)	Caucàsica (França)	Caucàsica (Kainu-Finlàndia)
Tipus d'asma	Outbred	Outbred	Inbred	Inbred	Inbred	Outbred	Outbred	Inbred	Outbred	Inbred i outbred
Tipus d'asma	IgEs elevades, SPT o spIgEs	Asma i atòpia	Síntomes resp., HRB i asma (loose)	Síntomes resp., HRB i asma (loose)	Síntomes resp., HRB i asma (loose)	asma	asma	asma	asma	asma
Estratègia de selecció	Asma atòpia	>2 germans afectes asma	Asma	Asma	Asma	>2 germans amb asma	>2 germans amb asma	Asma	>2 germans amb asma	>1 afecte amb asma
Famílies	80 famílies (n=364)	140 famílies (43 AA 79 C 18H)	1 família extensa (n=361)	1 família extensa (n=370)	1 família extensa (n=693)	97 famílies	172 famílies		107 famílies	253 famílies
Tipus de família	Nuclear	Extenses nuclears	Extensa	Extensa	Extensa	Extensa	Extensa	Extensa	Nuclear / extensa	Nuclear / trios /extensa
Tipus d'estudi	two-stage	one-stage en diferents grups ètnics	two-stage	two-stage	one-stage		one-stage / rèplica		two-stage / rèplica*	two-stage
Població replica	Britànica	No	Hutterittes	Hutterittes	No	Alemanya sueca	Italiana	Hutterittes	Francesa	Canadenca finesa
Anàlisi estadística	sib-pair		LR (sib-pair) TDT	TDT	LR (sib-pair) TDT	IBD Múltiples punts NP	TDT Múltiples punts NP	QTL	IBD Múltiples punts NP	TDT Múltiples punts NP
Marcadors	269 (13 Xlink)		295	295	563 (386 +177)	351	preliminar (42)		254	

Abreviatures de la taula

AA; grup ètnic afroamericà; C; grup ètnic caucasià; H; grup ètnic hispà

Outbred / inbred; poblacions genèticament obertes / tancades

NP; anàlisi no paramètric

sib-pairs; anàlisi de compartició d'al·lels en parelles de germans

TDT; anàlisi d'associació pel test de desequilibri de la transmissió

IBD; idèntics per descendència

QTL; locus quantitatiu (*quantitative trait locus*)

two-stage; estudi genètic de lligament que inclou la repetició en una segona mostra

Fenotips d'asma: HRB, hiperresposta bronquial; eos, eosinofília; SPT, test cutani de pell (*skin prick test*); Simp. resp., presència de símptomes respiratoris; asma loose; (símptomes respiratoris o HRB)

Taula 20b
Resultat de les cerques globals del genoma realitzats per a l'asma

	Daniels 1997	CSGA 1998	Ober 1998	Ober 1999	Ober 2000	Wjst 1999	Maierba 1999	Mathias 2000	Dizier 2000	Laitinen 2001
1p				1p32 (D1s239) > 1 SPT					1p31* asma	
2p						2p14 (D2s2298) IgE asma HRB SpIgE				
2q		2q33 asma (H)								
3p			2q21 (D2S1328) simp/HRB							
3q			3p21 (D3S1768) simp/HRB	D3S1766 > 1 SPT (centromèric a D3S1768)		3p21 (D3s3564) asma				
4q	4q35 D4s426 IgE atòpia HRB+									
5p		5p15 asma (AA)			D5S1470+ HRB					
5q		5q23 asma (C)	5q23 (D5s1480) asma/HRB		D5s1462 + simp/HRB	5q31 (D5S1453) simp				
6p	6p21 IgE Eos	6p21 asma (C)		6p21 >1 SPT		6p21 (D6s291) Asma IgE spIgEs Eos				
7p	7p14 IgE Eos HRB						7p15 IgE spIgEs			7p14 asma IgEs
8q					8q13 + (D8s1136) asma	8q13 (D8s2324) SPT				
9q			9q21 (D9s922) simp/HRB	9q21(D9s1119) >1SPT		9q22 (D9s938) simp	9q22 (D9s1784) Asma IgE enIgE			

Abreviatures de la taula

AA; grup ètnic afroamericà; C; grup ètnic caucasià; H; grup ètnic hispà. Outbred / inbred; poblacions genèticament obertes / tancades.

Fenotips d'asma: HRB, hiperresposta bronquial; eos, eosinofília; SPT, test cutani de pell (*skin prick test*); Simp. resp., presència de símptomes respiratoris; asma *loose* (símptomes respiratoris o HRB)

Taula 20c

Resultat de les cerques globals del genoma.

	Daniels 1997	CSGA 1998	Ober 1998	Ober 1999	Ober 2000	Wjst 1999	Malerba 1999	Mathias 2000	Dizier 2000	Laitinen 2001
11q	FCER1 + spIgEs IgE						Eos		11q13*	
11p		11p15 asma (C)		11p11 (<i>D11S1392</i>) >1SPT		11p14 (<i>D11S899</i>) SPT			11p13**	
12q		12q15 asma (C/H)	12q15 (<i>D12s375</i>) asma/ HRB	12q14 (<i>D12s1036</i>) >1SPT		12q15 (<i>D12s351</i>) asma	asma spIgEs	12q12 asma**	12q24** eos	
13	13q13 (<i>D13s153</i>) atòpia asma	13q21 asma (C)		13p12 (<i>D13S787</i>) HRB		13p12 (<i>D13S787</i>) Simp			13q31*	Eos
14q		14q11 asma (C)			gata193a07 Simp HRB		14q32 l'HRB			
15q							IgE			
16p	<i>D16s289</i> Atòpia Asma HRB+ IgE+			16p12 (<i>D16s401</i>) SPT						
16q					16q24 (<i>D16s539</i>) SPT					
17p		17p11 Asma (AA)								
17q		17q11 Asma (AA)							17q** Asma SPT	
18q					ADYCYAP1 Simp.			18q23 (<i>D18S844</i>) IgE		
19q		19q13 Asma (C)	19q13 (<i>D19s178</i>) Asma	19q13 (<i>D19s900</i>) HRB	19q13 (<i>D19s540</i>) HRB		19q13 atòpia IgE		19q13* HRB	
20p						20p11 (<i>D20s470</i>) SPT				
21q		21q21 Asma (H)	21q21 (<i>D21s1440</i>) Asma	21q22 (<i>D21s1262</i>) HRB						
Xp										

Abreviatures de la taula

AA; grup ètnic afroamericà; C; grup ètnic caucasià; H; grup ètnic hispà

Outbred / inbred; poblacions genèticament obertes / tancades

Fenotips d'asma: HRB, hiperresposta bronquial; eos, eosinofília; SPT, test cutani de pell (*skin prick test*); Símp. resp., presència de símptomes respiratoris; asma *loose* (símtomes respiratoris o HRB)

OBJECTIUS —————

L'objectiu global d'aquesta tesi ha estat aprofundir en el coneixement de les bases genètiques de l'asma i la psoriasi en la població espanyola.

Els objectius concrets d'aquest treball han estat:

- ✓ Obtenció d'una mostra ben caracteritzada de pacients amb psoriasi i de pacients amb asma.
- ✓ Identificació de les regions genòmiques de predisposició a psoriasi en població espanyola.
- ✓ Identificació de gens implicats en el desenvolupament de la psoriasi.
- ✓ Identificació de gens candidats implicats en patologia asmàtica.
- ✓ Valoració de la contribució de *CFTR* a la variabilitat del fenotip asmàtic.

RESULTATS

Aquest apartat de resultats s'ha estructurat en dos capítols independents corresponents als resultats obtinguts en l'estudi de la psoriasi i de l'asma. En cas que el treball realitzat hagi donat lloc a la publicació dels resultats, s'inclou una còpia de l'article en l'apartat corresponent. A més s'ha afegit una addenda quan s'ha realitzat un estudi complementari.

D'altra banda, per a facilitar la millor comprensió dels resultats presentats a continuació, s'inclou aquí una descripció de la metodologia seguida en l'anàlisi d'associació de les regions candidates estudiades.

Anàlisi de l'equilibri de Hardy-Weinberg

La presència d'equilibri genotípic en la mostra control es va posar com a requisit indispensable per a l'anàlisi de la mostra. L'anàlisi es va realitzar mitjançant comparació de les freqüències genotípiques observades amb les esperades sota equilibri de H-W, i comparació mitjançant test de χ^2 . Es va fer servir el programa d'utilitats LINKUTIL o el programa d'anàlisi genètica de poblacions GENEPOP.

Anàlisi d'associació per al·lels

De forma independent al model d'acció, es va estudiar la freqüència de les variants al·lèliques en els grups d'estudi. Per comparar les freqüències es va fer servir el test exacte de Fischer (test F).

Anàlisi d'associació per genotips

Es va realitzar observant l'associació sota tres supòsits diferents corresponents a tres models d'herència o d'acció: codominant, amb els tres genotips amb un efecte fenotípic diferenciat; recessiu, amb el genotip homozigot pel canvi estudiat com a causant de l'efecte fenotípic, i dominant en el cas que només la presència d'un al·lel sigui suficient per a la manifestació del fenotip (heterozigot i homozigot pel canvi).

Depenent de la freqüència de l'al·lel estudiat es van assajar només determinats models. En cas que la variant fos poc freqüent (amb una baixa freqüència d'homozigots) només es va estudiar el model dominant, donada la poca significació que representaven els altres models.

Com en l'anàlisi d'al·lels, la significació o el grau d'associació es va estudiar mitjançant el test exacte de Fisher. El test es va realitzar amb el programa d'anàlisi estadística SPSS 8.0, i quan no es partia d'evidències

prèvies d'associació, es va fer el test sota hipòtesis no direccional o test de dues cues de probabilitat (p2s).

Anàlisi d'haplotips i desequilibri de lligament

Estudis d'haplotips

Quan no es podien determinar amb certesa els haplotips dels individus es va fer una anàlisi d'estimació mitjançant el programa d'anàlisi genètica PMPLUS. Aquest mètode fa una estimació dels haplotips presents en la mostra a partir de la freqüència observada dels al·lels. El programa incorpora una opció en la que es pot fer una anàlisi sota diversos tipus d'herència, només amb els supòsits inicials de la prevalença observada per a la malaltia i un model de partida per a l'herència, definit a partir de diferents graus de penetració i de la freqüència de fenocòpies. A partir d'aquí, per anàlisi de versemblança s'estima la presència dels haplotips en la mostra de controls i de casos sota un model dominant, recessiu, models d'herència amb heterogeneïtat i una opció denominada *Model-free*, que no assumeix cap model d'herència. El programa, a més, incorpora un test per a l'estimació de la significació dels resultats d'associació a partir de la rèplica de l'estudi en n-rèpliques independents de les dades originals amb canvis en l'assignació de l'estatus d'afecció per a cada individu.

Anàlisi de l'associació al·lèlica

Per mesurar la presència de desequilibri de lligament és necessari conèixer els haplotips. En el cas de les mostres d'individus no relacionats l'estudi es va realitzar a partir de la freqüència estimada dels haplotips de la mostra. Aquesta anàlisi s'ha realitzat amb els programes PMPLUS i EHPLUS, en l'opció d'anàlisi d'associació al·lèlica, sense definir l'estat d'afecció.

Si era possible la determinació dels haplotips, l'estudi d'associació per haplotips es va fer comparant la freqüència dels haplotips observats en les mostres de casos i controls mitjançant el test de Fisher. L'estudi d'associació al·lèlica es va fer comparant la freqüència observada dels haplotips amb la freqüència esperada en cas d'equilibri de lligament entre els marcadors analitzats. Aquestes mesures es van realitzar amb el programa d'anàlisi genètica GENEPOP.

Mesura del Desequilibri de lligament:

En cas d'associació al·lèlica entre marcadors s'ha realitzat una mesura del grau d'associació al·lèlica o desequilibri de lligament, mitjançant el càlcul (real o estimat) del coeficient de desequilibri normalitzat (D'). Aquest coeficient dóna una mesura del grau d'associació i de la direcció del desequilibri (fase o repulsió). En el cas de l'estudi amb haplotips estimats, el càlcul s'ha fet manualment a partir de les freqüències estimades dels haplotips de la mostra o bé mitjançant el programa d'anàlisi genètica 2LD o xLD (per a marcadors bi-al·lèlics o multial·lèlics respectivament). Aquest programa ens dona el grau d'associació al·lèlica present a la mostra i calcula el coeficient D' de desequilibri de lligament. En el cas de conèixer els haplotips es va realitzar de forma manual seguint les indicacions d'Ott, 1999 (Ott 1999).

Anàlisi dels gens de predisposició a psoriasi en població espanyola

L'elevada prevalença de la psoriasi a la població general (1-2%), juntament amb la descripció d'un grau d'heterogeneïtat genètica variable entre diferents poblacions, van fomentar la necessitat de crear un grup d'estudi multidisciplinari amb la finalitat d'identificar els gens responsables de la psoriasi en la població espanyola. En aquest capítol es presenten els resultats d'aquest estudi dividits en els següents apartats:

- ✓ Obtenció d'un banc de material genètic (DNA) de pacients/famílies amb psoriasi.
 - Descripció clínica dels pacients i de la mostra.
 - Característiques dels pacients amb psoriasi tipus I i tipus II.
- ✓ Anàlisi genètica de lligament de les regions de predisposició *PSORS1*, *PSORS2*, *PSORS3* i *PSORS4*.
 - Anàlisi de las regiones de predisposición a la psoriasis en la población española: evidencia de un gen principal implicado en la psoriasis en la región 6p21 (Med. Clinic. 2001; 117:49-51).
 - Addenda. Anàlisi sota patrons d'herència complexos.
- ✓ Anàlisi del *locus PSORS1*:
 - Estudi mutacional del gen *TCF19*.
 - Anàlisi genètica d'associació dels gens candidats de la regió 6p21.
 - Estudi d'associació amb *HLA-C*, *POU5F1*, *TCF19*, *CDSN*.
 - Estudi del gen *HCR*.
 - Coding haplotypes analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. (Human Molecular Genetics 2002: Vol. 11, No.5, 589-597).

Obtenció d'un banc de material genètic (DNA) de pacients/famílies amb psoriasi

Descripció clínica dels pacients

El fet que molts dels estudis previs apuntessin a un model autosòmic dominant per la psoriasi, va fer pensar en la recollida i obtenció de genealogies grans amb diversos membres afectes. Tanmateix, donat el caràcter complex de la malaltia, la recollida es va estendre a altres estructures familiars, inclusivament els casos aïllats de la malaltia. Tots els individus inclosos en l'estudi van consentir de forma expressa en la participació en l'estudi.

Definició del fenotip

El diagnòstic es va realitzar amb la supervisió d'un metge especialista. Tots els pacients provenien de la consulta d'un metge especialista o tenien un diagnòstic previ. En els casos on no es va poder certificar el diagnòstic, l'individu va ser classificat com a fenotip desconegut en els estudis genètics.

En tots els casos que va ser possible es varen incloure dades sobre l'edat d'aparició de les primeres lesions, la localització, la morfologia i l'extensió de les lesions, a més de qüestions sobre la presència d'altres afeccions (artropatia, d'altres malalties dermatològiques) i hàbits tòxics.

Estratègia de selecció

L'estudi es va dirigir cap a la selecció dels participants a partir d'un membre afecte de psoriasi (cas índex) amb altres familiars afectes, principalment agrupats en famílies multigeneracionals. La incorporació a l'estudi es va estandarditzar mitjançant el disseny d'un qüestionari anomenat PSORIGEN, que inclou dades relacionades amb l'origen geogràfic, presència d'antecedents familiars, dades clíniques del malalt, a més d'altres dades complementàries sobre hàbits tòxics.

Els qüestionaris varen ser dissenyats per ser complimentats per personal mèdic especialitzat, però també d'una forma fàcil pels propis malalts (annex 2).

Es van seguir diferents estratègies de selecció per recollir les mostres de pacients.

- Contacte amb metges dermatòlegs d'arreu de l'Estat Espanyol.

Mitjançant la col·laboració de l'empresa farmacèutica GLAXOWELCOME es va trametre informació sobre l'estudi als metges especialistes d'arreu de l'Estat, demanant la col·laboració per la captació i selecció de pacients.

- Contacte amb l'associació de malalts de psoriasi de Catalunya (Acció Psoriasi).

Amb la col·laboració d'Acció Psoriasi, es va realitzar una difusió de l'estudi als individus afectes, mitjançant l'organització de jornades informatives i del butlletí i pàgina web de l'associació.

- Difusió a la població general mitjançant contacte amb les farmàcies d'arreu de Catalunya.

Amb la col·laboració del Col·legi de Farmacèutics es va fer arribar un díptic informatiu a les farmàcies de tota Catalunya, els díptics contenien una explicació concisa sobre la naturalesa genètica de la malaltia i sobre l'abast nacional de l'estudi.

Es varen incorporar el major número possible de familiars dels *casos índex*, tant afectes com no afectes; la incorporació de familiars no va ser idèntica en els tres mètodes de selecció emprats. A grans trets es pot dir que en els casos de selecció mitjançant l'associació i les farmàcies, les famílies extenses seleccionades contenien gran número de familiars no afectes, a més d'identificar-se molts casos esporàdics. En el cas de les famílies contactades per metges, les famílies eren de tipus nuclear, o extenses amb un biaix positiu quant al nombre d'individus malalts.

Descripció de la mostra obtinguda

Un cop identificat el pacient/família es va procedir a la informació personalitzada del projecte. Si els pacients i familiars accedien a realitzar l'estudi, aquest signaven un consentiment informat. Posteriorment es procedia a l'extracció d'una mostra de sang (15-20 ml) que es destinava a l'extracció de DNA i part per la separació de limfòcits i establiment de línies cel·lulars per a un posterior estudi.

Taula 21

Descripció de la mostra obtinguda. S'indica pel tipus de famílies (nuclears o extenses) i pel número de generacions (1-4). Entre parèntesi s'ha indicat el número mitjà d'individus per família

Famílies	N	Total n (n/família)	Afectes n (n/família)
Nuclears ¹	47	94 (2)	69 (1,4)
Extenses ²	178	411 (2,3)	313 (1,7)
1 generació	25	50	34
2 generacions	105	216	168
3 generacions	80	189	141
4 generacions	15	50	39
Total	225	505	382

¹ dos o més germans amb un progenitor com a mínim

² genealogies amb més d'un nucli familiar (complet o no) en dos o més generacions. Les generacions fan referència al número descrit de generacions que presenten la malaltia encara que no es disposi de mostres de DNA.

Descripció de la mostra

Durant tot el període de selecció es varen recollir un total de 560 mostres de DNA pertanyents a 259 famílies diferents (FAMPS) (taula 21). Del total de 259 històries, de 21 no es va poder obtenir informació sobre els antecedents familiars, i 13 varen ser classificades com a casos esporàdics, sense cap membre de la família afectat.

El criteri de selecció de les famílies que vàrem establir va ser el següent:

- Tenir un diagnòstic mèdic de psoriasis, amb més d'una lesió.

- Presentar història d'afecció en dos o més generacions, o bé una generació amb més de tres membres.

- Tenir material genètic d'un o més d'un membre afectat de psoriasis, i un o més membres no afectes.

El resultat va ser que de les 177 històries amb antecedents familiars disponibles en el moment d'iniciar l'anàlisi, només el 32% complien aquests criteris; en 78 famílies només era disponible un membre afectat i en 41 no es va poder aconseguir material de cap membre no afectat. De les restants 57 famílies, gairebé la meitat no varen ser incloses en l'estudi per diversos motius: clínica confusa (n=2) o diagnòstic incert (n=3), absència d'història clínica (n=1), falta d'informativitat (n=11) o mida petita (n=8). En resum, varen ser incloses 27 genealogies (grup anomenat link-27).

Posteriorment a l'anàlisi del grup de 27 genealogies, i un cop finalitzat el període de allistament d'individus, es va fer un estudi d'associació amb els gens candidats. Primer amb un estudi de tipus cas-control amb una mostra de 51 casos independents (casos índex de 51 famílies, incloent les 27 prèvies), grup CC51, i posteriorment amb un estudi de tipus familiar (TDT) amb 59 famílies seleccionades específicament per la presència de trios, grup HCR59 (incloent part de les famílies dels grups Link27 i CC51).

Taula 22

Característiques dels pacients índex en el grup total de famílies analitzades i en els tres grups analitzats

	Esporàdic	Familiars		Grup link27	Grup CC51	Grup HCR59
		Grup total				
Afectes independents (n)	13	69		27	51	59
Proporció homes-dones Afectes/des	9:4	36:33		13:14	27:24	27:32
Cas índex amb un afecte de 1er grau (%)	0	100		100	100	100
Edat entrada estudi			Homes	Dones		
Mitjana	42	36,5	33	40	31	36
Rang	24-89	3-77	3-77	4-49	16-55	3-62
Dades desconegudes	1/13	3/69	1/36	2/33	0	2/51
Edat aparició malaltia						
Mitjana	18	17	19	14,5	16	18
Rang	13-58	4-49	4-49	5-40	6-38	4-49
Dades desconegudes	2/13	8/69	3/69	5/69	1/27	6/51
Grups d'edat d'aparició						
Pacients amb edat d'aparició <40 (n)	9 (7/2)	57	31	26	26	42
Mitjana d'edat d'aparició (anys)	17,5	15	18	14	16	17
Pacients amb edat d'aparició <17 (n)	5 (3/2)	31	14	17	14	22
Mitjana d'edat d'aparició (anys)	14	12	13	10	12,5	11

En conjunt s'analitzaren la totalitat de les famílies que complien els dos primers criteris de selecció anteriorment descrits (n=69). A la taula 22 es fa una descripció de les característiques generals del total de famílies i dels tres subgrups seleccionats. La descripció està realitzada a partir de les característiques del cas índex de la família. A més es presenta una classificació dels pacients segons l'edat d'aparició de la malaltia; individus amb edat d'aparició inferior a 40 anys, i amb una edat inferior a 17 anys, que és l'edat mitjana d'aparició en el nostre grup. A més a la taula s'inclou la descripció dels pacients classificats com a esporàdics, encara que la mida mostral d'aquest grup és molt petita (n=13).

Descripció dels pacients

La major part dels pacients presentaven lesions en més d'una localització, amb afectació preferent al cuir cabellut, les extremitats i amb una important part de lesions localitzades a les articulacions. A la figura 15 es representa la distribució de lesions en els pacients índex.

Quant a la clínica dels individus índex, gairebé el 100% dels pacients amb antecedents familiars, presentaven lesions en plaques, una cinquena part presentava *psoriasis guttata* i només el 6,3% presentaven formes més greus amb pústules o eritrodèrmia (taula 23).

El 13,5% dels pacients (37,5% d'homes) presentaven artropatia, i un 20% (46,1% d'homes) altres lesions dermatològiques diferents a la psoriasi, de caire molt variat (dermatitis seborreica, dermatitis atòpica, epiteliomatosi i fungosi). Un 20% dels pacients patien d'altres malalties de tipus crònic (hepatitis C i úlceres). Respecte als hàbits tòxics, el 39,7% (36% d'homes) i el 55% (60% d'homes) eren consumidors de tabac i d'alcohol, respectivament. Entre un 7-10% dels 69 pacients analitzats no varen contestar a alguna de les anteriors qüestions.

Taula 23
Característiques clíniques dels pacients índex i els casos esporàdics

Clínica	Esporàdic		Familiar	
	%	%	Homes (%)	dones (%)
<i>Guttata</i>	15,3	21,9	31,4	10,3
Plaques	100	98,4	97,1	100
Petites	46,1	38,1	35,3	41,3
Mitjanes	30,8	30,2	29,4	31,1
Grans	23,1	31,7	35,3	27,6
Pústules	23	6,3	2,9	10,3
Eritrodèrmia	7,7	6,3	5,7	6,9
*	0	7,3	2,7	12,1

* clínica desconeguda

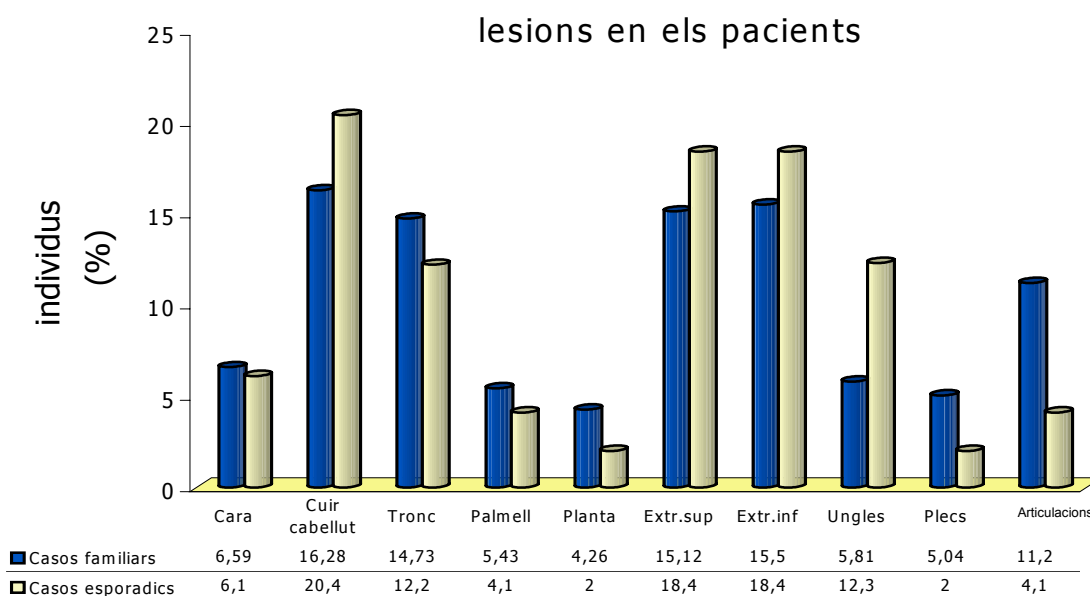


Figura 15

Comparació de la freqüència que es localitzen les lesions de psoriasis en els pacients amb història familiar i en els casos esporàdics. Les lesions es localitzen més freqüentment en el cuir cabellut, tronc i extremitats, tant en els casos familiars com esporàdics.

Característiques dels pacients amb psoriasi: Diferències clíniques entre tipus I i tipus II

Des del punt de vista etiològic, s'han descrit dos tipus de psoriasi, amb una distribució bimodal quant a l'edat d'aparició de la malaltia, un grau d'agregació familiar diferent i associació específica amb determinats al·lels de l'HLA. En l'apartat anterior s'ha fet una descripció general de les característiques de la mostra d'individus seleccionats, així com una descripció específica dels 69 pacients índex seleccionats, en quant a edat d'aparició de la malaltia, tipus de lesions i localització i distribució de les zones afectades. Per investigar possibles diferències pel que fa a la clínica i severitat de la malaltia es va estudiar en aquests pacients no relacionats les característiques clíniques i la distribució corporal de les lesions en relació amb l'edat d'aparició de la malaltia i al genotip *HLA-Cw*6*.

Clínica i distribució de lesions en portadors de Cw*6

El 60% dels pacients són portadors de l'al·lel Cw*6, tots ells en heterozigosi. La freqüència al·lèlica no mostra diferències entre sexes.

Els portadors no presenten una associació amb cap característica clínica, ni tampoc amb artropatia. Quant a la distribució corporal de les lesions, sí es van observar diferències, ja que els portadors de Cw*6 presenten lesions localitzades preferentment a les extremitats (braços, $p2s=0,001$; cames, $p2s=0,007$) (figura 16).

Quan es va estratificar la mostra per sexe es va observar que els portadors femenins presentaven més freqüentment lesions localitzades en el tronc en comparació amb les pacients no portadores (test F, $p2s=0,027$), mentre que en el cas dels homes no hi havia una diferència significativa.

Edat d'aparició de la malaltia

Dels 69 pacients analitzats tres no saben quan va aparèixer la malaltia. En la resta l'edat mitjana era de 17 anys (rang 4-49); 19 anys (rang 4-49) en homes i 14 anys (rang 5-40) en dones. No hi havia però, diferències significatives, respecte el sexe (test U de *Mann-Whitney*, $p2s=0,3$). A la taula 24 s'indica l'edat mitjana d'aparició de la malaltia segons la clínica dels pacients i la localització corporal de les lesions.

Aquests mateixos pacients, estratificats per Cw*6, no presentaven una edat mitjana d'aparició de la malaltia

diferent, però quan es va estratificar la mostra per sexe es varen observar diferències en el cas dels no portadors (test U, $p2s=0,016$), sent menor l'edat d'aparició en els pacients de sexe femení.

A la literatura s'ha descrit l'edat de 40 anys com el llindar de separació entre psoriasi de tipus I i II. Quan es van estudiar les diferències en l'edat d'aparició de la malaltia estratificant per Cw*6 no es va observar cap diferència. En canvi, quan es va separar els pacients segons l'edat mitjana d'aparició, es va observar que entre els individus amb edat inferior a 17 anys els portadors de l'al·lel Cw*6 presentaven una edat d'aparició inferior que els no portadors (test U, $p2s=0,05$), mentre que en els individus amb una edat superior a 17 anys les diferències no són en absolut significatives ($p2s>0,3$). Aquesta diferència és més significativa en els homes quan s'estratifica per sexe, ($p2s=0,019$, vuit i cinc casos, respectivament).

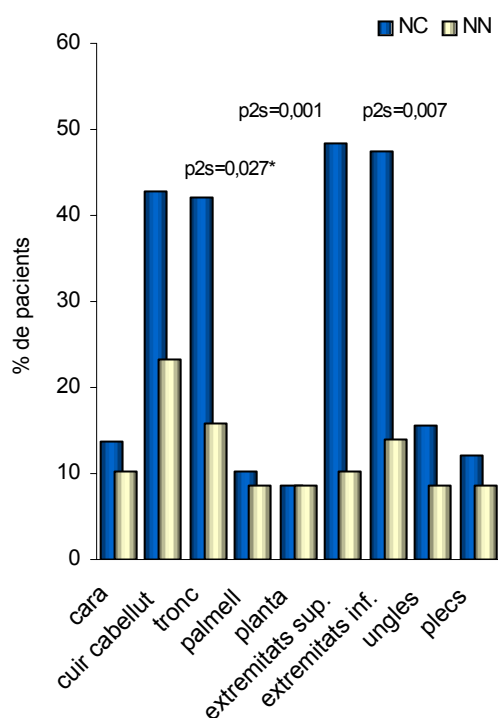


Figura 16

Freqüència de pacients segons la distribució corporal de les lesions en pacients portadors i no portadors de l'al·lel Cw*6. En el cas de les lesions de tronc la diferència presentada és la corresponent a les dones després de l'estratificació per sexe.

Respecte a les característiques clíniques, a la distribució de les lesions o a la severitat, només es va observar una diferència en el grup de pacients amb una clínica de psoriasi pustulosa (tres pacients), amb una edat mitjana d'aparició inferior a la resta de pacients sense patologia pustulosa, vuit anys (rang 8-10) vs 18 anys (rang 4-49) (test U, $p=0,44$). En aquest cas no es va realitzar una estratificació per Cw*6, però dos dels tres pacients amb clínica pustulosa eren portadors de l'al·lel Cw*6.

Taula 24

Edat mitjana d'aparició de la malaltia, segons la clínica de psoriasi i la distribució corporal de les lesions en el grup de 69 pacients estudiats

Localització	% Pacients	Mitjana	Rang
cara	25,86	18	6-47
cuir cabellut	67,24	17	5-47
tronc	58,62	14	4-47
palmell	18,97	18	6-47
planta	17,24	16	6-47
extremitats sup.	58,62	16,5	4-49
extremitats inf	62,07	16	4-49
ungles	24,14	18	8-47
plecs	20,7	14	6-47

Plaques	% Pacients	Mitjana	Rang
petites	36,8	15	4-36
mitjanes	28,07	20	6-49
grans	35,09	15,5	4-47
<i>guttata</i>	24,60	16	5-16
pustulosa	5,26	8	8-10
eritrodèrmia	7,017	13,5	6-28
artropatia	14,81	14,5	8-20

Severitat

Per a estudiar la severitat, ja que no es disposava d'un índex estandarditzat de severitat (tipus índex PASI), es va elaborar un "score" o valor de severitat basat en la presència i extensió de les plaques psoriàsiques (petites, mitjanes i grans) i d'artropatia. El 98,4% dels pacients presentaven plaques de psoriasi, i el 14,78% reportaven artritis. Aquests dos trets varen ser seleccionats com a indicadors del grau de severitat de la malaltia.

Basant-nos en la mida de les plaques, juntament amb la presència d'artropatia, es van establir quatre

categories de severitat, de menys a més greu; (1) plaques petites sense artropatia, (2) plaques petites amb artropatia o plaques mitjanes sense artropatia, (3) plaques mitjanes amb artropatia i plaques grans sense artropatia, i (4) plaques grans amb artropatia.

Utilitzant aquesta classificació es va observar que els pacients amb lesions situades al tronc (*Mann-Whitney test*; $p=0,007$), als plecs ($p=0,001$), al palmell, a la planta ($p=0,036$ i $p=0,018$, respectivament) i a les ungles ($p=0,001$), tenien un *score* més alt de severitat. Per altra banda, no es va observar cap diferència en la severitat pel que fa a sexe o Cw*6.

Com que la presència d'artropatia s'ha relacionat amb una etiologia genètica diferent a la de la psoriasi *vulgaris*, es va realitzar una classificació de la severitat en tres classes, segons la mida de les plaques psoriàsiques. Es va observar la mateixa associació que amb la classificació anterior, excepte per a les lesions als palmells de la mà.

Anàlisi genètica de lligament de les regions de predisposició *PSORS1*, *PSORS2*, *PSORS3* i *PSORS4*

Al 1994 es va descriure la primera regió de predisposició a psoriasi en el cromosoma 17. Posteriorment n'han estat descrites múltiples regions, la importància de les quals ha demostrat ser variable en diverses poblacions. Quan es va iniciar el projecte no hi havia cap estudi fet en població espanyola, la majoria dels estudis estaven realitzats en poblacions europees o americanes d'origen europeu, però no en poblacions llatines.

El nostre grup va realitzar l'estudi de les regions de predisposició descrites en el moment d'iniciar l'estudi: *PSORS1*, *PSORS2*, i *PSORS4*. L'anàlisi de la regió *PSORS3*, va ser impresa com a cerca funcional a partir de les dades d'expressió de la S100A7 (psoriasina), que poc després va ser descrita lligada a psoriasi en una població mediterrània.

Análisis de las regiones de predisposición a la psoriasis en la población española: evidencia de un gen principal implicado en la psoriasis en la región 6p21

Rafael de Cid, Víctor Volpini, Laura Almasy, David Otero, Xavier Estivill, Conxi Lázaro y el grupo clínico para el estudio de la psoriasis.

Med. Clinic. 2001; 117:49-51

Addenda.**Anàlisi sota patrons d'herència complexa**

Amb la finalitat de refinar els resultats obtinguts prèviament presentats, es van analitzar les quatre regions de predisposició en les famílies Link-27 amb algunes variacions respecte a la primera anàlisi.

- ✓ Es va realitzar una anàlisi amb criteris d'heterogeneïtat genètica, maximitzant el valor de LOD per a una determinada fracció (α) de famílies lligades, HLOD score. L'anàlisi es va fer amb el programa d'anàlisi genètica, GENEHUNTER v2.1.
- ✓ Alguns dels individus classificats com a sans en la primera anàlisi varen manifestar la malaltia, per la qual cosa es va incloure el seu nou estat en les anàlisis posteriors.
- ✓ Les freqüències gèniques de l'al·lel malaltia es van recalculer a partir de les dades específiques de la prevalença en la població espanyola, estimada en el 1,3% (Ferrandiz et al. 2001).
- ✓ En l'anàlisi del cromosoma 6 es varen incloure quatre marcadors més dintre de la zona on havíem obtingut els millors resultats en l'anàlisi prèvia. Tres estan localitzats en la zona codificant del gen *HCR* (*HCR-307*, *HCR-325* i *HCR-1723*) (Asumalahti et al. 2000) i un quart dintre la zona codificant del gen *CDSN* (*CDSN-1240*), tots dintre de la regió crítica entre els marcadors *D6S276* i *D6S273*.
- ✓ Les freqüències gèniques varen ser fixades com equipfreqüents en el cas dels marcadors multial·lelics (microsatèl·lits) i estimades a partir de població no afectada en el cas dels bial·lelics (SNPs).
- ✓ Anàlisi d'interacció entre els *loci* de predisposició.

Anàlisi sota hipòtesi d'heterogeneïtat

Els resultats de l'anàlisi no paramètrica d'igual forma que a la primera anàlisi, mostrà un màxim en els marcadors del cromosoma 6: *D6S276* i *D6S273* (NPL=1,54; p=0,039 i NPL=1,50; p=0,042). Cap de les altres regions analitzades demostraren un grau de compartició diferent del que s'esperaria sota condicions de no lligament (taula 25).

Quant a l'anàlisi paramètrica, es va realitzar pels models d'herència monogènica dominant i recessiva assumint uns valors variables de penetració (90, 80 i 60%). El millor resultat es va obtenir amb un model d'herència autosòmica dominant (AD) amb baixa penetració (60%) i amb un 10% de fenocòpies en els cromosomes 4, 6 i 17 mentre que en els cromosomes 1 i 6, el model amb millors resultats va ser un model autosòmic recessiu (AR) amb penetració reduïda (60%) i amb un 10 % de fenocòpies.

Al cromosoma 6 es va detectar un màxim HLOD=1,3, $\alpha=0,78$, al marcador *HCR-325*, amb un model recessiu, i un HLOD de 0,60, $\alpha=0,5$, al marcador *D6S273*, amb el model dominant.

Taula 26

Resultats de l'anàlisi de múltiples punts amb els marcadors de la regió 6p21 amb major informativitat. Anàlisi no paramètric (a) i anàlisi paramètrica; (b) model AD i (c) AR amb 60% penetració i 10% fenocòpies.

(a)

	Posició	NPL	p	informativitat
<i>D6S260</i>	0	1,50	0,042	0,74
	5,79	1,49	0,044	0,57
<i>D6S276</i>	14,48	1,52	0,041	0,81
	14,70	1,58	0,036	0,70
<i>D6S273</i>	15,03	1,67	0,029	0,82
	16,85	1,42	0,051	0,72
<i>D6S291</i>	19,57	1,12	0,094	0,72
	23,95	1,20	0,08	0,54
<i>D6S426</i>	30,51	1,39	0,055	0,57

(b)

	LOD	α	HLOD	informativitat
0	-4,13	0,16	0,13	0,74
5,79	-2,61	0,22	0,18	0,57
14,48	-5,13	0,15	0,12	0,81
14,70	-4,9	0,17	0,15	0,70
15,03	-4,7	0,19	0,19	0,82
16,85	-4,3	0,16	0,11	0,72
19,57	-5,5	0,11	0,06	0,72
23,95	-3,7	0,15	0,10	0,54
30,51	-3,8	0,20	0,16	0,57

(c)

	LOD	α	HLOD	informativitat
0	-7,24	0,	0	0,74
5,79	-4,45	0,02,	0	0,57
14,48	-6,77	0,06,	0	0,81
14,70	-6,30	0,08,	0,02	0,70
15,03	-6,18	0,12,	0,05	0,82
16,85	-5,39	0,12,	0,04	0,72
19,57	-5,36	0,14,	0,05	0,72
23,95	-2,87	0,25,	0,12	0,54
30,51	-5,12	0,16,	0,10	0,57

L'anàlisi de lligament de múltiples punts es va realitzar a partir de les distàncies genètiques especificades en el mapa genètic de *Marshfield*, exclouent els marcadors amb baixa informativitat (*HCR-307*, *HCR-325*, *HCR-1723* i *CDSN-1240*) i els que no presentaven una posició ben definida en el mapa genètic (TNFA).

Taula 25

Resultats de les anàlisis de dos punts, paramètrica i no paramètrica, per a les quatre regions analitzades. Els resultats de l'anàlisi paramètrica corresponen als millors resultats obtinguts dels 6 models genètics testats en l'anàlisi de dos punts. AD, autosòmic dominant. AR, autosòmic recessiu.

Cromosoma 1 AR	LOD score	(α , HLOD)	p **	NPL	p	informativitat*
<i>DIS498</i>	-8.83	(0, 0)		-0.63	0.767	0.56
<i>DIS2346</i>	-5.61	(0, 0)		-0.17	0.571	0.38
<i>DIS2721</i>	-6.09	(0, 0)		-0.56	0.742	0.62
<i>DIS2635</i>	-8.7	(0, 0)		-0.31	0.638	0.55
Cromosoma 4 AD						
<i>D4S2920</i>	-4.48	(0.23, 0.09)		0.71	0.197	0.49
<i>D4S1554</i>	-8.99	(0, .0)		0.39	0.315	0.70
<i>D4S1635</i>	-5.23	(0.10, 0.02)		0.28	0.360	0.57
<i>D4S1540</i>	-0.61	(0.53, 0.69)	p=0,046	0.81	0.167	0.42
<i>D4S2921</i>	-1.70	(0.36, 0.30)		0.46	0.285	0.52
Cromosoma 6 AR						
<i>D6S260</i>	-7.15	(0, 0)		1.44	0.049	0,71
<i>D6S422</i>	-2.99	(0, 0)		0.27	0.36	0,23
<i>D6S276</i>	-4.03	(0.08, 0.01)		1.54	0.039	0,56
<i>CDSN-1240</i>	-4.79	(0, 0)		0.01	0.482	0,21
<i>HCR-1723</i>	-6.49	(0, 0)		-0.37	0.663	0,13
<i>HCR-325</i>	1,12	(0,7, 1,3)	p=0,008	0.80	0.170	0,31
<i>HCR-307</i>	0,03	(0,5, 0,64)	p=0,037	0,41	0,308	0,32
<i>TNFA</i>	-8.24	(0, 0)		0.67	0.2125	0,63
<i>D6S273</i>	-3.73	(0.20, 0.12)		1.50	0.042	0,62
<i>D6S291</i>	-3.13	(0.25, 0.18)		1.19	0.083	0,54
<i>D6S426</i>	-3.59	(0.31, 0.41)		1.35	0.060	0,46
<i>D6S271</i>	-1.67	(0.18, 0.01)		0.36	0.325	0,20
Cromosoma 6 AD						
<i>D6S260</i>	-3.83	(0.2, 0.17)		1.44	0.049	0,71
<i>D6S422</i>	-0.69	(0.37, 0.2)		0.27	0.36	0,23
<i>D6S276</i>	-0.59	(0.48, 0.60)	p=0.047	1.54	0.039	0,56
<i>CDSN-1240</i>	-3.66	(0, 0)		0.01	0.482	0,21
<i>HCR-1723</i>	-2.54	(0.17, 0.07)		-0.37	0.663	0,13
<i>HCR-325</i>	-1.79	(0, 0)		0.80	0.170	0,31
<i>HCR-307</i>	-0.16	(0.46, 0.2)		0,41	0,308	0,32
<i>TNFA</i>	-5.38	(0.09, 0.5)		0.67	0.2125	0,63
<i>D6S273</i>	-3.65	(0.09, 0.01)		1.50	0.042	0,62
<i>D6S291</i>	-3.32	(0.23, 0.22)		1.19	0.083	0,54
<i>D6S426</i>	-3.04	(0.22, 0.16)		1.35	0.060	0,46
<i>D6S271</i>	-1.11	(0.38, 0.18)		0.36	0.325	0,20
Cromosoma 17 AD						
<i>D17S515</i>	-4.52	(0.19, 0.11)		0.35	0.331	0.69
<i>D17S785</i>	-10.04	(0, 0)		-0.23	0.601	0.75
<i>D17S802</i>	-5.50	(0.21, 0.25)		-0.43	0.689	0.59
<i>D17S784</i>	-15.8	(0, 0)		-1.40	0.956	0.69
<i>D17S928</i>	-3.58	(0.22, 0.21)		0.24	0.374	0.60

*Estimació que proporciona el programa sobre la informació que s'extreu de l'anàlisi del marcador

** Significació del HLOD estimada empíricament per simulació amb SLINK

L'anàlisi de múltiples punts només amb els marcadors més informatius va augmentar la informativitat dels marcadors restants, obtenint un increment en el valor dels NPL i de la seva significació: NPL=1,67 i $p=0,029$ (taula 26, pàgina 87).

Per aprofitar al màxim la informació dels individus genotipats, la família PS118 (veure figura 1 de l'article presentat a la pàgina 86) va ser dividida (*split*) en tres nuclis familiars. Aquesta variació va produir un augment de la significació del màxim valor NPL detectat entre els marcadors D6S276 i D6S273, NPL=1,68 i $p=0,026$, mentre que produí un lleuger descens en els valors màxims en l'anàlisi de múltiples punts. Donada la poca informació aconseguida i per evitar problemes en la correcció per la independència dels grups, es va realitzar la resta de l'anàlisi amb les famílies sense dividir.

Anàlisi amb restricció de fenotip: edat d'aparició de la malaltia

Estudis genètics i epidemiològics han posat de manifest la relació entre el grau d'heretabilitat de la psoriasi i l'edat d'aparició de la malaltia, establint de forma general que una edat d'aparició de la malaltia inferior a 40 anys està associada amb la presència de l'al·lel *HLA-Cw6* i amb un major risc familiar. Aquest llinar d'edat ha estat establert en 33 anys a la nostra població (Ferrandiz et al. 2001).

Per considerar l'efecte de l'edat en la nostra anàlisi, es van establir classes de penetració, diferents per a la malaltia, segons l'edat d'aparició. Es van fer dues classes de penetració per sota de 33 anys, englobant tots els casos "genètics", i una classe per sobre d'aquesta edat, representant aquells casos de la malaltia amb una etiologia diferent. Dintre del grup amb edat menor de 33 anys es van establir dues altres categories amb un llinar de separació als 17 anys, que és l'edat mitjana d'edat d'aparició de la malaltia en el nostre grup. El grup amb edat d'aparició per sota de 17 es va introduir per a tenir en compte els casos de presentació tardana (taula 27).

Taula 27

Classes de penetració, segons l'edat de presentació de la malaltia.

Pacients	DD*	Dd	dd
Afectes amb edat <17	0,8	0,8	0
Afectes amb edat >17 i <33	0,9	0,9	0,001
Afectes amb edat >33	0,001	0,001	0,002

* D al·lel malaltia

Aquesta anàlisi va ser realitzada en totes les regions candidates, però només es van observar

variacions importants en les regions estudiades dels cromosomes 4 i 6.

En la regió del cromosoma 4 (*PSORS3*) es va posar de manifest un màxim valor de LOD=1,19 ($\alpha=0,8$, HLOD=1,20) en el marcador *D4S1540*, sota un model dominant, amb un augment d'1,81 punts en el *Lod score* respecte l'anàlisi sense classes de penetració. L'anàlisi de múltiples punts va evidenciar un increment del *Lod score* telomèric a aquest marcador (3.53cM centromèric de *D4S2921*), encara que es mantenia negatiu; LOD=-0,82 ($\alpha=0,46$, HLOD=0,38) (taula 28).

Taula 28

Anàlisi de dos punts per grups d'edat amb el model AD amb 60% de penetració i 10% fenocòpies

Marcador	LOD	(α , HLOD)	
<i>D4S2920</i>	-3.02	(0,19, 0,09)	
<i>D4S1554</i>	-6.32	(0, .0)	
<i>D4S1635</i>	-4.89	(0,08, 0,02)	
<i>D4S1540</i>	1.19	(0,85, 1,2)	p=0,001*
<i>D4S2921</i>	-2.47	(0,21, 0,30)	

Valor de LOD en l'anàlisi de múltiples punts a 14.3cM= -0.82

* Significació empírica amb SLINK

A la regió de 6p21 (*PSORS1*) es va observar un increment dels valors de LOD, sota un model recessiu amb els marcadors HCR-307 (LOD=1,3; $p<0,0001$; $\alpha=0,99$; HLOD=1,3), i HCR-325 (LOD=0,5; $p<0,068$; $\alpha=0,67$; HLOD=0,66).

Anàlisi de l'efecte parental

Quan es va considerar la mostra sencera de totes les genealogies recollides; el 52% ($n=166$) dels casos índex afectes, tenien el pare afectat, mentre que 43% ($n=137$) tenien la mare (OR = 1.2, I.C95%= 0.9 - 1.7), encara que les diferències no eren significatives ($p=0,26$). En els individus afectes la proporció de sexes és manté indistintament del sexe del progenitor afectat (84 homes/82 dones en el cas que el pare fos afecte i 67/70 en cas que fos la mare).

L'edat mitjana d'aparició de la malaltia en els individus afectes era similar en els individus que tenien el pare afectat (14,5 anys) o la mare (15,5 anys).

Per estudiar un possible efecte parental es va realitzar una anàlisi de lligament assumint diferents graus de penetració en els heterozigots depenent de l'origen de l'al·lel parental amb el programa GENEHUNTER IMPRINTING v.1.3. Degut a les restriccions que imposa el programa l'anàlisi només es va fer sota un model d'herència dominant (veure taula 29). L'anàlisi es va realitzar en totes les regions candidates estudiades.

Taula 29

Valors de penetració per als heterozigots. Es va partir del model autosòmic dominant amb 60% de penetració i 10% fenocòpies.

	DD*	Dd**	dD	dd
Efecte patern	0,6	0,6	0,3	0,001
Efecte matern	0,6	0,3	0,6	0,001

* D al·lel malaltia

** Dd / dD, heterozigots que hereten al·lel malaltia del pare / mare respectivament

Quan es va considerar la desigual penetració dels al·lells parentals, només en la regió analitzada del cromosoma 6 es va observar una variació positiva quan es considerà l'efecte patern. Els valors de LOD en l'anàlisi de dos punts per al marcador *D6S276*, (LOD=0,58; $\alpha=0,48$; HLOD=0,6), va assolir valors positius (LOD= 0,9; $\alpha=0,7$; HLOD=1,2) si l'al·lel és patern, mentre que disminueix en el cas d'efecte matern (LOD=-1,26; $\alpha=0,3$; HLOD=0,2).

En el cas de la regió del cromosoma 4, es va analitzar l'efecte parental considerant a més de l'efecte de les classes de penetració per edat. Els valors de HLOD va disminuir tant en el cas de major penetració per l'al·lel patern com per al matern, encara que es van mantenir positius (HLOD=1,03 i HLOD=1,10 en el cas d'efecte matern i patern respectivament).

Anàlisi de la interacció entre els loci

Aquesta anàlisi es va realitzar amb dues aproximacions diferents

Modificació de les classes de penetració.

Mitjançant l'anàlisi de tres SNP dintre del *locus HLA-C*, que defineixen l'al·lel Cw6 (Tatari et al. 1995) es varen genotipar tots els individus, establint categories de portadors de l'al·lel Cw6 i no portadors (individus portadors de qualsevol dels altres al·lells *HLA-C*).

A partir de les 27 genealogies i mitjançant l'anàlisi del GRR (Genotip relative risk) amb el programa d'anàlisi genètica GAS (Genetic Analysis Software) es va calcular el risc relatiu (RR) de l'al·lel Cw6 per al desenvolupament de psoriasis, i es va obtenir un risc relatiu RR= 6,6, $p=0,000001$.

Basant-nos en l'elevat risc que comporta ser portador de l'al·lel *HLA-Cw6*, vàrem establir dues classes de penetració per als individus afectes portadors de Cw*6 respecte als no portadors, maximitzant la

penetració en el cas dels portadors i minimitzant-la en els no portadors (taula 30).

Els resultats més significatius es van observar al cromosoma 6 amb el marcador *HCR-307* (LOD=1,81; $p<0,001$; $\alpha=0,99$; HLOD=1,81) i *HCR-325* (LOD= 1,16; $p=0,011$; $\alpha=0,99$; HLOD=1,16), sota un model recessiu, i al cromosoma 4 per al marcador *D4S2921* (LOD=0,75; $\alpha=0,7$; HLOD=1,1) amb un model dominant.

Taula 30

Valor de penetració amb els que es va analitzar la interacció amb el locus Cw*6

	DD*	Dd	dd
Portador Cw6	0,9	0,9	0
No portador Cw6	0,001	0,001	0,002

* D al·lel malaltia

Avaluació directa de la interacció

Es va analitzar de forma simultània l'efecte dels marcadors a un *loci*, respecte als altres tres *loci* estudiats, fixant el *locus* malaltia en un *locus* i "movent" el segon *locus* en diferents posicions del mapa de la regió dels altres tres *loci*. L'anàlisi es va realitzar mitjançant el programa d'anàlisi genètica GENEHUNTER TWO *LOCUS* v.1.3 . Aquest programa a més de realitzar una anàlisi no paramètrica, permet realitzar una anàlisi paramètrica amb diferents models d'interacció gènica, a més de permetre incorporar la possibilitat de l'efecte parental. Aquesta anàlisi la vam fer sota dos models d'interacció gènica diferents; model additiu o heterogeni i model multiplicatiu simple. A més es va considerar l'efecte patern que havíem observat en el *locus* 6p.

Aquestes anàlisis es van realitzar triant com a *locus* malaltia els *loci* que presentaven els resultats més significatius en les anàlisis prèvies; el del marcador *D6S276* al cromosoma 6 i el del marcador *D4S1450* al cromosoma 4. Aquests dos *loci* es van analitzar fixant-los com a *locus* malaltia i analitzant-los respecte els altres *loci*.

Estudis epidemiològics en població europea han estimat una contribució principal del *locus* 6p al risc de psoriasis (Trembath et al. 1997), per la qual cosa es va realitzar l'anàlisi d'interacció amb una freqüència al·lèlica asimètrica, major per al *locus* malaltia 6p, proporcional a una major contribució a l'herència que els altres *loci*. Quan l'anàlisi no incloïa el *locus* 6p21, es va considerar una contribució equivalent a la freqüència de l'al·lel malaltia.

El resultat de l'anàlisi no paramètrica (taula 31a) va ser negatiu en tots els casos analitzats, amb valors màxims en algun cas de NPL=1,4 però $p>0,05$. L'anàlisi paramètrica va ser negativa en tots els casos analitzats menys en el cas dels loci 6p21 i 4q35 (taula 31b).

L'anàlisi amb el locus malaltia fixat a *D6S276*, amb un model d'interacció no epistàtic (heterogeni) i amb efecte patern en el 6p21, demostrà un increment del

Lod score en el locus *D4S1540*. L'anàlisi inversa, fixant el locus malaltia a *D4S1540* va produir un increment equivalent del *Lod score* en *D6S273* (taula 31c). Mitjançant l'anàlisi de múltiples punts es va poder situar el punt de màxim *Lod score* entre el marcador *D4S1540* i *D4S2921* a 3 cM de l'extrem del mapa. La reanàlisi de la interacció amb el 6p21 fixant el locus a *D4S2921*, no evidència cap canvi en els resultats obtinguts a 6p21, sent el màxim a *D6S273*.

Taula 31

Resultats de l'anàlisi d'interacció. (a) anàlisi no paramètrica de dos punts entre els loci a 6p21 i 4q35 i marcadors en 1, 6, 4 i 17, (b) anàlisi paramètrica entre el locus 6p21 i marcadors a 4 amb diversos models, (c) interacció entre locus 4 i marcadors a 6 amb diversos models d'interacció

(a)

Locus principal	Locus secundari							
	1q21	4q35			6p21		17q	
		NPL	pvalue	locus	NPL	pvalue		locus
<i>D6S276</i>	ns*	1,33	0,06	<i>D4S2920</i>			ns	
		1,35	0,06	<i>D4S1540</i>				
<i>D4S1540</i>	ns				1,38	0,054	<i>D6S276</i>	ns
					1,38	0,054	<i>D6S273</i>	

(b)

Locus principal	Model interacció	Efecte patern	Locus secundari a 4q35			
			Two-point		Multipoint	
			max LOD	locus	max LOD	posició loci
<i>D6S276</i>	Multiplicatiu	Sí	negatiu		negatiu	
<i>D6S276</i>	Multiplicatiu	No	negatiu		negatiu	
<i>D6S276</i>	Heterogeni	Sí	1,53	<i>D4S1540</i>	1,07	<i>D4S1540</i> -(4,23cM)- <i>D4S2921</i>
<i>D6S276</i>	Heterogeni	No	negatiu		negatiu	

(c)

Locus principal	Model interacció	locus secundari a 6p21			
		Efecte patern		No efecte patern	
		Two-point	Multipoint	Two-point	Multipoint
		max LOD (locus)	max LOD (α ; HLOD) (pos.; locus)	max LOD (locus)	max LOD (α ; HLOD) (pos.; locus)
<i>D4S1540</i>	Heterogeni	0,41 (<i>D6S273</i>)	-0,7 (0,77; 0,52) (15,03; <i>D6S273</i>)	0,26 (<i>D6S273</i>)	-2,5 (0,15; 0,27) (15,03; <i>D6S273</i>)
<i>D4S2921</i>	Heterogeni	(<i>D6S273</i>)	-0,89 (0,71; 0,5) (15,03; <i>D6S273</i>)	-0,36 (0,71; 0,5) (<i>D6S273</i>)	-2,7 (0,13; 0,25) (15,03; <i>D6S273</i>)

*ns, no significatiu

Anàlisi no paramètrica per SimIBD

De forma complementària a l'anàlisi de NPL, es va realitzar una anàlisi no paramètrica per IBD amb parelles d'afectes per a les quatre regions de predisposició. Aquesta anàlisi es va realitzar amb el programa SimIBD v2.0 que permet una estimació empírica dels resultats per simulació de múltiples rèpliques a l'atzar. L'anàlisi de la compartició entre parelles d'afectes es va corregir, segons les opcions internes del programa, per independència de les parelles d'afectes, ja que moltes provenien de la mateixa família.

Les regions *PSORS2*, *PSORS3* i *PSORS4* presenten valors molt allunyats de la significació. Només en la regió *PSORS1* es varen observar resultats positius, amb valors molt significatius al voltant de la regió on mapa del gen *HCR*, incloent els marcadors *D6S273* i *D6S276*. Els resultats es troben resumits a la taula 32.

Taula 32

Resultats de l'anàlisi de parelles d'afectes per IBD mitjançant el programa SimIBD, amb el valor p associat. La compartició està corregida pel número de parelles dintre de la família, i la significació ve donada per la rèplica dels resultats en 1000 famílies, generades pel mateix programa.

Cromosoma 1		p value
	<i>DIS498</i>	0,794
	<i>DIS 2346</i>	0,524
	<i>DIS 2721</i>	0,597
	<i>DIS 2635</i>	0,652
Cromosoma 4		
	<i>D4S 2920</i>	0,220
	<i>D4S 1554</i>	0,519
	<i>D4S1635</i>	0,389
	<i>D4S 1540</i>	0,105
	<i>D4S 2921</i>	0,186
Cromosoma 6		
	<i>D6S260</i>	0,055
	<i>D6S422</i>	0,383
	<i>D6S276</i>	0,030
	<i>CDSN 1243</i>	0,479
	<i>HCR 1723</i>	0,945
	<i>HCR 325</i>	0,00016
	<i>HCR 307</i>	0,000048
	<i>TNFA</i>	0,158
	<i>D6S273</i>	0,024
	<i>D6S291</i>	0,067
	<i>D6S426</i>	0,033
	<i>D6S271</i>	0,027
Cromosoma 17		
	<i>D17S 515</i>	0,275
	<i>D17S 785</i>	0,535
	<i>D17S 802</i>	0,435
	<i>D17S 784</i>	0,973
	<i>D17S 928</i>	0,387

Anàlisi del locus *PSORS1*

Aquest *locus* ha estat associat de forma repetida a psoriasi en diverses poblacions i tal com s'ha demostrat anteriorment també en la població espanyola.

La regió ha estat delimitada de forma molt precisa en diversos estudis a una regió aproximadament de 300 kb, una regió encara prou gran per contenir més d'un gen candidat. Aquesta regió està totalment seqüenciada i s'han identificat, a part del *locus HLA-C*, quatre gens expressats *POU5F1 (OTF-3)*, *TCF19 (SC1)*, *HCR* i *CDSN*, a més de quatre gens predits a partir de la seqüència.

El nostre grup ha realitzat un estudi mutacional del gen *TCF19*, en 51 pacients amb psoriasi i ha analitzat les variants descrites en els gens *POU5F1*, *CDSN* i *HCR*.

Per a realitzar aquesta anàlisi es va estudiar el grup CC51 i es va utilitzar com a població control un grup d'individus anònims de la regió de Barcelona.

Estudi mutacional del gen *TCF19*

Mitjançant l'anàlisi de SSCP/HD es va realitzar un triatge de les regions codificants, de les zones d'unió intró-exó, i de part de les regions no traduïdes a 5' i 3' del gen. L'anàlisi de 51 pacients i 48 individus controls ha identificat vuit canvis diferents; tres en regions intròniques i cinc en regions codificants. Set dels canvis han estat trobats tant en controls com en pacients, mentre que el restant només és present en els pacients.

Les variants intròniques són dos transversions de nucleòtid en el primer intró, 1248T>C i 1288G>A, i una deleció de quatre bases CCTT en la posició 3925 del segon intró (CCTT3925del). Les dues primeres es troben a 75 i 105 pb respectivament de les seqüències donadores de l'extrem 5' de l'intró 1, i no sembla que afectin el procés d'eliminació dels introns. La deleció es troba just en la zona receptora de la seqüència consensu d'empalmament de l'extrem 3' de l'intró 2, però deixa un segon triplet TTC útil a 3' amb el que queda inalterada la seqüència consensu. De les variants en la zona codificant, tres són mutacions amb error de sentit: Prolina/Treonina a la posició 109 de la seqüència peptídica (2991C>A), Valina/Metionina a la posició 210 (3306G>A), Prolina/Leucina a la posició 241 (3383C>T). Les dues variants restants són canvis sinònims: Prolina a la posició 219 (3332C>A/G) i Treonina a la posició 348 (4175C>T).

A la figura 17 s'indica la posició dels diferents canvis en la seqüència de *TCF19*. Les variants tenen una freqüència relativament baixa, entre el 0,03 i 0,021 en el cas més alt, sent lleugerament menor en els pacients que en els individus controls i estan en equilibri de Hardy-Weinberg, tant en els controls com en els pacients.

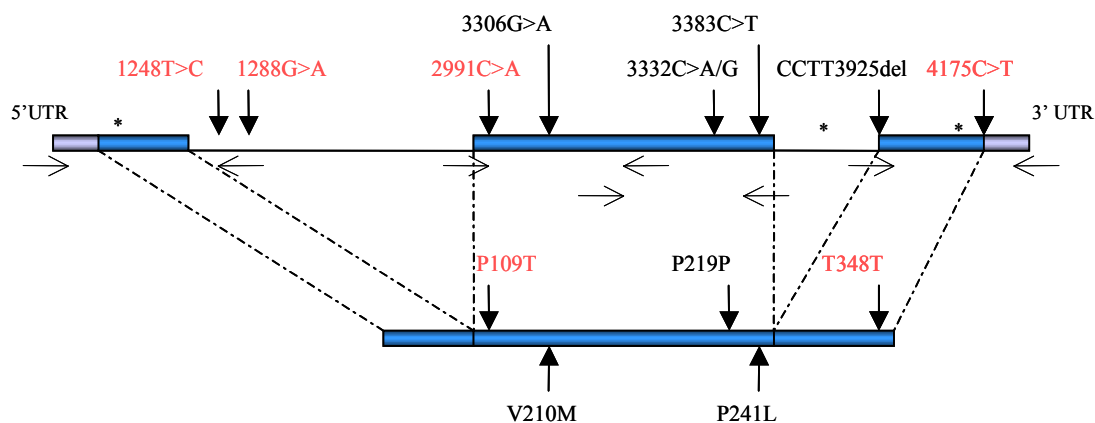


Figura 17

Posició dels canvis detectats en la seqüència de *TCF19* en l'anàlisi de SSCP/HD. En roig estan marcats el canvis descrits de nou en aquest estudi i amb un asterisc (*) les posicions dels SNPs no observats en aquest estudi, però descrits en la base de dades SNP de NCBI (20 agost 2002). Les posicions de les variants estan referides a la seqüència U25826.1 del GenBank. Les fletxes indiquen les posicions dels encebadors utilitzats.

Taula 33

Distribució dels al·lels de les variants codificants en pacients i controls

Variant	Pacient		Control		P2s value
	N	S (%)	N	S (%)	
2991*C	89	(93%)	81	(86%)	0.162
2991*A	7	(7%)	13	(14%)	
3306*G	88	(88%)	63	(79%)	0.153
3306*A	12	(12%)	17	(21%)	
3332*C	85	(85%)	79	(79%)	0.291
3332*A	11	(12%)	10	(12%)	
3332*G	3	(3%)	7	(9%)	
3383*C	88	(82%)	72	(80%)	0.795
3383*T	8	(8%)	8	(10%)	
4175*C	65	(90%)	65	(83%)	0.177

Amb les variants descrites en la zona codificant es va realitzar una anàlisi d'associació comparant la distribució dels al·lels en els pacients i individus controls, i també amb diferents models d'acció (codominància o model dominant). Mitjançant comparació amb Test Fisher no es va observar cap diferència significativa ($p > 0,05$) (veure taula 33 i 34). La mutació CCTT3925del es va trobar tres vegades en heterozigosi en els pacients, però no en els individus controls.

Taula 34

Distribució per genotips de les variants de la regió codificant, i anàlisi d'associació, segons un model codominant o dominant. A la part inferior els valors de H-W indiquen quin és el grau de desviació de l'equilibri de H-W

2991C>A			P _{2s}	3306G>A			P _{2s}	3332C>A>G			P _{2s}	3383C>T			P _{2s}	4175C>T			P _{2s}	
Cas (N)	Control (N)			Cas (N)	Control (N)			Cas (N)	Control (N)			Cas (N)	Control (N)			Cas (N)	Control (N)			Cas (N)
CC	41	34	0,14	GG	37	24	0,14	CC	36	24	0,17	CC	40	33	0,76	CC	38	26	0,15	
CA	7	13		AG	10	15		AC	8	8		CT	8	6		CT	9	13		
AA	0	0		AA	1	1		AG	1	0		TT	0	1		TT	0	0		
<hr/>				<hr/>				<hr/>				<hr/>				<hr/>				
A-CC	7	13	0,14	A-GG	11	16	0,11	A-No A	10	9	1	T-CC	8	7	1	T-CC	9	13	0,15	
CC	41	34		GG	37	24		G-	3	7		CC	40	33		CC	38	26		
<hr/>				<hr/>				<hr/>				<hr/>				<hr/>				
H-W			0,58	0,27	0,74			0,44	0,59			0,60	0,52			0,29	0,46			0,21

Estudi d'associació al·lèlica *HLA-Cw6*, *POU5F1* i *CDSN*

Es van analitzar dos polimorfismes del gen *POU5F1*, a les posicions 2T>G i 5856A>G, dos polimorfismes del gen *CDSN*, a les posicions 1240G>T i 1243C>T i l'al·lel Cw6 al locus *HLA-Cw*. La regió compresa pels tres gens és aproximadament de 245 kb. Aquestes variants estan dintre de la zona codificant o han estat descrites prèviament en altres estudis, associades a psoriasi.

Taula 35

Distribució dels al·lels de les variants en *HLA-C*, *POU5F1* i *CDSN* en pacients i controls

HLA-C

	Controls N (%)	Pacients N (%)	<i>p</i> 2s O.R; IC 95%
<i>HLA-Cw</i>			
Cw*6	18 (8%)	31 (32%)	<0,0001
No Cw*6	206 (92%)	65 (68%)	O.R=5,5 ;(2,9-10,4)
<i>POU5F1</i>			
+2*T	71 (32%)	24 (24%)	ns
+2*G	151 (68%)	76 (76%)	
+5856*A	143 (64%)	47 (46%)	0,002
+5856*G#	81 (36%)	55 (54%)	O.R=2; (1,3-3,3)
<i>CDSN*</i>			
+1240*G	224 (100%)	102 (100%)	ns
+1240*T	0	0	
+1243*C	134 (60%)	70 (69%)	0,08
+1243*T	90 (40%)	32 (31%)	O.R=1,5 ;(0,9-2,4)

Es va estimar el risc del genotip pel locus amb l'anàlisi de l'al·lel Cw*6 en les 27 famílies utilitzades per al lligament (grup link-27) mitjançant el programa de software GAS. El risc per Cw*6/C*X és del 6,6 ($p=6,5 \cdot 10^{-21}$), i gairebé el doble en el cas homozigosi (11; $p=7,2 \cdot 10^{-8}$), mentre que el risc calculat per al genotip "salvatge" només era de 0,13. Aquesta dada es va confirmar amb l'anàlisi d'una població de casos independents. Es varen tipar 51 pacients (grup CC-51) i 112 individus de la població general. Dels pacients analitzats no es va trobar cap homozigot, el 66% eren heterozigots per l'al·lel Cw*6, això significa una freqüència al·lèlica del 32%, mentre que en la població general és del 8%. Aquestes diferències van ser contrastades per un test de Fischer, resultant molt significatives, $p_{2s} < 0,0001$ amb una O.R=5,5 (2,9-10,4).

POU5F1 i CDSN

L'anàlisi de la distribució de genotips pels al·lels de *POU5F1* va evidenciar diferències significatives entre casos i controls quan es considerà un efecte dominant ($p_{2s}=0,019$), i també en el cas d'un efecte recessiu de l'al·lel *POU5F1*+5856*G (anomenat al·lel B) amb un valor *p* de significació de 0,021 (taula 35).

Quan es va estratificar, segons Cw*6, l'associació dels al·lels B i *CDSN*+1243*C amb la malaltia desapareixia, tant en el cas dels portadors de Cw*6 com en el de no portadors. D'altra banda, l'associació al·lèlica amb Cw*6 es mantenia entre el marcador de *POU5F1* de forma independent a l'afecció de l'individu ($p_{2s}=0,025$ en els casos i $p_{2s} < 0,001$ en els controls quan es considerava codominància o efecte recessiu), mentre que amb els marcadors de *CDSN* s'incrementava, però només en el cas dels individus afectes de psoriasi ($p_{2s}=0,012$ a $p_{2s}=0,007$)

Equilibri Hardy-Weinberg

Cap de les 4 variants estudiades en *POU5F1* i *CDSN* s'allunya de l'equilibri de Hardy-Weinberg, el test de probabilitat dona valors de $p_{2s} > 0,50$; tant en els pacients com en els controls.

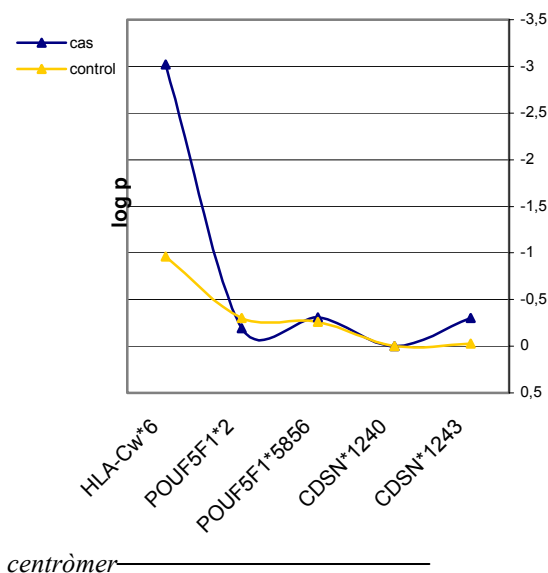


Figura 18

Equilibri de H-W. A l'eix de les abscisses és indicat el log de *p*, valor indicatiu del grau d'allunyament de l'equilibri (mínim a $p=1$, $\log p=0$, i significatiu a $p=0,05$, $\log p=-1,3$). Els valors més negatius indiquen una associació més alta.

En el cas del *locus HLA-Cw*, es va fer servir la classificació de portadors de l'al·lel Cw*6 i no portadors, sent aquesta darrera una categoria artificial que inclou a tots els al·lells diferents. Els valors del test de probabilitat donen valors molt significatius en el cas dels pacients amb $p_{2s} = 0,0009$, mentre que en els controls segueixen l'equilibri ($p=0,34$) (figura 18).

En la variant *CDSN +1243* es va observar un lleuger increment respecte als controls.

Estudi d'haplotips

La combinació de la informació de diversos marcadors permet extreure un màxim d'informació per detectar els haplotips associats a la malaltia (Rao i Province 2001). Amb els marcadors que de forma individual van demostrar diferències significatives entre els pacients i els controls, es va realitzar un estudi d'haplotips per a definir les relacions entre les diverses variants analitzades.

Davant la impossibilitat de construir els haplotips de forma manual per inspecció de les genealogies, es va realitzar una estimació de les freqüències dels haplotips, basats en mètodes estadístics de màxima versemblança (taula 36).

Taula 36

Resultats de l'anàlisi d'haplotips estimats de les variants *HLA-Cw*6*, *POU5F1-2* i *CDSN-1243*

Model	Chi ²	gll	p nominal	p empírica*
Independent de patró d'herència	41,92	8	$p=0,00002$	$p<0,0001$
Heterogeneïtat	32,46	7	$p=0,00003$	$p<0,0001$

* significació després de 1000 rèpliques
gll, graus de llibertat

A partir de les freqüències estimades dels haplotips es va mesurar l'associació al·lèlica, quantificant el desequilibri de lligament entre els diversos marcadors en la mostra de controls. Els quoficients de desequilibri es van calcular corregits pel màxim desequilibri esperable ($D' = D/D_{max}$).

En la mostra de 112 controls es va observar una associació al·lèlica entre els *loci* estudiats de l'*HLA*, *POU5F1* i *CDSN* ($p<0,05$). Per a *HLA-Cw*6* i *POU5F1* +5856 es va estimar un valor de desequilibri de $D'=0,89$ $sd=0,09$, presentant-se els al·lells Cw*6 i B en fase; i de $D'=0,62$ $sd=0,20$ per a *HLA-Cw* i *CDSN 1243* (fase Cw*6 i l'al·lel 1243*C). *POU5F1*+5856 i *CDSN1234* presentaven una $D'=0,26$ $sd=0,10$ (acoblament d'al·lells B-1243*C). Els dos marcadors de *POU5F1* (+2 i +5856) estaven en desequilibri absolut ($D'=0,99$ $sd=0,0003$) i la fase era 2*T-B.

En els pacients també s'ha demostrat associació al·lèlica entre els marcadors amb les mateixes fases d'acoblament, encara que amb uns valors mesurats de D' lleugerament diferents.

A la taula 37 indiquem els valors de desequilibri estimats.

Taula 37

Mesures de desequilibri de lligament (D') entre els marcadors analitzats

Controls	<i>HLA Cw6</i>	<i>POU5F1 T</i>	<i>POU5F1 B</i>	<i>CDSN C</i>
<i>HLA Cw6</i>	1	+0,99	+0,89	+0,61
<i>POU5F1 T</i>		1	0,99	-
<i>POU5F1 B</i>			1	+0,26
<i>CDSN C</i>				1

Pacients	<i>HLA Cw6</i>	<i>POU5F1 T</i>	<i>POU5F1 B</i>	<i>CDSN C</i>
<i>HLA Cw6</i>	1	+0,71	+0,57	+0,79
<i>POU5F1 T</i>		1	1	-
<i>POU5F1 B</i>			1	+0,41
<i>CDSN C</i>				1

Coding haplotypes analysis supports *HCR* as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC *PSORS1* locus.

Asumalahti, K., Veal, C., Laitinen, T., Suomela, S., Allen, M., Elomaa, O., Moser, M., **de Cid, R.**, Ripatti, S., Vorechovsky, I., Marcusson, J. A., Nakagawa, H., Lázaro, C., Estivill, X., Capon, F., Novelli, G., Saarialho-Kere, U., Barker, J., Trembath, R., Kere, J.

Human Molecular Genetics 2002: Vol. 11, No.5, 589-597

Com a part de l'estudi intercèntric, Rafael F. de Cid és responsable de l'anàlisi molecular de les mostres espanyoles descrites en l'article i de la confecció dels haplotips dels individus de les 59 famílies analitzades, així com de l'anàlisi preliminar de lligament i d'associació de les dades de la població espanyola.

Anàlisi dels gens de predisposició a asma en població general.

L'asma és una malaltia d'elevada prevalença en la població espanyola, principalment en l'edat infantil. La malaltia té una gran variabilitat fenotípica i a nivell genètic presenta una elevada heterogeneïtat. Per raons basades en el tipus de mostra, l'estudi de gens candidats va ser l'aproximació escollida per analitzar les bases genètiques en població espanyola. En aquest capítol s'han presentat els resultats d'aquest estudi dividits en els següents apartats.

- ✓ Obtenció d'un banc de material genètic (DNA) de pacients /famílies amb asma.
 - Descripció clínica dels pacients i de la mostra.
- ✓ Anàlisi de les regions candidates en població espanyola.
 - Regió 5q31, 11q i 14q.
 - Association study of proposed candidate genes/regions in a population of Spanish asthmatics. *European Journal of Epidemiology* 16: 745-750, 2000.
 - Anàlisi de ADRB2 i CD14.
 - Regió 6p21.
 - Anàlisi de *TNF* i *Ltα*.
 - Regió 16.
 - Anàlisi d'*IL4RA* (cadena alfa receptor d'IL4).
 - Regió 19p13: FCER2.
 - Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. *Am J Respir Crit Care Med* (2000) 161: 700-706.
- ✓ Anàlisi de CFTR i asma.
 - Anàlisi mutacional i d'associació de CFTR en població d'asma adult i infantil i en població general.
 - Missense Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Adult Patients with Asthma. *Human Mutation*:1999 14:510-519.
 - CFTR and asthma in the French EGEA study. *European Journal of Human Genetics*: 2001 67-9.
 - Different role for Cystic Fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) variants in childhood asthma patients. *Clin.Exp.Allergy* (sotmès octubre 2002).
 - A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the Cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Human Genetics* (2000) 106: 172-178.
 - Estudi de la prevalença de símptomes respiratoris en població portadora de mutacions CFTR.

Obtenció d'un banc de material genètic (DNA) de pacients /famílies amb asma

Descripció clínica dels pacients

Els models proposats per l'herència de l'asma són de naturalesa poligènica, encara que per als fenotips associats s'han proposat models tant dominants com recessius. D'igual forma que en el cas de la psoriasi, es va dirigir l'estudi cap a la cerca de genealogies extenses.

Tots els individus inclosos en l'estudi van consentir de forma expressa la seva participació en l'estudi.

Definició del fenotip

La informació sobre els símptomes respiratoris i al·lèrgics, història mèdica i factors ambientals es va recollir en un qüestionari únic (ASMAGEN), que inclou informació sobre la presència d'altres malalties al·lèrgiques a la família (dermatitis atòpica, rinitis, poliposi, conjuntivitis), els hàbits tòxics, de les condicions de l'habitatge, de l'entorn i les dades clíniques dels pacients (classificació clínica de l'asma, comptatge d'eosinòfils i nivells d'IgEs) (annex 2).

Els criteris per la definició d'asma es varen basar en els criteris de l'ATS (ATS. American Thoracic Society Committee on diagnostic standards for nontuberculous diseases 1962).

L'avaluació de l'HRB no es va realitzar amb uns criteris únics. Depenent de l'edat del pacient o de les facilitats del centre on es va realitzar la selecció dels pacients, es van fer servir criteris clínics de resposta al tractament o funcionals amb mesures de la funció respiratòria amb tests específics.

Les determinacions sèriques d'IgEs, i els test cutanis d'al·lèrgia es van realitzar en cadascun dels centres participants en l'estudi. Les mesures d'IgEs es van estandarditzar en unitats internacionals per mil·lilitre (UI/ml). La determinació plasmàtica de l'IgEs específica per a un al·lèrgen es va realitzar per tècniques de RAST o modificades (sistema CAP). Un test de RAST es va considerar positiu si $spIgE > 0,35 UI/ml$. Les mesures dèrmiques d'al·lèrgia o tests cutanis es varen realitzar per *SPT* enfront a una bateria dels al·lèrgens més comuns, o de forma específica contra els al·lèrgens de risc descrits en el pacient.

Estratègia de selecció

D'igual forma que en el cas de l'estudi sobre la psoriasi, es va dirigir l'esforç cap a l'obtenció de famílies amb asma o atòpia, a partir d'un cas índex amb un diagnòstic d'asma o atòpia.

L'estratègia usada en aquest cas va ser la selecció per personal mèdic especialista a partir dels individus que visiten de forma habitual els serveis d'al·lèrgologia o pneumologia dels hospitals o centres d'assistència especialitzada.

A continuació es descriuen els diferents grups de les mostres de pacients als que es va tenir accés així com les característiques de selecció i definició de la malaltia.

Descripció de les mostres de pacients

Mostres de població espanyola

Asma adult

Com a resultat de la col·laboració establerta amb l'equip de recerca dirigit pel Dr. J.M. Antó (Departament d'Epidemiologia i Salut pública, IMIM, Barcelona), s'accedí a una mostra de 145 pacients amb asma, no relacionats.

Aquest grup va ser seleccionat entre els individus que varen accedir als serveis d'Urgències de la ciutat de Barcelona degut a un atac d'asma, durant el període 1981-1987, període durant el qual es varen detectar fins a 26 brots epidèmics d'asma, afectant a 687 persones i causant 1155 admissions i prop de 20 morts. La causa d'aquests brots epidèmics es va identificar en els nivells ambientals elevats de pols de soja, degut a la descàrrega portuària (Anto et al. 1989).

Aquest grup de 145 pacients va ser classificat com a epidèmic (80 pacients) si havien estat atesos en els dies classificats com a epidèmics i com a no-epidèmics en cas contrari. Entre un 86 i 92% dels individus presentaven un diagnòstic d'asma, segons la definició establerta de: tenir símptomes respiratoris (qüestionari estandarditzat de la IUATDL, ATS-DLD78) més presència d'HRB o atòpia (Sabria et al. 1994). L'avaluació de l'HRB es va avaluar per una espirometria forçada després de provocació amb metacolina o per prova broncodilatadora amb salbutamol.

A la taula 38 s'indiquen les característiques de la mostra de 145 pacients seleccionats. Les característiques dels individus i les definicions d'atòpia i d'HRB emprades en la definició de la població estan descrites en l'article 3 presentat en la pàgina 109, i més àmpliament en el treball de (Soriano et al. 1997).

Asma infantil

Aquest grup es va seleccionar a partir dels pacients que accedien de forma habitual al Servei Respiratori Pediàtric de l'Hospital de Cruces de Bilbao. La selecció i recollida de dades dels pacients es va realitzar, segons els criteris establerts anteriorment en la selecció de famílies i seguint el qüestionari ASMAGEN. El diagnòstic d'asma va ser fet pel mateix metge especialista, Dr. Carlos Vázquez de l'Hospital de Cruces, i els criteris adoptats per la diagnosi d'asma en els pacients infantils varen ser els criteris dels consensos pediàtrics internacionals (Warner JO 1992; Warner i Naspitz 1998).

La presència d'HRB es va explorar per anamnesi i de forma ocasional per proves de broncodilatació i provocació bronquial per exercici.

Les proves d'al·lèrgia cutània es varen realitzar amb una bateria d'al·lèrgens comuns o de forma dirigida en cas d'haver indicis de reacció a algun determinant específic.

La majoria de pacients vivien en un entorn urbà i l'origen geogràfic, malgrat ser del País Basc era molt divers, ja que molts eren fills d'emigrants (primera o segona generació) de diferent origen: castellans, extremenys i andalusos. Les característiques dels pacients estan resumides a la taula 38.

Famílies d'asma

Com a resultat de la col·laboració amb diversos metges d'arreu d'Espanya es varen obtenir 19 famílies amb la classificació clínica d'asma IgE dependent o asma atòpic. Les característiques del grup de casos índex són indicades a la taula 39.

Mostres de poblacions europees

Altres mostres de pacients varen ser accessibles per a l'estudi puntual de determinats gens o regions candidates.

Projecte MULTIGENES

Altres mostres varen ser accessibles a partir d'una col·laboració multicèntrica que es va establir amb un centre d'Hèlsinki (Finlàndia): Projecte *Biomed-Multigenes* (BIOMED:BMH4-97-2486). Aquest projecte pretenia la col·laboració per la cerca de gens de predisposició a malalties multifactorials en poblacions europees aprofitant els avantatges que han ofert les poblacions aïllades en el mapatge de gens en malalties monogèniques. L'estudi de diferents poblacions europees

incrementa la possibilitat d'èxit en la detecció de factors de predisposició en eliminar la possibilitat d'efectes "locals", a més de permetre la rèplica dels resultats en poblacions independents.

De la col·laboració amb el grup europeu es va poder accedir a dues mostres de pacients. En tots dos casos el diagnòstic d'asma es va basar en les recomanacions de l'ATS.

Mostra de 20 pacients asmàtics amb HRB (50% d'homes) no relacionats pertanyent a la mostra de 253 famílies provinents de la regió Kainuu, al nord-est de Finlàndia. La crida per a la col·laboració va ser realitzada a través d'anuncis a la població general i seleccionats a partir de la presència d'un o més familiars asmàtics (Laitinen et al. 1997; Laitinen et al. 2000).

Mostra de 61 pacients amb asma (43% d'homes) allistats en diversos punts del país basats en la presència de símptomes respiratoris d'asma.

Projecte EGEA

Aquesta mostra pertany al Projecte EGEA (*Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy*) (Kauffmann et al. 1999) i ens va ser accessible a partir d'una col·laboració amb el grup de la Dra. Kauffman (INSERM, Villejuif, París).

La mostra EGEA original inclou 388 famílies seleccionades a partir d'un cas índex amb asma (n=348) o amb dos germans amb asma (n=40), amb un total de 1847 individus i una mostra de 416 controls no asmàtics, aparellats per regions d'origen, per edat i sexe (Ravault i Kauffmann 2001). El criteri per definir asma va ser: resposta positiva a una de les dues respostes següents, atac d'asma? o ofecs amb sibilàncies?, associat amb un dels següents criteris: HRB, hospitalització o ús de medicació antiastmàtica. Aquests criteris estan en concordança amb els obtinguts segons l'aplicació del qüestionari IUATLD (Ravault i Kauffmann 2001). L'estudi inclou mesures d'HRB, tests cutanis i mesures dels nivells d'IgEs.

El nostre equip va accedir a una mostra de 443 individus, 247 asmàtics i 174 individus no asmàtics com a controls, aparellats per origen, sexe i edat.

Grups controls asma

D'igual forma que en el cas de l'estudi de psoriasi, en els estudis realitzats es van fer servir individus de la població general com a individus controls. A més, en els treballs realitzats amb població francesa i finesa, els individus controls van ser sans i no asmàtics de la població específica en qüestió.

Grups controls en població espanyola

Un grup control va constar de 50-100 donants de sang anònims. Tots eren individus adults de raça caucàsica de la regió de Barcelona (50% d'homes).

Un altre grup va consistir en 100 individus, parelles de portadors de mutacions en altres gens: 59 parelles de portadors de mutacions causants de *Charcot-Marie-Tooth* (47% d'homes), i 41 parelles de portadors de mutacions en *CFTR* (49% d'homes). Tots els individus eren adults de raça caucàsica de diverses regions d'Espanya.

Grups controls en altres poblacions

Tant en la col·laboració amb el projecte MULTIGENES com en l'EGEA es va poder accedir a una mostra d'individus controls;

Un grup format per 174 individus adults sans, no asmàtics (49% d'homes) d'origen francès, aparellats per sexe, edat i zona d'origen geogràfic.

Un altre grup format per 197 individus adults sans, no asmàtics (53 % d'homes) d'arreu de Finlàndia.

En aquest treball s'ha definit el fenotip d'atòpia a partir de la combinació dels tres fenotips associats; nivells sèrics totals d'IgEs, sensibilització dèrmica a un o més al·lèrgens mitjançant SPT i comptatge d'eosinòfils en sang (només efectuat en la mostra infantil). Amb aquest tres criteris s'ha definit el que s'ha anomenat *atòpia1*, *atòpia2* i *atòpia3*.

Atòpia1, quan hi ha present algun dels tres criteris esmentats: Nivells d'IgEs ≥ 100 UI/ml, o ≥ 1 test SPT positiu, o una concentració d'eosinòfils en sang ≥ 300 cèl·lules/ml.

Atòpia2, quan hi són presents al menys dos dels anteriors criteris.

Atòpia3, quan hi són presents els tres criteris al mateix temps.

Quant als nivells sèrics d'IgEs, s'ha establert com a llindar "patològic" el valor comunament més reportat a la literatura, establert en 100 UI/ml, però a més s'ha analitzat considerant com a valor patològic la concentració mitjana d'IgEs en les mostres analitzades: en el cas de la mostra de pacients adults la mitjana és de 185 UI/ml, mentre que en el cas dels pacients infantils la mitjana era de 628 UI/ml.

Descripció dels fenotips d'atòpia i nivells sèrics d'IgEs utilitzat en aquest estudi

Taula 38

Característiques de les mostres d'asma adult de l'IMIM, Barcelona

Característiques fenotípiques i clíniques

Homes n	54
Edat, mitjana i rang (anys)	58 (24-93)
Edat d'aparició de la malaltia, mitjana (anys)	37,5
Asma	
Atesos en dies epidèmics (n)	77
Atac d'asma en darrer any (n)	60
Admissió en urgències en darrer any (n)	36
Medicació actual (n)	125
Síntomes respiratoris en darrer any	
Sibilacions (n)	109
Sibilacions i esbufecs (n)	74
Opressió nocturna al pit (n)	41
Tos habitual i expectoracions habituals durant més de tres mesos (n)	12
Mesures de capacitat respiratòria	
FEV1/FVC (%)	
<35 (n)	12
>35 (n)	128
FEV1 predit (%)	66,2%
Atòpia	
SPT + a més d'un al·lèrgen (n)	68
SPT + a <i>Aspergillus</i> (n)	15
IgE a soja $\geq 0,35$ IU/ml (n)	46
IgE a <i>Der P1</i> $\geq 0,35$ IU/ml (n)	53
Concentració mitjana d' IgE total (UI/ml)	72,4
Hiperreactivitat bronquial	
Positiu (HRB o PBD)	83
Positiu a metacolina (< 1mg)	32
Fumadors	
Mai	92
Passat	31
Actualment	22

Taula 39

Característiques de les mostres d'asma recollides a partir del qüestionari ASMAGEN. Grup casos índex de les 19 famílies i 50 casos d'asma infantil.

Característiques fenotípiques i clíniques	Famílies amb asma	Asma infantil
	N=19 (%) (n/N)*	N=50 (%)
Homes n (%)	11 (58%)	30 (60%)
Edat, mitjana, rang (anys)	15 (2-42)	10 (3-16)
Edat d'aparició de la malaltia, mitjana, rang (anys)	4 (3-16) (17/19)	3 (1-10)
Asma		
Severitat	(13/19)	
Lleu	7 (54%)	16 (33%)
Moderada	5 (38%)	30 (61%)
Aguda	1 (8%)	3 (6%)
Atòpia		
Resposta específica (SPT/RAST) (%)		
0 al·lergen	12%	8%
1 al·lergen	35%	41%
2 al·lergen	29%	35%
3 al·lergen	17%	14%
>3 al·lergen	6%	2%
Concentració mitjana d'IgEs total (IU/ml)	283 (52-10000)	629 (12-3018)
IgE \geq 100 IU/ml	83%	82%
IgE \geq 200 IU/ml	67%	72%
IgE \geq 400 IU/ml	28%	52%
Eosinofília (\geq 5% o \geq 300 cèl·lules./ml)	100% (11/19)	88%
Història familiar de malalties al·lèrgiques	100%	77%
Hiperreactivitat bronquial	dades de tres pacients	100%
Rinitis	90% (9/19)	87%
Dermatitis atòpica	37%	31%
Entorn ambiental	sd	
Urbà/industrial	sd	92%
Rural	sd	8%

* Número de casos (n) sobre el total (N) dels que hi ha informació disponible

SPT (*Skin Prick Test*); Test cutani de punxada / RAST (*Radioallergoadsorbent test*) Prova de radioal·lergoabsorció.

sd, sense dades

Association study of proposed candidate genes/regions in a population of Spanish asthmatics.

J.B. Soriano, **R. de Cid**, X. Estivill, J.M. Antó, D. Otero, J.Roca, R.Rodríguez-Roisín, F. Morell, M.J. Rodrigo, G. Ercilla, T.H. Beaty and C. Lázaro.

European Journal of Epidemiology 16: 745-750, 2000

El doctorant Rafael de Cid és responsable de part de l'anàlisi molecular de les mostres descrites en l'article, així com de l'anàlisi preliminar d'associació de les dades.

Regió cromosòmica 5q31

Gen ADRB2

En el gen *ADRB2* es varen estudiar les variants codificants Gly16Arg i Gln27Glu.

A la posició 16, la variant 16Gly representa el 42,4% dels al·lels tant en els pacients (150/354) com en els controls (40/94) amb petites diferències no significatives entre el grup d'asma infantil (44,6%) i asma adult (41,8%). La freqüència dels residus a la posició 27, presenta diferències significatives en els grups analitzats: 48,6% per a 27Gln en el grup de pacients i 62,5% en el grup de controls ($p_2s=0,027$).

Entre les dues variants existia una associació al·lèlica significativa en els pacients ($p_2s<0,0001$), mentre que no ho era en la mostra de controls ($p_2s=0,076$). El coeficient corregit de desequilibri va ser estimat en $D'=0,53$, presentant-se en fase les variants Gly16 i Gln27.

La distribució dels genotips en els diferents grups de pacients i en els controls va posar de manifest que mentre que la variant Gly16Arg es trobava en equilibri de H-W (en tots tres grups), la variant de la posició Gln27Glu s'allunyava de l'equilibri de forma significativa en els pacients ($p_2s<10^{-6}$), però també en els controls ($p_2s=0,007$). Degut a la falta d'equilibri observat en la variant Gln27Glu en la població control, no es presenten els resultats obtinguts en l'anàlisi de la variant ni en l'estudi de l'associació d'haplotips.

Variant Gly16Arg

La variant Gly16 és la menys freqüent en la mostra analitzada, amb una freqüència mitjana en les tres mostres del 42,4%, sense diferències significatives entre les tres mostres analitzades. Quant a la distribució dels genotips, Gly16Arg es troba en equilibri de H-W ($p_2s>0,05$) en les tres mostres, encara que amb una marcada diferència en el grup infantil (taula 40).

Taula 40

Freqüències genotípiques de la variant Gly16Arg.

	Gly16Arg			H-W*
	Gly/Gly	Gly/Arg	Arg/Arg	
Asma adult	23 (16,4 %)	71 (50,7 %)	46 (32,9,%)	0,61
Asma infantil	6 (12,2 %)	29 (59,2 %)	14 (28,6,%)	0,13
Grup control	8 (17 %)	24 (51,1 %)	15 (31,9 %)	0,76

* p_2s de test d'equilibri de H-W

La variant Gly16 no presenta una distribució diferent respecte al sexe, ni tampoc respecte a l'edat. Tampoc es va observar una major freqüència en asma o fenotips intermedis.

Relacions de dominància

Es va analitzar l'efecte de dosi gènica estudiant un possible efecte dominant de la variant Gly/Arg. Quan es van analitzar els fenotips associats es va observar que en el grup que no presenta hiperreactivitat bronquial, existia un augment de la freqüència de portadors de l'al·lel Gly16 (Gly/Gly o Gly/Arg): un 84,6% de portadors en pacients sense HRB i un 64% en pacients amb HRB (la mateixa freqüència que en la població control). A més es va observar una menor freqüència d'homozigots Gly/Gly en el grup de pacients amb concentracions sèriques d'IgEs superiors a 200 UI/ml: 9,7% respecte al 20% en els controls. Tot i així les diferències no són significatives.

L'efecte de la variant Gly16Arg en les concentracions d'IgEs totals i de l'HRB es va analitzar per separat en les mostres d'asma adult i infantil.

En la mostra infantil hi havia un descens de la freqüència dels homozigots Gly/Gly en els pacients amb concentracions d'IgEs superiors a 100 UI/ml (9,7 %) o 200 UI/ml (7,4 %) respecte a una freqüència del 33-37% en els individus amb concentracions per sobre d'aquests límits. Tot i així les diferències estaven en el límit de la significació estadística ($p=0,06$). En el grup d'adults les diferències eren molt menys significatives ($p>0,2$).

Les concentracions d'IgEs associades a les variants 16Gly i 16Arg són similars (285 ± 36 UI/ml i 288 ± 31 UI/ml respectivament). Les diferències més importants es presenten entre els portadors de l'al·lel 16Arg respecte als homozigots 16Gly. Els portadors de 16Arg, presentaven una concentració mitjana d'IgEs de 309 ± 38 UI/ml respecte als individus Gly/Gly amb una mitjana de 177 ± 48 UI/ml. Les diferències eren significatives amb el test T de student ($p_2s=0,036$). Aquestes diferències desapareixen en el grup adult (187 ± 36 UI/ml i 189 ± 22 UI/ml respectivament) i es mantenen en el grup d'asma infantil (706 UI/ml i 276 UI/ml), encara que no són significatives.

Respecte a l'HRB, l'increment de la freqüència de Arg/Arg en els pacients amb HRB presentava una significació límit en la mostra de tots els pacients i en la mostra d'asma adult ($p_2s=0,08$) mentre que era clarament no significatiu en els infants ($p>0,5$).

Mitjançant l'anàlisi per regressió logística es va estudiar aquestes tendències. L'HRB no variava amb la introducció de les classes d'edat i l'anàlisi mostrava en adults un valor predictiu de l'HRB pels portadors de Gly ($p=0,048$), però no pels portadors de Arg.

En el cas de les concentracions d'IgEs, l'edat no afectava en la mostra infantil i indicava un efecte de Arg/Arg en els nivells elevats d'IgEs (IgEs>200 UI/ml) ($p=0,03$).

Gen *CD14*

CD14 és un gen d'un sol intró que abraça 1,5 kb a la regió 5q31. En aquest estudi es va analitzar una variant del promotor $-159C>T$ i una variant intrònica, $1433G>C$.

Els dos al·lels de la variant $-159C>T$ eren gairebé equipfrecuents, tant en els pacients (50,5% i 49,5% respectivament) com en els individus controls (46% i 53,9%). La variant $1433G>C$ té un al·lel majoritari (1433^*G) que es presentava en el 85,5% dels pacients i en el 87,8% dels controls. Les diferències en la freqüència entre els diferents grups de pacients o respecte als controls no era, però, significativa en cap cas.

A la taula 41 es presenten les freqüències genotípiques de les variants en els diferents grups analitzats. Les dues variants complien les lleis de l'equilibri de Hardy-Weinberg en tots tres grups ($p2s>0,1$).

Taula 41

Freqüències genotípiques de les variants *CD14-159 C/T* i *CD14+1433 G/C*.

	<i>CD14-159</i>			H-W*
	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	<i>T/T</i>	
Asma adult	35 (24,8 %)	69 (48,9 %)	37 (26,2 %)	0,80
Asma infantil	12 (29,3 %)	17 (41,5 %)	12 (29,3 %)	0,27
Grup control	22 (24,4 %)	39 (43,3 %)	29 (32,2 %)	0,22

	<i>CD14+1433</i>			H-W*
	<i>G/G</i>	<i>G/C</i>	<i>C/C</i>	
Asma adult	96 (72,7 %)	34 (25,8 %)	2 (1,5 %)	0,60
Asma infantil	29 (70,7 %)	12 (29,3 %)		0,27
Grup control	68 (75,6 %)	22 (24,4 %)		0,18

* $p2s$ de test d'equilibri de H-W

En la mostra d'individus de la població general els dos canvis presentaven una associació al·lèlica significativa ($p=0,00002$) amb un coeficient de desequilibri corregit de $D^2=+0,81$ ($sd=0,12$) entre els al·lels -159^*T i 1433^*G . L'associació al·lèlica entre els dos marcadors era encara més forta ($p<0,00001$) en la mostra de pacients (adults i infantils), amb un desequilibri de lligament pràcticament igual a 1.

Quan es van analitzar les freqüències gèniques, només es va observar una diferència significativa amb la

presència d'eosinofília en sang. Mentre la proporció de l'al·lel -159^*T en els individus amb, o sense eosinofília era similar, tots els individus sense eosinofília eren homozigots per l'al·lel -159^*C ($p2s=0,005$). A part, es va observar una tendència similar en la mostra infantil quan es va considerar el fenotip més estricte d'atòpia anomenat *atòpia2* ($p2s=0,055$).

En el grup d'individus amb asma adult les concentracions d'IgEs presentava només una tendència respecte a la variant $-159C>T$. Els pacients amb els nivells d'IgEs superior a la mitjana del grup presentaven un excés de l'al·lel -159^*T (78,6% vs 49,3%) ($p2s=0,052$). A més, els portadors de l'al·lel -159^*T presentaven una concentració mitjana d'IgEs totals (217 ± 27 UI/ml) superior a la de dels individus portadors de -159^*C (157 ± 19 UI/ml) ($p2s=0,07$).

Aquesta tendència amb les concentracions d'IgEs però, no s'evidencià en la mostra infantil ($p>0,5$). D'altra banda els pacients infantils portadors de *CD14-159^*T* presentaven una concentració mitjana d'eosinòfils (775 ± 225 cel/ml) superior a la de dels individus portadors de -159^*C (325 ± 115 cèl·lules/ml). Aquesta diferència, encara que no era significativa, es troba en el límit, $p2s=0,08$.

Respecte la variant $1433G>C$ no existeien diferències ni tendències ($p>0,4$), tant en la concentració d'IgEs com en la d'eosinòfils en sang.

Models d'acció

En la població infantil quan es va considerar el genotip *CD14-159*, es va observar que l'al·lel T en dominància estava incrementat en els pacients amb eosinofília ($p2s=0,006$) amb una tendència similar en els pacients amb *atòpia2* ($p2s=0,07$). Les concentracions mitjanes d'eosinòfils eren de 2305 ± 714 cèl·lules/ml en els portadors de l'al·lel T respecte als homozigots per a l'al·lel C, amb una mitjana de 625 ± 182 cèl·lules/ml ($p2s=0,033$). D'altra banda, quan es va comparar l'edat de presentació, en la població infantil, els pacients homozigots per a l'al·lel T presentaven una edat d'aparició de la malaltia lleugerament inferior que els portadors de l'al·lel T ($1,92\pm 0,31$ vs $3,19\pm 0,56$) ($p2s=0,05$).

En la mostra d'individus adults només era evident un excés d'homozigots per -159^*T en els pacients amb una mitjana d'IgEs superior a la mitjana de la població adulta ($p2s=0,05$).

Estudi d'haplotips.

Mitjançant l'estudi dels haplotips es va estudiar l'associació amb eosinofília. El model d'herència estimat que millor s'ajustava a les dades era un model recessiu ($\chi^2=12,72$; $p_{1000} = 0,03$).

Encara que amb falta de potència, es van analitzar les 19 famílies amb asma IgE dependent, que s'havien reunit. En l'anàlisi per TDT es va observar una transmissió preferent de l'al·lel 1433*G, amb 7 transmissions (contra 10 no transmesses) no a l'individu afecte ($p=0,008$), mentre que en el TDT2 (considerant la transmissió de les dues variants de forma conjunta) no es va observar la transmissió preferent de cap haplotip, en tot cas una menor transmissió de l'haplotip -159*T/1433*C amb un valor de $p=0,025$.

Regió cromosòmica 6p21

Gens *Lta* i *TNF*

Els gens *Lta* i *TNF* es troben separats tres kb en la regió denominada de Classe III del Complex Major d'Histocompatibilitat, telomèrics als gens de Classe II i centromèrics als gens de Classe I.

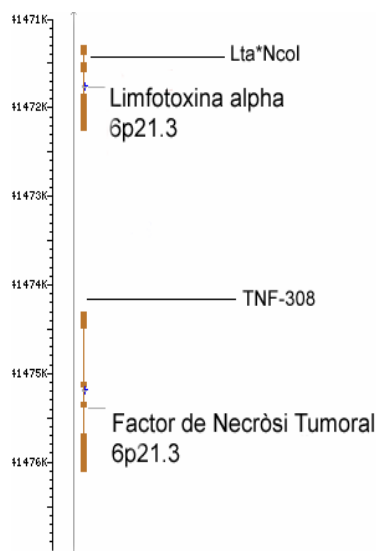


Figura 19
Esquema de la disposició cromosòmica dels gens *Lta* i *TNF*

Es va investigar l'associació amb asma i els fenotips intermedis de dos variants prèviament descrites: una substitució en la zona del promotor del gen *TNF* (-308 G/A) i una altra en una zona no codificant, en el primer intró del gen *Lta* (variant *NcoI*) (figura 19).

*Lta**1 (variant amb diana de restricció *NcoI*) representa l'al·lel majoritari amb una freqüència del 72,9%. La freqüència en els grups de pacients adults i infantils és similar (72-76,3%) i lleugerament superior a la del grup control (70,2 %). *TNF1* (variant *TNF*-308 G) és amb el 89,1% l'al·lel més freqüent, amb proporcions similars en els grups de pacients (89,4-87,8%) i controls (90,4%). Les diferències, però, no són estadísticament significatives (taula 42).

Les variants *TNF*-308 i *Lta***NcoI* es troben en equilibri de H-W tant en la població control com en la mostra de pacients ($p > 0,4$), amb petites diferències entre els dos grups de pacients.

Els dos canvis presentaven associació al·lèlica significativa en la mostra de controls ($p_{2s} = 0,0001$), amb un coeficient de desequilibri entre els al·lells *Lta*1 i *TNF*2 de $D' = +0,80$ ($sd = 0,16$). L'associació al·lèlica observada

en la mostra dels casos és molt més significativa ($p < 0,000001$) amb una $D' = +0,91$, amb petites diferències depenent del grup d'asma analitzat (infantil i adult).

Taula 42
Freqüències genotípiques de les variants *TNF*-308 i *Lta***NcoI*.

	<i>Lta</i>			H-W*
	1/1	1/2	2/2	
Asma adult	10 (7 %)	60 (42 %)	73 (51 %)	0,62
Asma infantil	3 (7,9 %)	12 (31,6 %)	23 (60,5 %)	0,43
Grup control	5 (10,4 %)	19 (39,6 %)	24 (50 %)	0,67
	<i>TNF</i>			H-W*
	1/1	1/2	2/2	
Asma adult	113 (79,6 %)	28 (19,7 %)	1 (0,7 %)	0,60
Asma infantil	29 (78,4 %)	7 (18,9 %)	1 (2,7 %)	0,48
Grup control	39 (81,3 %)	9 (18,8 %)		0,47

* p_{2s} de test d'equilibri de H-W

L'al·lel *Lta*2 s'ha trobat associat amb nivells sèrics d'IgEs elevats (superior a la mitjana d'IgEs) en la mostra d'asma adult ($p_{2s} = 0,036$), i *Lta*1 amb HRB en la mostra d'asma infantil ($p = 0,055$), encara que en aquest cas s'ha de valorar que només hi havia un individu sense HRB (homozigot *Lta*1/*Lta*1).

Les concentracions mitjanes d'IgEs associades a *Lta*2 i *TNF*1 són lleugerament superiors, encara que les diferències no són significatives (290,15±27 i 249,8±45 UI/ml respectivament en *Lta*1 i *Lta*2, i en el *locus TNF*, 210±48 respecte 290±25 UI/ml). Els nivells d'eosinòfils és més elevat en el cas de l'al·lel *Lta*2, encara que les diferències no són significatives (649±294 vs 1454±368 cel/ml).

Es van analitzar les relacions de dominància o recessivitat dels al·lells *Lta*1 i *TNF*2. *TNF*2 de forma dominant (*TNF*2/2 i *TNF*2/1) es troba associat amb atòpia cutània ($p_{2s} = 0,037$) en la mostra total (adults i nens), però per grups, només es conserva en els adults ($p_{2s} = 0,02$). Només hi ha dos homozigots *TNF*2 (taula 42), els dos amb uns nivells baixos d'IgEs totals, i en el cas del nen, aquest no té història familiar d'al·lèrgies.

Lta mostra una tendència en codominància amb els nivells elevats d'IgEs. De forma específica l'al·lel *Lta*2 quan es va considerar un efecte dominant, és més freqüent en els individus amb nivells elevats d'IgEs (superiors a la mitjana) en la mostra d'asma adult ($p_{2s} = 0,037$). Coneguda la dependència de l'edat dels nivells d'IgEs es va fer una anàlisi de regressió logística considerant l'edat. Per això es va fer una classificació dels individus per classes d'edat. Els resultats de la regressió

van demostrar l'associació dels nivells d'IgEs amb l'edat ($p=0,0024$) en la població adulta. L'associació amb la $Lt\alpha 2$ era estadísticament límit després de corregir per l'efecte de l'edat ($p<0,09$).

En el cas de l'associació amb TNF2, l'atòpia no demostrava dependència de l'edat, però sí del sexe. L'associació amb TNF2D és manté després de corregir per l'efecte del sexe ($p=0,009$).

En el cas dels nens, es va observar una relació entre $Lt\alpha 1$ i una edat d'aparició de la malaltia per sobre de tres anys amb un efecte dominant de l'al·lel $Lt\alpha 1$: el 70% (7/10) dels nens amb edat d'aparició superior a tres anys respecte del 28% (7/25) dels nens amb edat inferior de 3 anys ($p_{2s}=0,011$). L'edat d'aparició de la malaltia en els homozigots $Lt\alpha 2$ era de $1,81\pm 0,22$ anys respecte a $3,36\pm 0,76$ en els portadors de $Lt\alpha 1$ ($p_{2s}=0,07$).

No es va observar cap associació amb el tret d'asma epidèmic o altres marcadors d'atòpia o asma, com l'eosinofília. En aquest cas és interessant apuntar que els quatre casos de nens sense eosinofília eren homozigots per $Lt\alpha 2$ i per a TNF1.

Associació amb haplotips

Mitjançant el programa Pmplus es va realitzar un estudi d'associació amb haplotips. Les significacions empíriques es van aconseguir després de 1000 rèpliques (p_{1000}) per a cadascun dels models, eren significatives, però, no es va poder obtenir, una idea clara del model d'herència més probable (taula 43).

Taula 43

Resultats de l'anàlisi d'haplotips estimats de les variants $Lt\alpha$ i TNF

	Khi ²	g.ll	p	p_{1000}
Recessiu	9.68	3	0.021	0,018
Dominant	9.94	3	0.019	0,016
Model-free	9.94	4	0.041	0,019
Heterogeneïtat	9.94	3	0.019	0,018

Quan es va testar l'associació dels haplotips amb el fenotip atòpia cutània, l'haplotip format pels al·lells $Lt\alpha 1$ i TNF2 presentava una freqüència augmentada respecte a la resta d'haplotips possibles, la qual cosa confirma els resultats obtinguts en l'anàlisi anterior. L'anàlisi dels marcadors de forma individual va ser negatiu per a $Lt\alpha$, i molt significatiu per a TNF. La millor significació es va observar amb un model dominant d'herència ($p=0,0047$; $p_{1000}=0,0060$).

Regió cromosòmica 16p12

Gen de la cadena α del receptor d'interleucina 4 (*IL4RA*)

El gen de la cadena α del receptor d'interleucina 4 mapa al braç llarg del cromosoma 16, en una regió que ha estat associada amb asma i atòpia en diversos estudis independents. El nostre grup va realitzar un estudi de les variants I50V i Q551R, i a més amb col·laboració amb el grup del Dr. Lozano de l'Hospital Clínic de Barcelona es van analitzar altres cinc SNPs codificants del gen *IL4RA* en dues mostres independents de pacients; 65 individus amb asma (del grup d'asma adult de Barcelona) i 31 individus classificats com al·lèrgics a partir de proves cutànies positives a una bateria d'al·lèrgens ambientals (*Parietaria*, *Phleum*, *Olea*, etc). Com a grup control es van utilitzar 47 individus sense al·lèrgia (i majoritàriament amb nivells d'IgEs inferior a 100UI/ml).

El primer que es va realitzar va ser una comparació de la distribució al·lèlica en un estudi d'associació de tipus cas control.

A la taula 44 s'han resumit les freqüències dels canvis en les tres mostres estudiades.

Taula 44

Freqüència al·lèlica dels SNPs analitzats en les mostres de pacients i individus controls

		Asma	Al·lèrgia	Control no al·lèrgic
I50V	I	91 (53,5%)	31 (50%)	53 (57,6%)
	V	79 (46,5%)	31 (50%)	39 (42,4%)
E375A	E	121 (82,9%)	53 (91,4%)	85 (90,4%)
	A	25 (17,1%)	5 (8,6%)	9 (9,6%)
C406R	C	124 (89,9%)	51 (91,1%)	88 (93,6%)
	R	22 (15,1%)	5 (8,9%)	6 (6,4%)
S411L	S	137 (93,8%)	56 (100%)	88 (95,7%)
	L	9 (6,2%)		4 (4,3%)
S478P	S	132 (78,6%)	54 (87,1%)	77 (81,9%)
	P	36 (21,4%)	8 (12,9%)	17 (18,1%)
Q551R	Q	125 (74,4%)	51 (82,3%)	75 (79,8%)
	R	43 (25,6%)	11 (17,7%)	19 (20,2%)
V554I	V	167 (98,2%)	60 (100%)	93 (98,9%)
	I	3		1

No es va detectar cap al·lel 411L entre els pacients al·lèrgics (4,3 i 6,2% en controls i en asmatics respectivament) (taula 44).

Associacions amb els fenotips intermedis

Quan es van analitzar els fenotips intermedis d'asma, en el grup de pacients que presentaven el fenotip *atòpia1* es va observar un increment de les freqüències de les variants R406 (20% vs 7,1%; $p_{2s}=0,055$) P478 (26,4% vs 12,9%; $p_{2s}=0,051$) i V554 (100% vs 95,2%; $p_{2s}=0,047$).

A més, es va observar un augment de la freqüència de les variants A375, R406 i P478, en el grup de pacients al·lèrgics amb nivells d'IgEs superiors a 100UI/ml, amb una freqüència del 13,2%, encara que només eren 5 al·lells i la significació estadística era baixa. Dintre del mateix grup la variant I50 mostrava un augment significatiu (25,9% vs 4%; $p_{2s}=0,023$) en els individus amb nivells molt elevats d'IgEs (>400UI/ml).

Equilibri de Hardy-Weinberg

L'estudi individual de les freqüències genotípiques en les tres mostres d'individus mostrava que les variants estan en equilibri d'Hardy-Weinberg, encara que existien diferències en el grau d'allunyament de l'equilibri. A la figura 20 es representa les diferències observades entre les tres mostres.

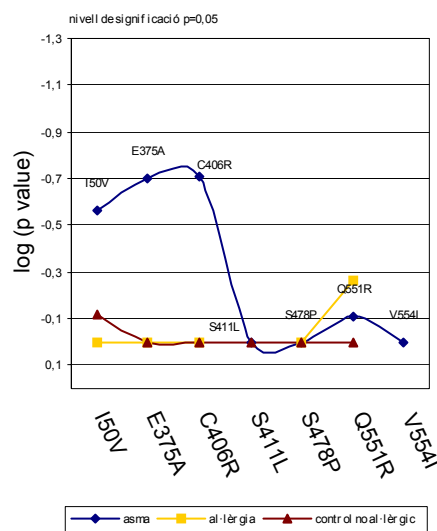


Figura 20

Representació de les mesures d'equilibri de Hardy-Weinberg en les mostres analitzades. A l'eix d'ordenades es representa els diferents canvis, situats de forma relativa a la seva posició en el gen. A abscisses, els valors log (p value) representen la mesura que les freqüències genotípiques s'allunyen de l'equilibri H-W, sent significatiu amb valors de log (pvalue)=-1,3, i mínim a 0. En el cas de la mostra d'al·lèrgics en el punt S411L no s'ha pogut calcular degut a que el 100% són homozigots.

Genotips

Es van estudiar les diferències genotípiques de les variants, considerant un efecte recessiu o dominant de la variant majoritària. L'estudi es va fer en relació amb els fenotips que mostraven més significació; *atòpia1* i al·lèrgics amb nivells superiors a 100UI/ml d'IgEs. A la taula 45 s'ha resumit les freqüències genotípiques observades en els diferents subgrups.

Taula 45

Freqüència genotípica dels SNPs analitzats en les submostres de pacients amb asma i al·lèrgia.

	Atòpia1	No atòpia1	Al·lèrgia >100	Al·lèrgia <100	Control no al·lèrgic
I50V					
II/IV	41 (75,9%)	23 (75,9%)	14 (73,7%)	7 (77,8%)	37 (80,4%)
VV	13 (24,1%)	8 (25,8%)	5 (26,3%)	2 (22,2%)	9 (19,6%)
VV/IV	37 (68,5%)	21 (67,7)	15 (78,9%)	7 (77,8%)	30 (65,2%)
II	17 (31,5%)	10 (32,3%)	4 (21,1%)	2 (22,2%)	16 (34,8)
E375A					
AA/EA	15 (33,3%)	6 (21,4%)	5 (26,3%)		9 (19,1%)
EE	30 (66,7%)	22 (78,6%)	14 (73,7%)	7 (100%)	38 (80,9%)
C406R					
# RR/CR	15 (33,3%)	4 (14,3%)	5 (26,3%)		6 (12,8%)
CC	30 (66,7%)	24 (85,7%)	14 (73,7%)	6 (100%)	41 (87,2%)
S411L					
LL/SL	6 (13,4%)	3 (10,7%)			4 (8,7%)
SS	39 (86,6%)	25 (89,3%)	19 (100%)	6 (100%)	42 (91,3%)
S478P					
## PP/PS	24 (45,3%)	8 (25,8%)	5 (26,3%)	2 (22,2%)	16 (34%)
SS	29 (54,7%)	23 (74,2%)	14 (73,7%)	7 (77,8%)	31 (66%)
Q551R					
§ RR/QR	27 (50,9%)	10 (32,3%)	8 (42,1%)	2 (22,2%)	17 (36,2%)
QQ	26 (49,1%)	21 (67,7%)	11 (57,9%)	7 (77,8%)	30 (63,8%)
V554I					
§§ II/VI		3 (9,7%)			1 (2,1%)
VV	54 (100%)	28 (90,3%)	19 (100%)	8 (100%)	46 (97,9%)

R406 dominant; p=0,06 atòpia1 vs no atòpia1; p=0,017 atòpia1 vs controls

P478 dominant; p=0,06 atòpia1 vs no atòpia1

§ R551 dominant; p=0,07 atòpia1 vs no atòpia1

§§ P554 dominant; p=0,06 atòpia1 vs no atòpia1

La variant R406 que ja presentava una tendència similar en el grup total d'asma, es troba de forma dominant amb una freqüència més elevada en els pacients amb *atòpia1* que en els controls (p=0,017). A més, encara que no és estadísticament significatiu P478 i R551 presenten una freqüència major. I554 presenta una

freqüència augmentada en els pacients sense *atòpia1* (p2s=0,046) i en els controls (NS).

Desequilibri de lligament entre les variants d'II4RA

En el cas de les variants de l'exó 12 es va poder estimar el desequilibri de lligament real entre els diferents canvis. Tot i estar en una zona molt pròxima, el desequilibri no és total entre les variants. En l'esquema de la figura 21 es sintetitza quines són les relacions de lligament entre les diverses variants en les tres mostres estudiades:

	E375A	C406R	S411L	S478P	Q551R	V554I
Asma						
E375A	+	+	-	+	+	+
C406R		+	-	+	+	-
S411L			+	+	+	-
S478P				+	+	-
Q551R					+	-
V554I						+
Al·lèrgics						
E375A	+	+	Nc	+	+	-
C406R		+	Nc	+	+	-
S411L			Nc	Nc	Nc	Nc
S478P				+	-	+
Q551R					+	-
V554I						+
Controls no al·lèrgics						
E375A	+	+	-	+	+	+
C406R	1	+	-	+	+	-
S411L	-0,10	-0,06	+	+	+	-
S478P	0,4	1	1	+	+	-
Q551R	0,88	1	1	0,72	+	-
V554I	1	-0,068	-0,21	-0,21	-0,23	+

Figura 21

Esquema de les relacions d'associació al·lèlica entre els diferents parells de marcadors de l'exó 12 del gen de l'II4-R. La relació de desequilibri de lligament entre els parells indicats en els dos eixos està marcat en gris amb les relacions positives (+), en blanc les relacions negatives (-) i les no calculades per absència d'homozigots (Nc). Les relacions d'associació difereixen entre les mostres. A la part inferior es representen els valors del coeficient de desequilibri calculat en els controls, les relacions estan calculades respecte a les variants salvatges.

Nivells d'IgEs

El binomi II4-II4R té una funció molt ben definida en la regulació de l'expressió de les IgEs. Aquí s'ha estudiat la relació de les variants gèniques amb la concentració d'IgEs totals en sèrum. A la figura 22 es representa la mida i les concentracions mitjanes dels diferents grups i subgrups estudiats.

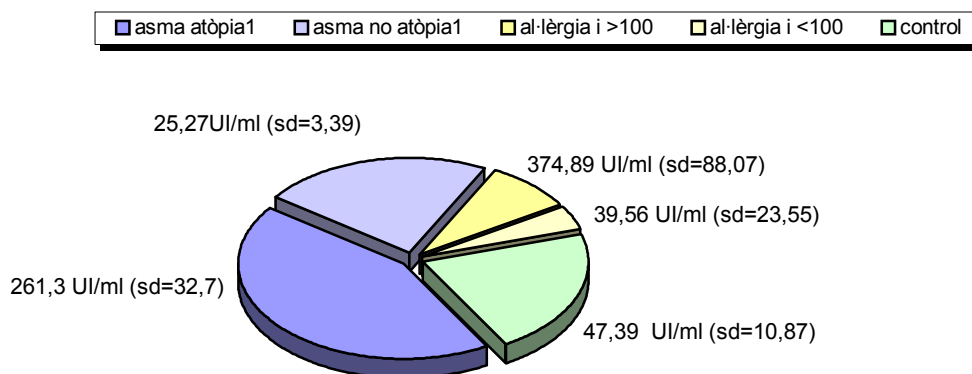


Figura 22

Concentració mitjana d'IgEs totals (UI/ml) en el sèrum en els grups d'individus analitzats. La mida de les porcions del formatge correspon a la mida total del grup estudiat, encara que no de tots els individus es té les mesures de la concentració d'IgEs; 19/47 en controls, 28/31 en al·lèrgics i 144/145 en asmàtics.

Els tres grups estudiats presenten grans diferències a nivell de la concentració total d'IgEs: 184,40 UI/ml ($\pm 23,36$) en el grup d'asma, 267,11 UI/ml ($\pm 66,5$) en els al·lèrgics i 47,39 UI/ml ($\pm 10,87$) en els controls no al·lèrgics. Les diferències entre el grup de controls i de pacients (grup d'asma i d'al·lèrgics) són molt significatives.

Quan es va considerar el fenotip *atòpia1* les concentracions detectades eren molt superiors als pacients amb asma sense *atòpia1* (test T, $p2s < 0,0001$) i similars a les presents en el grup d'al·lèrgics. Però el grup del pacients al·lèrgics tampoc és homogeni quant als nivells sèrics d'IgEs; fins a un 32% tenia uns nivells baixos d'IgEs totals (inferior a 100UI/ml), amb una concentració mitjana similar a la dels controls i pacients asmàtics sense *atòpia1*.

La correlació genotip-fenotip, quant a concentracions d'IgEs no era clara. Només en el cas dels pacients al·lèrgics amb nivells superiors a 400 UI/ml s'havia observat un augment de la freqüència de la variant I50. A la taula 46 es resumeixen les concentracions mitjanes corresponents a cada al·lel en les tres mostres, i encara que hi ha diferències, no són significatives.

Per tal de definir la relació amb la concentració d'IgEs i els genotips es va triar els individus asmàtics però sense *atòpia1*. Els nivells d'IgEs en aquest grup eren sensiblement més baixos que en els individus amb *atòpia1* i similar a les que es van observar en els controls no al·lèrgics.

En aquest grup, les variants A375, P478 i R551 en dominància tenen associades unes concentracions d'IgEs més altes que l'homozigot de la variant més comuna (figura 23).

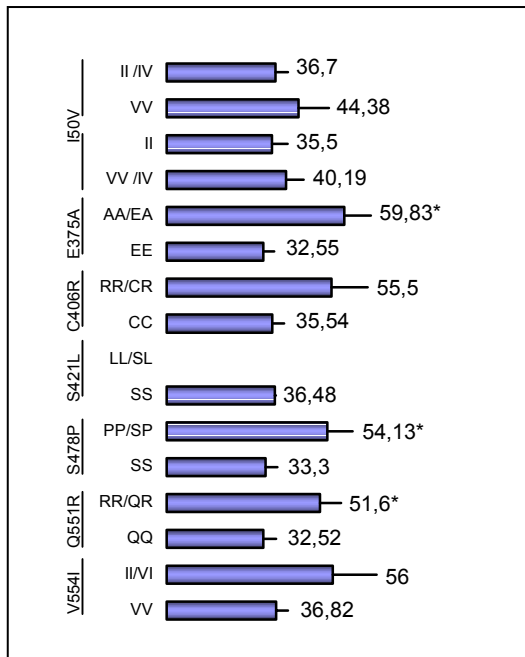
En el grup de pacients al·lèrgics, els individus amb valors d'IgEs < 100 UI/ml presentaven concentracions més elevades en el cas de tenir la variant I50 en dominància, encara que no significatives: 42,86 vs 28; $p2s > 0,1$. En el cas de les altres variants les diferències no eren significatives.

Taula 46

Concentracions mitjanes d'IgEs en sèrum segons al·lels individuals

		Asma	Al·lèrgia	Control no al·lèrgic
I50V	I	174,22 \pm 25,73	341,22 \pm 7,30	42,7 \pm 11,65
	V	194,81 \pm 34,02	198,10 \pm 52,12	25,56 \pm 8
E375A	E	177,67 \pm 25,34	293,96 \pm 54,38	38,09 \pm 8,35
	A	168,08 \pm 50,58	200 \pm 32,12	13,75 \pm 6,61
C406R	C	165,34 \pm 23,29	303,87 \pm 56,36	38,09 \pm 8,35
	R	183,36 \pm 56,81	200 \pm 31,12	13,75 \pm 6,61
S411L	S	167,51 \pm 54,56	293,48 \pm 50,94	32,14 \pm 7,63
	L	176 \pm 54,56		
S478P	S	170,39 \pm 22,19	282,80 \pm 52,72	38,69 \pm 9,40
	P	221,31 \pm 55,64	157,29 \pm 35,81	25,33 \pm 10,46
Q551R	Q	168,03 \pm 21,79	265,87 \pm 54,12	38,53 \pm 9,08
	R	194,88 \pm 47,43	272,80 \pm 82,95	24,25 \pm 1,80
V554I	V	186,08 \pm 21,25	274,37 \pm 48,05	35,23 \pm 7,58
	I	56 \pm 14 73		

En el grup de pacients al·lèrgics amb nivells >100UI/ml, les variants A375, R406 i P478 en homozigosi (p2s=0,06) i la variant I50 en dominància (p2s=0,055) presenten una concentració d'IgEs elevada.



* test F, p2s<0,01

Figura 23

Concentracions d'IgEs totals (UI/ml) en sèrum per genotips en pacients asmàtics que no presenten el fenotip atòpia1. Tots els individus tenen concentracions d'IgEs menors de 100UI/ml, i no presenten atòpia cutània. En el cas de I50V es representa els genotips amb dominància d'I50 o de V50, en la resta de les variants només és representat el genotip dominant per la variant menys freqüent.

Haplotips i concentracions d'IgEs

En el conjunt de les tres mostres Lozano i col·l., han pogut definir fins a vuit haplotips diferents formats per les variants de l'exó 12 (Lozano et al. 2001).

Taula 47

Freqüència dels haplotips de l'exó 12.

	Asma	Al·lèrgia	Control no al·lèrgic
ACSPRV			2 (2,1%)
ACSSRI	3 (2,1%)		1 (1,1%)
ARSPRV*	22 (15,1%)	5 (9,3%)	6 (6,4%)
ECLPRV	9 (6,2%)		4 (4,3%)
ECSPQV	2 (1,4%)	2 (3,7%)	4 (4,3%)
ECSRV	1 (0,7%)	1 (1,9%)	1 (1,1%)
ECSSQV	105 (71,9%)	41 (75,9%)	71 (75,5%)
ECSSRV*	4 (2,7%)	5 (9,3%)	5 (5,3%)

*p2s<0,06

A la taula 47 s'indica quins eren els haplotips i les freqüències en les tres mostres.

El grup d'atòpia1 presentava un increment de la freqüència respecte als controls de l'haplotip ARSPRV, En el grup de controls no al·lèrgics eren presents els vuit haplotips, set en asma i cinc en els al·lèrgics amb una freqüència del 20% respecte el 6,4% en controls no al·lèrgics (p2s=0,0079) (taula 48).

Taula 48

Freqüència dels haplotips observats en els grups de pacients i controls, amb la mitjana d'IgEs observada i la desviació (SEM).

	ACSPRV	ACSSRI	ARSPRV*	ECLPRV	ECSPQV	ECSRV	ECSSQV	ECSSRV
Atòpia1			18 (20%)	6 (6,7%)	1 (1,1%)	1 (1,1%)	61 (67,8%)	3 (3,3%)
(IgEs UI/ml)			211,78 (67,86)	237,3 (69,57)	1639	98	242,21 (31,35)	600 (519,84)
No atòpia1	3 (5,4%)	4 (7,1%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)		44 (78,6%)	1 (1,8%)	
(IgEs UI/ml)	56 (14,73)	55,50 (12,25)	54,33 (18,58)	48		34,11 (2,83)	48	
Al·lèrgic >100			5 (13,2%)			30 (78,9%)	3 (7,9%)	
(IgEs UI/ml)			200 (32,12)			387,30 (74,19)	542,33 (205,79)	
Al·lèrgic <100				1 (10%)	1 (10%)	7 (70%)	1 (10%)	
(IgEs UI/ml)				76	25	27 (2,72)	76	
Control	2 (2,1%)	1 (1,1%)	6 (6,4%)	4 (4,3%)	4 (4,3%)	1 (1,1%)	71 (75,5%)	5 (5,3%)
(IgEs UI/ml)	Nd	Nd	13,75 (6,61)	103	17,5 (6,74)	Nd	41,77 (10,31)	12 (5,51)

* ARSPRV p2s=0,0079 atòpia1 vs controls

Nd, sense dades

Variant I50V

La variant I50V (exó 5) està a 20 kb de l'exó 12. Considerant els haplotips com a unitats senceres o "al·lels", es va realitzar estudis d'associació amb les 8 variants haplotípiques descrites i la variant I50V.

La variant I50V presentava una associació amb distints haplotips en les diferents mostres. Es va observar que en la mostra de controls la variant I50 s'associa amb l'haplotip més comú, ECSSQV, mentre que V50 s'associava amb els haplotips ECSSRV i ECLPRV. En el cas de l'asma (i del fenotip atòpia1), la variant I50

presenta una associació significativa amb l'haplotip ARSPRV amb una $D'=0,5$, mentre que V50 amb l'haplotip ECLPRV, $D'=1$. En els al·lèrgics però ARSPRV es presentava associat amb V50 ($D'=1$) i ECSSRV amb I50 ($D'=1$).

Anàlisi de la regió 19p13

Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders.

Laitinen, T., Ollikainen, V., Lázaro, C., Kauppi, P., **de Cid, R.**, Antó, J. M., Estivill, X., Lokki, H., Mannila, H., Laitinen, L. A. Kere, J.

Am J Respir Crit Care Med (2000) 161: 700-706

En aquest treball es presenten les dades de l'estudi de microsatèl·lits de la regió 19p13. El doctorant es responsable de l'anàlisi dels marcadors moleculars i de l'anàlisi estadística preliminar. En la addenda es presenta una anàlisi més detallada dels resultats.

Anàlisi de la regió 19p13

Gen candidat *FCRE2*.

El gen *FCRE2* mapa a la regió 19p13 i és un candidat funcional important en relació a la regulació de la resposta d'IgEs. Estudis previs del grup col·laborador de Finlàndia han demostrat l'associació amb haplotips de la regió encara que no han trobat cap canvi en la seqüència del gen. Nosaltres vam estudiar la regió en relació amb asma mitjançant marcadors microsatèl·lits de la regió, concretament amb els marcadors que en l'estudi finlandès donaven la més alta significació: *D19S884*, *D19S922*, i *D19S534*.

La distància física de 3 Mb; tel - *D19S534*- 2 Mb - *D19S922*- 13 kb - *D19S884* - cen.

A la taula 49 s'han resumit les freqüències al·lèliques observades dels marcadors estudiats. Tots els al·lèls presentaven equilibri de Hardy-Weinberg en la mostra control, mentre que es perdia en el cas del marcador *D19S884* en la mostra de pacients ($p=0,04$).

Taula 49

Freqüències al·lèliques dels marcadors microsatèl·lits de la regió 19p13

	<i>D19S922</i>		<i>D19S884</i>		<i>D19S534</i>	
	cas	control	cas	control	cas	control
Al·lèls						
D1	71 (24,8)	19 (20,43)	29 (10,62)	8 (8,99)	11 (4)	
D2	7 (2,45)	2 (2,15)	5 (1,832)	4 (4,49)	203 (75)	66 (75)
D3	36 (12,6)	4 (4,3)	18 (6,593)	7 (7,87)	15 (5,5)	2 (2,3)
D4	25 (8,74)	7 (7,52)	42 (15,38)	7 (7,87)	44 (16)	19 (21,6)
D5	37 (12,9)	16 (17,2)	47 (17,22)	13 (14,6)	1 (0,4)	
D6	41 (14,3)	14 (15,05)	8 (2,93)	1 (1,12)		1 (1,1)
D7	52 (18,2)	24 (25,81)	22 (8,059)	11 (12,4)		
D8	11 (3,85)	4 (4,3)	12 (4,396)	6 (6,74)		
D9	3 (1,05)		78 (28,57)	27 (30,3)		
D10	1 (0,35)		7 (2,564)	2 (2,25)		
D11	2 (0,7)	3 (3,23)	5 (1,832)	1 (1,12)		
D12				1 (1,12)		
D13				1 (1,12)		

Cap dels al·lèls del marcador *D19S534* presentava associació amb asma. L'al·lèl *D19S534**D3 presentava una distorsió en els individus varons, i en els pacients amb hiperresposta bronquial, sent absent en els individus

sense HRB (13 vs 0; $p_2s=0,042$). Aquesta associació amb l'HRB es perdia després de corregir mitjançant una anàlisi de regressió logística, per l'efecte del sexe i de l'edat en l'HRB.

Els dos marcadors més centromèrics presentaven una associació amb asma i fenotips intermedis. La freqüència al·lèlica del marcador *D19S834**D1 era més elevada en la mostra d'individus amb *atòpia1*: 13,5% ($n=24$) vs 5,3% ($n=5$), $p_2s=0,040$, i en els individus amb nivells d'IgEs > 100 UI/ml; 14,9% ($n=18$) vs 7,3% ($n=11$), $p_2s=0,05$. L'associació es mantenia després de corregir pel sexe i l'edat en el cas de l'*atòpia1* ($p=0,046$), mentre que en el cas dels nivells d'IgEs la correcció per l'edat es perdia ($p=0,051$).

El tercer marcador, *D19S922*, presentava una freqüència de l'al·lèl *D19S922**D3 augmentada en la mostra d'individus asmàtics en comparació amb els controls de la població general: 12,6% ($n=36$) vs 4,3% ($n=4$), $p_2s=0,031$, significació que es mantenia després de corregir per l'efecte del sexe. Altres al·lèls del marcador *D19S922* presentaven diferències en la freqüència en diversos fenotips. L'al·lèl *D19S922* *D8 presentava una freqüència augmentada en els individus que presentaven uns nivells d'IgEs per sobre de la mitjana (7,9% ($n=6$) vs 2,4% ($n=5$), $p_2s=0,044$) o majors de 200 UI/ml (8,9% ($n=6$) vs 2,3% ($n=5$), $p_2s=0,029$), encara que les correccions per l'edat fan que desaparegui la significació de l'associació ($p=0,16$) (taula 50).

Taula 50

Resultats de l'anàlisi dels marcadors microsatèl·lits

marcador	fenotip	p	p*rl
<i>D19S922</i> *D3	Asma	0,04	0,03
<i>D19S884</i> *D1	IgEs > 100 UI/ml	0,05	0,051
<i>D19S884</i> *D1	Atòpia1	0,04	0,046

*rl, correcció per regressió logística

Estimació d'haplotips

Mitjançant estimació dels haplotips (PMPLUS i 2ld) es va estimar el desequilibri de lligament entre els diferents parells de marcadors. Només es varen considerar els al·lèls amb una freqüència més alta del 5%. La significació més alta en aquest grup va ser entre els marcadors *D19S922**D4 i *D19S884**D1 amb un coeficient $D'=0,7$ i entre els marcadors *D19S922**D3 i *D19S884**D7 amb un coeficient $D'=0,6$.

Missense Mutations in the Cystic Fibrosis Gene in Adult patients With asthma

Rafael de Cid, Conxi Lázaro, Jordi Sunyer, Joan Soriano, Javier Giménez, Mónica Álvarez, Teresa Casals, Josep M. Antó and Xavier Estivill

Human Mutation 14:510-519 (1999)

CFTR and asthma in the French EGEA study

de Cid R, Chomel JC, Lázaro C, Sunyer J, Baudis M, Casals T, Le Moual N, Kitzis A, Feingold J, Antó J, Estivill X, Kauffmann F.

European Journal of Human Genetics: 2001 67-9.

Aquest treball es va realitzar amb col·laboració amb el grup de la Dra. Kauffman. El nostre equip va realitzar l'anàlisi de les variants de *CFTR* amb error de sentit en la mostra EGEA.

**Different role for Cystic Fibrosis
Transmembrane regulator gene (CFTR)
variants in Childhood asthma.**

de Cid R, Casals T, Vázquez C, Elorza X, Estivill X and
Lázaro C.

Setembre 2002 Clinical Experimental
Allergy

A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the Cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals.

C. Bombieri, S Giorgi, S. Carles, **de Cid R**, F. Belpinati, C. Tandoi, N. Pallares-ruiz, C. Lázaro, B. Ciminelli, M. Romey, T. Casals, F. Pompei, G. Gandini, M. Claustres, X. Estivill, P. Pignatti and G. Modiano.

Human Genetics (2000) 106: 172-178

En aquest treball es presenten les dades de la freqüència de les variants detectades en la població general en tres poblacions mediterrànies, i s'hipotetitza sobre el paper patogènic de les variants en base a la seva freqüència a la població general. El nostre grup va realitzar l'anàlisi de la mostra d'individus de la població espanyola.

Enquesta a portadors de mutacions a *CFTR*

Per a estudiar la contribució del gen *CFTR* a l'asma es va realitzar una enquesta sobre la presència de símptomes respiratoris d'asma en la població espanyola portadora de mutacions en el gen *CFTR*. A continuació s'explica com es va realitzar el procés i els resultats que se'n van derivar.

Es va dissenyar un qüestionari curt on s'interrogava sobre la presència de problemes respiratoris generals, així com per la presència específica de símptomes respiratoris en un període de temps concret (els darrers dotze mesos) (veure annex 2). El qüestionari es basava en els models proposats per la IUATLD per investigar la presència d'asma a través de la descripció dels símptomes respiratoris recents.

Es va considerar que un pacient presentava asma quan responia de forma afirmativa a la pregunta ¿ha tingut sibilacions o xiulets al pit durant els darrers dotze mesos?, a més d'una resposta afirmativa a alguna de les 5 qüestions següents; símptomes nocturns d'opressió?, símptomes nocturns d'ofec? símptomes nocturns de tos?, atacs d'asma? o ús de medicació antiastmàtica?

Juntament amb les qüestions sobre símptomes respiratoris es va incorporar la pregunta sobre presència de rinitis, així com la descripció d'altres problemes respiratoris presents (sinusitis, al·lèrgies, refredats, etc.).

Amb la intenció d'entrevistar als portadors obligats de mutacions a *CFTR*, juntament amb el butlletí mensual d'informació de l'Associació Espanyola de Malalts de FQ, es va fer arribar un exemplar del qüestionari a 7000 socis de l'associació. D'aquests, només un 8,4% van ser contestats (n=589). Per a que la mostra fos el més independent possible es van descartar els membres relacionats directament (pares-fills, germà-germà, etc..) comptabilitzant només els membres no relacionats de la família. Amb aquesta estratègia vam incloure 462 qüestionaris (6,6 % dels enviats).

Els 462 individus de la mostra eren espanyols provenint de totes les regions de l'Estat, el 48,8% eren homes, amb una edat mitjana de 56,1 anys i un rang d'edat entre 12 i 92 anys. L'edat mitjana entre homes i dones era lleugerament inferior en homes [55,31 (25-92)] que en dones [56,8 (12-85)]; T test, $p_2s = 0,101$. La mitjana d'edat en els subgrups amb problemes respiratoris, amb asma o amb rinitis era similar.

Taula 51

Descripció i freqüència de les mutacions reportades en l'enquesta. El diagnòstic d'asma està basat en els símptomes respiratoris reportats pels pacients.

Mutació	Total	Prob. resp.*	Sense prob. resp.	Asma*	Sense asma
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
G85E	0,4 (1)	2,5 (1)			0,4 (1)
E92K	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
R117H	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
H119Y	0,4 (1)	2,5 (1)	0,4 (1)		0,4 (1)
P205S	0,4(1)		0,4 (1)		0,4 (1)
V232D	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
R334W	0,7 (2)	5 (2)		4,3 (1)	0,4 (1)
R347H	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
R347P	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
G542X	7,2 (20)	7,5 (3)	7,2 (17)	8,7 (2)	7,1 (18)
A561E	0,7 (2)		0,4 (1)		0,4 (1)
G673X	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
K710X	0,4 (1)	2,5 (1)			0,4 (1)
Q890X	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
L1065R	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
R1066C	1,8 (5)	2,5 (1)	1,7 (4)	4,3 (1)	1,6 (4)
Y1092X	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
R1162X	2,2 (6)		2,6 (6)		2,4 (6)
G1244E	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
W1282X	0,7 (2)	2,5 (1)	0,4 (1)	4,3 (1)	0,4 (1)
N1303K	4,3 (12)	2,5 (1)	4,7 (11)	4,3 (1)	4,4 (11)
Q1313X	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
E2-3del	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
1078 del T	0,4 (1)	2,5 (1)			0,4 (1)
1609 del CA	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
1949 del 84	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
I507del	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
F508del	68,5(189)	70 (28)	68,1 (160)	69,6 (16)	68,3 (172)
E19del	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
2869 ins G	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
3905 ins T	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
1811+1,6 kbA>G	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
3121-1 G>A	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
3272-26 A>G	0,4 (1)		0,4 (1)		0,4 (1)
5T	0,7 (2)		0,9 (2)		0,8 (2)
711+1 G>T	1,1 (3)		1,3 (3)		1,2 (3)
712-1 G>T	1,1 (3)		0,9 (2)		1,2 (3)

* en aquestes columnnes i en ombrejat s'indiquen les mutacions amb una freqüència major en la mostra de portadors amb problemes respiratoris o amb asma

F508del, i cinc individus són portadors d'una de les següents mutacions: G542X, 1078 del T, G85E, K710X i R334W. Finalment cinc dels individus amb problemes respiratoris no definits diferents de l'asma i rinitis, són portadors de la mutació F508del.

El 9,4% (n=43) dels enquestats presentava asma, segons la presència de símptomes respiratoris (sibilacions i símptomes nocturns, o atacs d'asma o medicació d'asma), sense diferències significatives per gènere, encara que la proporció era més elevada en dones (7,6 % en homes i 11,1 % en dones, $p=0,205$).

El 8% (n=37) dels enquestats es van autodiagnosticar amb rinitis, sent la proporció significativament més alta en les dones (5,3% en homes i 10,6 % en dones).

Del total d'individus enquestats, gairebé la meitat desconeixien de quina mutació eren portadors, o bé només tenien el diagnòstic de l'haplotip de risc sense definició de la mutació. Només en determinats casos es va poder esbrinar quina era la mutació a partir de la inspecció de les històries familiars classificades en el nostre laboratori. Com a resultat final, s'ha pogut conèixer la mutació en el 60 % (n=276) dels individus (50,4 % d'homes). A la taula 51 s'han resumit les mutacions presents en la mostra de pacients enquestats.

El 69,6 % de les mutacions dels individus asmàtics eren delecions (F508del) (68,3 % en els no asmàtics), la proporció de mutacions sense sentit era gairebé la mateixa en tots dos grups (13% i 12,4% respectivament) mentre que la proporció de mutacions amb error de sentit era major en els individus asmàtics (17,4%) que en els no asmàtics (10,4%) encara que no significativament diferents ($p>0,3$).

D'igual forma, tant en el grup de portadors amb problemes respiratoris com en el grup específic de rinitis, les mutacions amb error de sentit eren més freqüents (15% i 19% respectivament) que en el respectiu grup control (al voltant de 10,4%), encara que tampoc de forma significativa. Respecte als altres grups de mutacions (delecions, i mutacions sense sentit) les proporcions eren molt similars ($p>0,2$).

En la població amb problemes respiratoris o amb asma, es va observar una freqüència més elevada de les mutacions R334W, R1006C i W1282X, encara que s'ha de tenir en compte que la mostra era reduïda (40 individus amb problemes respiratoris i 21 amb asma) i el número de portadors molt reduït (taula 52). La mutació sense sentit G542X que és la segona més freqüent en la mostra global, té una freqüència disminuïda en el grup de portadors amb rinitis.

Entre els individus amb problemes respiratoris però no asmàtics, 12 en són portadors de la mutació

DISCUSSIÓ ---

PSORIASI



L'etiologia de la psoriasi és encara confosa. L'etiopatogènia de la malaltia es debat entre la presència d'un determinant epidèrmic o bé d'una alteració immune. És clar que existeix un component genètic important en la predisposició, però que generalment es manifesta després de l'actuació de determinats factors ambientals com l'estrès o el clima.

La presentació juvenil està associada amb *HLA-Cw*6*

Des de la seva definició el 1985 per Henseler i Christophers (Henseler i Christophers 1985) s'ha intentat distingir clínicament entre la psoriasi de tipus I i II (Swanbeck et al. 1995; Bernhard 1996). En un intent d'evidenciar aquestes diferències, el nostre grup va genotipar l'al·lel *HLA-Cw*6* en 69 pacients no relacionats i va estudiar la relació entre les característiques clíniques de la malaltia amb l'al·lel *HLA-Cw*6* i també amb l'edat de presentació.

Aquests resultats estan basats en l'anàlisi dels casos índex seleccionats amb uns criteris especificats *a priori* per a incloure casos amb un component heretable important. Així, tots els individus pertanyen a famílies amb membres afectes en dues o tres generacions, o bé presenten més d'un membre afecte a la família. Aquesta selecció prèvia és una estratègia encertada per als estudis de lligament que s'han realitzat, ja que enriqueix la mostra amb casos "familiars", però dificulta l'establiment d'unes classes diferenciades entre els dos tipus de psoriasi amb un biaix positiu cap a la psoriasi tipus I.

El nostre equip va observar una correlació entre l'al·lel *HLA-Cw*6* i l'edat de presentació en els casos de presentació més juvenil. Així, en considerar dos grups d'edat amb un llinar en l'edat mitjana de presentació de la malaltia en la nostra mostra (de 17 anys), es va observar que en el grup d'individus amb una edat inferior a 17 anys, els portadors de *Cw*6* presentaven una edat d'aparició inferior, sent especialment significatiu en els individus de sexe masculí. Aquest fet confirma l'associació de *Cw*6* amb l'edat de presentació juvenil de la malaltia, de forma idèntica al que s'ha reportat pel grup d'Enerback i col·l. quan van establir un llinar d'edat en els 20 anys dintre del grup amb presentació primerenca (menors de 40 anys) (Enerback et al. 1997), definint *Cw*6* com un al·lel "marcador" de risc.

El patró de localització corporal de les lesions no difereix gaire entre els pacients, només les lesions localitzades a les extremitats eren més freqüents en els individus portadors de l'al·lel *Cw*6*. La localització en altres regions, en canvi, no sembla estar associada. El significat d'aquesta relació no és clar, però el fet d'haver estat reportat en un altre estudi realitzat en una població islandesa (Guedjonsson et al. 2002), una població d'origen ètnic i sotmesa a unes condicions ambientals totalment diferents a les presents en la nostra població (p.ex., menor exposició al sol i baixes temperatures), posa de manifest una forta determinació genètica en la manifestació de la malaltia deguda a l'efecte de *Cw*6* (o potser a l'efecte d'altres gens propers). D'altra banda, la major freqüència de lesions al tronc que es reporta en l'estudi islandès, només es va ser observat pel nostre grup en les dones portadores. Aquesta diferència pot ser atribuïda a (1) una reduïda mida mostral del grup (n=33), (2) a un efecte modificador depenent del sexe o (3) a una possible diferència en la percepció de les lesions per part d'homes o dones. En aquest sentit, és conegut que la psoriasi presenta unes conseqüències importants en la qualitat de vida, amb efectes tant a nivell social com emocional (Fried et al. 1995). Una menor afectació psicosocial ha estat associada amb una edat d'aparició tardana i amb el sexe masculí, i malgrat que un estudi realitzat sobre la qualitat de vida dels pacients no va revelar diferències en el grau d'afectació psicosocial entre sexes (Gupta i Gupta 1995), és possible que la presència de la malaltia en determinades localitzacions pugui ser entesa de forma diferent pels homes o les dones. D'altra banda, tampoc es pot descartar que la psoriasi sigui un caràcter influït pel sexe; de fet, l'edat de presentació es més primerenca en el sexe femení.

L'aparició de lesions en determinades localitzacions; els plecs, planta del peu, palmells, ungles i tronc era indicativa d'una major severitat, i es relacionava amb una major extensió de la superfície corporal afectada, però la severitat no estava influïda pel sexe ni per l'al·lel *HLA-Cw*6*. És possible que les

formes que presenten aquesta distribució, amb una severitat associada més elevada, puguin representar formes de psoriasi amb uns determinats gènics diferents a Cw*6. Així, per exemple, s'ha descrit que les lesions a les ungles estan associades a la manifestació artrítica de la psoriasi, de la que s'ha postulat una determinació genètica diferent a la psoriasi (Gonzalez et al. 1999; Hohler et al. 2002).

Pel que fa a les característiques clíniques de la malaltia, no es va observar una diferència significativa entre els individus portadors i no portadors. Només, de manera curiosa, destacarem que la forma de psoriasi guttata era tres vegades més freqüent en homes, de forma que cap la probabilitat que l'associació d'HLA-Cw*6 i la presentació primerenca observada en homes sigui un reflex de l'associació amb la forma guttata descrita en altres poblacions. D'altra banda, i de forma similar al que s'ha observat en la població islandesa, els pacients que presenten lesions amb pústules (a més de lesions en placa) presentaven una edat d'aparició molt primerenca (8 anys), sent dos dels tres pacients, portadors de l'al·lel HLA-Cw*6.

Identificació de *PSORS1* com a locus de predisposició

Un dels objectius principals quan es va començar el treball era la identificació de les regions genòmiques de predisposició a psoriasi. Durant el període de col·lecció de les mostres es varen descriure fins a tres regions de predisposició, anomenades *PSORS1*, *PSORS2* i *PSORS3* (Tomfohrde et al. 1994; Nair et al. 1995; Matthews et al. 1996; Trembath et al. 1997). El nostre grup va analitzar aquestes regions i la regió 1q21, posteriorment anomenada *PSORS4*, basant-se en la presència de candidats funcionals en la regió (Hardas et al. 1996). Les altres regions de predisposició descrites posteriorment (veure taula 19b, pg.63), malgrat la seva importància en altres poblacions, no varen ser incloses en aquest estudi i la seva implicació en la predisposició a psoriasi en la nostra població no està establerta.

Mitjançant l'anàlisi de lligament s'ha observat que en la mostra de la població espanyola analitzada la regió 6p21 és susceptible de contenir un gen de predisposició a psoriasi (de Cid et al. 2001b). Els resultats obtinguts van ser lleugerament diferents segons la metodologia emprada, encara que coincidents. Inicialment, els resultats de les anàlisis paramètriques

van excloure *PSORS1* i les altres tres regions analitzades (*PSORS2*, *PSORS3* i *PSORS4*). Però l'anàlisi no paramètrica amb el mètode de compartició d'al·lels va evidenciar la presència d'una regió de lligament en la zona 6p21.3, al voltant del gen *TNF* i del locus *HLA-C*. La regió amb màxima significació està delimitada pels marcadors *D6S276* i *D6S273*, la qual cosa està d'acord amb les regions reportades en altres cerques realitzades anteriorment (Trembath et al. 1997; Veal et al. 2001; Xu et al. 2001).

La falta de replicació observada en les regions de 17q, 4q i 1cen-q21, més que una exclusió de les regions com a loci de predisposició, es pot atribuir a la presència d'heterogeneïtat genètica i a un efecte menor en la predisposició en la mostra espanyola, dels gens situats en aquestes regions. D'altra banda, és possible que, a més dels determinants genètics, les interaccions entre els loci causants de la predisposició siguin també diferents entre les poblacions. La regió 17q ha estat replicada en altres estudis, però s'ha descrit en interacció, encara que de signe divers, amb altres loci (Tomfohrde et al. 1994) (Barnes et al. 1998), a l'igual que el locus de la regió 1cen-q21 (Capon et al. 1999b). Aquest resultat negatiu també podia ser degut a la baixa significació, en la nostra població, dels marcadors utilitzats. En aquest sentit, la confirmació de diferents loci en distintes poblacions no sempre és coincident en els marcadors amb més alta significació. D'altra banda, és possible que els resultats negatius en les regions analitzades només posi de manifest l'especificació errònia del patró d'herència i les carències de l'aproximació clàssica dels mètodes de lligament.

Així doncs, posteriorment a la publicació dels primers resultats (presentat a la pàg. 86), es van incloure nous marcadors en la regió *PSORS1* definida pels marcadors *D6S276* i *D6S273* i algunes modificacions en l'anàlisi de les dades, considerant en el càlcul de lligament la hipòtesi d'heterogeneïtat genètica en les famílies i modificant el valor de la freqüència gènica del locus malaltia d'acord amb les dades recents en la població espanyola (Ferrandiz et al. 2001). Aquestes modificacions van evidenciar novament el lligament amb el locus 6p21, però no amb les altres regions *PSORS* analitzades.

Està establert que una prevalença major disminueix la potència de l'anàlisi i augmenta lleugerament la probabilitat d'un error de tipus I (Xu et al. 1998). La variació de la prevalença influeix directament en la freqüència gènica del locus malaltia, i augmenta la probabilitat que un individu no tipat sigui portador. Aquest efecte pot ser important en els casos com el nostre, en el que les dades familiars són incompletes i d'alguns individus es desconeix el genotip.

Per això, d'una forma experimental, es van realitzar proves *a posteriori* simulant l'anàlisi amb diferents freqüències gèniques (des de 0,01 fins a 0,1). Els resultats no van variar de forma significativa, la qual cosa suggereix que la manca de potència en l'anàlisi paramètrica es devia probablement a altres factors, com l'especificació errònia del model d'herència (dominant/recessiu) o la presència de fenocòpies genètiques, això és, d'heterogeneïtat genètica.

A continuació es discuteix principalment sobre els resultats obtinguts en la regió *PSORS1* i *PSORS3*.

Caracterització dels loci *PSORS*

La regió o locus *PSORS1* ha estat reportada de forma consistent en poblacions de diferent origen ètnic, encara que fins ara es desconeix quin és el gen implicat en la predisposició. *PSORS1* està localitzat en la regió del MHC, una regió especialment rica en potencials gens candidats (veure figura 5, pg. 23) amb funcions molt diverses: gens de reconeixement i restricció de la resposta immune específica com els gens del complex de MHC, gens immunomoduladors com el *TNF*, gens que intervenen en la presentació i processament dels antígens, gens que intervenen en el procés de diferenciació cel·lular i altres gens com els que codifiquen per a les proteïnes de *estrés* cel·lular.

Un cop establert *PSORS1* com una regió de predisposició en la nostra mostra, l'anàlisi de múltiples punts va establir el punt de lligament en una posició més centromèrica (*D6S273*) que l'anàlisi de dos punts (*D6S276*). Això s'explica en part degut al fet que encara que l'anàlisi de múltiples punts és més robusta a l'assignació incorrecta de les freqüències al·lèliques, d'altra banda és molt sensible a la posició dels marcadors al mapa (Kong et al. 2002). La localització poc acurada d'alguns dels marcadors, pot estar en la base de les variacions que s'observen amb els marcadors *D6S273* i *D6S276*, però també es podria explicar per un patró de recombinació específic dintre d'aquesta regió. De fet, aquests dos marcadors estan separats físicament 8 Mb, però la distància genètica és molt més reduïda, al voltant de 0,5 cM, la qual cosa reflexa la reducció dels processos de recombinació que pateix la regió i apunta a la manca d'eficàcia de l'anàlisi de múltiples punts en el mapatge fi d'aquesta regió.

Herència del locus *PSORS1*

Referent al model d'herència de la psoriasi, els estudis de segregació realitzats en diverses poblacions han donat resultats distints (veure taula 3, pg. 19), però d'una forma general, els estudis epidemiològics han proposat un model autosòmic dominant com a model d'herència de la psoriasi. En canvi les anàlisis realitzades pel nostre grup presenten evidències de l'herència recessiva de la malaltia, si més no, l'associada amb el determinant de *PSORS1*.

En l'anàlisi paramètrica, s'evidencia que el model que millor s'ajusta al locus 6p21 és un model recessiu amb baixa penetració i amb una taxa de fenocòpies del 10%. Tot i així, 6p21 no és l'únic determinant ja que no totes les famílies lliguen i el màxim LOD s'aconsegueix amb un 70% de les famílies lligades. Així, estudis genètics en famílies han observat, de forma independent, un patró d'herència recessiu amb els marcadors del *cluster* TNF (Nair et al. 1997) i amb el marcador *D6S273* (Trembath et al. 1997). Potser, com proposa Swanbeck i col·l., el patró d'herència sigui de tipus pseudodominant amb una alta freqüència per a l'al·lel malaltia. Aquesta hipòtesi estaria d'acord amb la proposada per Reich i Lander (2001), que han suggerit que, en les malalties complexes, el risc seria atribuïble a un número petit de *loci*, però amb una freqüència gènica elevada.

Mitjançant l'anàlisi de la regió amb mètodes que no requereixen l'establiment d'un model genètic preestablert es va observar una significació més elevada, amb un màxim en els marcadors *D6S276* i *D6S273* quan es va fer servir el programa GENEHUNTER. En el cas del SimIBD, en canvi, els resultats més significatius es van observar amb dos marcadors interns de la regió definida (*HCR-325* i *HCR-307*), de forma coincident amb l'anàlisi paramètrica realitzada sota un model recessiu. No sembla ser un efecte inespecífic degut al caràcter bial·lèlic del marcador ja que els altres marcadors bial·lèlics (*HCR1723* i *CDSN-1243*) no presentaven resultats significatius.

Els resultats de les dues aproximacions no coincideixen totalment. Només en els marcadors *D6S273* i *D6S276* els resultats són comparables, però en el cas dels marcadors d'*HCR*, el valor de l'NPL no és en absolut significatiu. Aquesta discrepància es podia explicar per la forma diferent de valorar la significació. A més, en el cas de *loci* que actuen de forma recessiva, el mètode SimIBD és molt més potent, i la sensibilitat a l'error en l'assignació de les freqüències al·lèliques és més baixa que en el cas del GENEHUNTER o d'altres mètodes que no fan servir la simulació com a estratègia per a mesurar la significació (Davis et al. 1996). El SimIBD fa una rèplica a l'atzar de 1000 sèries diferents, basant-se en la

frequència de l'al·lel marcador i de l'al·lel malaltia, de forma que es compara la probabilitat de les dades observades i la de les generades a l'atzar independentment de l'estat d'afecció. El GENEHUNTER, en canvi, fa una aproximació més conservativa quan, com en el nostre cas, les famílies són incompletes i el contingut informatiu és baix (Kruglyak et al. 1996). De forma indirecta, el resultat altament significatiu de l'anàlisi de SimIBD recolza l'herència recessiva observada en els marcadors de la regió del *HCR*.

Efecte patern en *PSORS1*

Diversos estudis, tant epidemiològics (Lomholt 1963; Farber i Nall 1974; Traupe et al. 1992) com genètics, (Burden et al. 1998; Veal et al. 2001), han apuntat a un efecte patern en l'herència de la psoriasi, juntament amb fenòmens d'anticipació paterna. En l'estudi dels casos índex de les 259 històries col·leccionades no es van observar diferències significatives quant a l'edat d'aparició de la malaltia o la proporció de sexes en els fills afectes en funció del sexe del progenitor.

El baix número de meiosis observades o, més probablement la presència de fenocòpies genètiques, potser no ha permès detectar aquest efecte d'una forma clara en la mostra analitzada. En canvi, mitjançant la modelació de les anàlisis de lligament sí que es va evidenciar un clar efecte patern, de forma específica en l'herència del *locus PSORS1* (però no en les altres tres regions). L'anàlisi paramètrica amb el programa GENEHUNTER va evidenciar un canvi oposat en els valors de LOD quan es considerava un efecte patern o matern en l'herència de l'al·lel malaltia, amb un increment en el cas de major penetració de l'al·lel patern.

L'efecte parental no és un fenomen aïllat, és comú en malalties mendelianes i en complexes, com en l'asma, ladiabetis de tipus I, l'esquizofrènia, el trastorn bipolar, entre d'altres (Morison et al. 2001). En el cas de la psoriasi ha estat descrit un efecte semblant en la distorsió del grau de compartició dels al·lells del *locus PSORS1* (Burden et al. 1998). Aquest grup va descriure un màxim de lligament en la mateixa regió que el nostre grup amb els marcadors *D6S276*, *TNFA*, *D6S273* i *D6S291*, amb una gran diferència en el grau de compartició dependent de l'origen patern o matern de l'al·lel, que era de 92% en cas d'origen patern (Veal et al. 2001). En el nostre estudi, de forma coincident, s'ha observat un màxim en aquesta regió i mitjançant mètodes de lligament paramètric s'ha observat un efecte patern similar.

Les causes d'aquesta transmissió paterna preferent poden explicar-se per fenòmens d'impressió genètica (*imprinting*). Són molts els gens que estan sotmesos a fenòmens de silenciament per *imprinting* en el genoma humà, s'han descrit fins a 40 *loci* (URL/www.otago.ac.nz/IGC) (Morison et al. 2001). En aquesta regió en concret s'han descrit fenòmens d'impressió genètica per al *locus IDDM1* (Margaritte-Jeannin et al. 1995), i també en el gen *HFE*, implicat en l'hemocromatosi hereditària (Bulaj et al. 1996). És per això que no seria estranya la presència d'un fenomen semblant en el *locus PSORS1*.

Lligament amb *PSORS3*

El nostre equip va evidenciar lligament amb marcadors de la regió *PSORS3* quan es va considerar una penetració diferent de la malaltia en funció de l'edat de presentació.

La raó que ens va empenyer a fer aquesta aproximació, radica en el fet que diversos estudis epidemiològics han proposat una etiologia diferenciada en els casos de psoriasi de tipus I i de tipus II basant-se en l'edat de presentació de la malaltia. Swambeck i col·l., en un estudi epidemiològic, han distingit fins a tres tipus diferents de psoriasi *vulgaris* respecte a l'edat d'aparició, encara que amb un grau important de solapament (Swanbeck et al. 1995). De forma específica, a la població espanyola, s'han definit dos grups diferenciats quant a clínica i curs de la malaltia en base a l'edat d'aparició de la malaltia, amb un llindar d'edat situat en els 33 anys (Ferrandiz et al. 2002).

La manca de replicació en altres estudis es podria explicar per: (1) l'heterogeneïtat genètica de la psoriasi, evidenciada en els nombrosos estudis realitzats, (2) per un hipotètic baix risc inherent al *locus 4q* o (3) per causes circumstancials, com la no inclusió d'un mapa extens i saturat de marcadors de la regió o un possible biaix dels grups investigadors cap a l'estudi de regions amb associació positiva. Alternativament, com s'ha observat, la no consideració d'un efecte específic dependent de l'edat pot haver contribuït a la manca de replicació. D'altres estudis realitzats en poblacions diferents (Bhalerao i Bowcock 1998) (Samuelsson et al. 1999) donen suport a un *locus* en aquesta regió, encara que no representaria un *locus* principal. Samuelsson i col·l., van reportar lligament nominal amb un marcador dintre de la regió candidata *PSORS3*, mentre que Bhalerao i col·l. van situar-lo en una regió a 15cM centromèrica de *D4S1535*. Tanmateix, s'ha de tenir en compte, però, que el nostre resultat només evidència una tendència, i no s'han tingut en compte els criteris

d'astringència proposats en els estudis de Lander (Lander i Kruglyak 1995).

L'explicació més plausible d'aquests resultats positius en la regió *PSORS3* posa de manifest un paper secundari del *locus* amb un baix risc associat. De forma similar, en l'estudi original es va posar de manifest el lligament amb marcadors de 4q (Matthews et al. 1996), quan es va fer l'anàlisi amb una restricció del fenotip; amb una reducció de les fenocòpies presents en la mostra mitjançant l'exclusió d'individus sans (no afectes de psoriasi) amb edat menor de 30 anys i analitzant genealogies multigeneracionals.

Des del punt de vista de possibles gens candidats funcionals presents a la regió, el gran avanç que ha significat el projecte Genoma Humà en la identificació de gens ha posat de manifest que la regió entre els marcadors *D4S1450* i *D4S2921* és una regió rica en gens, entre els que podem destacar: gen *FAT* (*FAT tumor suppressor homòleg 1*) (*LocusID:2195*) i el gen *TLR3* (*Toll-like receptor-3*) (*LocusID:7098*).

FAT és un membre de la família de les cadherines, que s'expressa en l'epiteli fetal i del que s'hipotetitza que actua com a una molècula d'adhesió amb un paper important en la comunicació intercel·lular. *TLR3* codifica per a una proteïna de la família de proteïnes TLR (TLR1-10). Aquests receptors, que es troben conservats evolutivament des de *Drosòfila*, intervenen en l'activació de la immunitat innata amb el reconeixement de motius bacterians (PAMPs de l'anglès *pathogen-associated molecular patterns*). En concret, *TLR3* codifica per a una proteïna que s'expressa a placenta, pàncrees i que en la sèrie leucocitària s'expressa exclusivament en les cèl·lules dendrítiques (CD) (Muzio et al. 2000). Aquestes cèl·lules intervenen en el desenvolupament de la resposta immune cel·lular dirigint-la cap a Th1 o Th2 (Moser et al. 2000). A més, l'expressió de TLRs està sotmesa al desenvolupament ontogènic en la maduració de les CDs, dirigint-les cap a cèl·lules presentadores d'antigen més que reconeixedores de PAMPs (Visintin et al. 2001). Experiments amb ratolins de manca de funció (*trl*^{-/-}) han demostrat una capacitat reduïda de produir (després d'estimulació) citocines proinflamatòries IL-6, IL-12 i TNF (Alexopoulou et al. 2001), citocines que poden estar implicades en la severitat del fenotip psoriàtic (Hohler et al. 1997). *TLR3* com a reconeixedora de PAMPs, podria estar implicada en els brots de psoriasi associats a infeccions bacterianes o bé en les formes associades a les infeccions d'HIV (Mallon i Bunker 2000), ja que també pot reconèixer RNA de doble cadena (Alexopoulou et al. 2001).

Interacció entre *PSORS1* i *PSORS3*

L'heterogeneïtat genètica complica les anàlisis de lligament, ja que, en general, aquestes assumeixen la transmissió en les famílies d'un únic *locus* malaltia, de forma que es poden detectar falsos recombinats i una pèrdua important de potència. La selecció prèvia segons els individus índex que es va realitzar en la col·lecció de la mostra (mitjançant criteris clínics i història familiar) probablement va reduir l'heterogeneïtat present a la població, però aquesta estratègia, encara que ha donat resultats positius en altres malalties com la malaltia d'Alzheimer de presentació tardana (Pericak-Vance et al. 1991), no va ser suficient per eliminar l'heterogeneïtat de la mostra, posant de manifest la presència de més d'un determinant genètic i un possible efecte d'interacció. Com a estratègia alternativa es van aplicar mètodes paramètrics que, encara que d'entrada rebaixen la potència de l'anàlisi en imposar un patró d'herència determinats, permeten d'altra banda introduir més flexibilitat en la determinació del grau de fenocòpies ambientals i genètiques.

El gran component de risc que significa l'al·lel *HLA-Cw*6* per als portadors i l'evidència que no totes les famílies lligaven amb 6p21, ens va suggerir la necessitat de fer una anàlisi d'interacció entre els *loci*, que per altra banda és el patró esperable en la majoria de malalties comunes. Com a primera aproximació es va modificar la penetració de la malaltia dependent de *Cw*6*. L'augment del valor LOD per a un marcador de 4q amb un 70 % de les famílies lligades posava de manifest un efecte interactiu entre tots dos *loci*, i a la vegada evidenciava que no totes les famílies que lliguen amb *HLA-Cw*6* presenten un determinant a 4q35. D'altra banda, l'increment observat en els marcadors *HCR-307* i *HCR-325*, amb el 100% de les famílies lligades, ens indicava l'estreta relació d'aquests marcadors amb els determinants lligats al risc d'*HLA-Cw*6*. L'anàlisi simultània d'interacció, quan es va fer de forma no paramètrica, no va evidenciar cap interacció significativa amb els *loci* a 1q21 i 17q, només una significació molt baixa en el cas de la interacció entre 4q35 i 6p21. L'anàlisi paramètrica, en canvi, va posar de manifest la relació entre els dos *loci* a 6p21 i 4q35, amb una localització del *locus* de 4q35 a una regió situada a 4,2cM telomèrica de *D4S1540*.

Els dos *loci* presentaven un model d'acció no epistàtic, suggerint un model d'herència amb heterogeneïtat, potser implicant dues vies diferents en l'etiologia de la malaltia, més que un efecte concurrent de mutacions en ambdós *loci*. El fet que els individus

portadors de Cw*6 presenten una edat d'aparició de la malaltia més primerenca podria indicar una funció en aquestes circumstàncies, suggerint per al *locus* a 4q35 un paper secundari com a modificador del curs de la malaltia. La forta correlació que s'ha observat en altres poblacions entre la presència de l'al·lel Cw*6 i la manifestació clínica de la psoriasi guttata (Mallon et al. 2000) podria explicar-se per un efecte d'interacció relacionat amb la hipotètica funció en la inflamació del *locus* 4q en aquest grup de pacients. El nostre equip, però, no ha detectat una major freqüència de pacients amb psoriasi guttata. Alternativament, pot ser que la interacció no estigui implicada específicament en aquestes manifestacions clíniques, però sí en una aparició més primerenca de les malalties.

La interacció entre els *loci* de predisposició en psoriasi ha estat descrita en diferents estudis, però el sentit d'aquestes interaccions és divers en diferents poblacions. Barnes i col·l. mitjançant estratificació de les famílies per HLA-Cw6, han proposat l'existència d'interacció entre diferents *loci*, suggerint per al *locus* 17q un model d'acció depenent de l'HLA (Barnes et al. 1998) mentre que Tomforhdre i col·l. han descrit una acció de 17q independent de CW*6. Finalment, en una població italiana s'ha descrit la interacció epistàtica entre el *locus* de 1q21 i el *locus PSORS1* (Capon et al. 1999b). A més a més, s'han descrit interaccions amb múltiples regions; Veal i col·l. han descrit la interacció de *PSORS1* amb altres regions candidates a 2q i 20p (Veal et al. 2001), mitjançant estratègies d'estratificació basades en els valors positius d'NPL observats en les anàlisis prèvies del primer *locus*.

Els resultats observats pel nostre grup i els que han estat reportats en altres estudis indiquen que a més de l'heterogeneïtat present en l'herència de la psoriasi, el grau d'interacció entre els múltiples *loci* és molt variable entre poblacions. La manca d'interacció amb les regions 1q21 i 17q en la mostra analitzada pel nostre grup, és probable que sigui deguda a una absència real d'interacció en la població espanyola, o bé alternativament, estar causada per una deficient modelació de la interacció. D'altra banda, el fet que amb una anàlisi no paramètrica no haguéssim pogut detectar una interacció amb cap de les regions (inclusives *PSORS1* i *PSORS3*), recolza la idea de la presència de fenòmens d'interacció complexos.

Aquest patró d'interaccions entre els diferents *loci* de predisposició és un fenomen esperat en l'herència de les malalties comunes. A més, en el cas de la psoriasi, l'important pes de l'etiologia immunològica de la malaltia fa pensar en una llarga llista de potencials

candidats al llarg de les vies immunològiques, molts d'ells amb funcions pleotròpiques. De fet, algunes de les regions candidates de psoriasi han estat associades amb altres malalties de caire immunològic com l'asma i la dermatitis atòpica (Cookson et al. 2001; Veal et al. 2001). En aquest sentit Becker i col·l. han evidenciat una colocalització de regions de predisposició a diverses malalties de caire immunològic (psoriasi, malaltia de Crohn, asma, artritis inflamatòria), en 18 regions o *clusters* del genoma (diferents del MHC) (Becker et al. 1998). El diferent signe d'aquestes malalties, suggereix alteracions oposades en el nivell d'expressió dels possibles gens candidats comuns.

Corol·lari

S'ha cregut adient que, donada la manca de significació *acadèmica* d'alguns dels resultats presentats, la inclusió del següent apartat és necessària per valorar les dades i les conclusions aportades. S'ha volgut incloure part de les consideracions metodològiques que van justificar les anàlisis realitzades i que permeten valorar els resultats.

En primer lloc, l'aproximació que s'ha fet en aquest estudi és comparable a una cerca genòmica dirigida (estratègia dels gens/regions candidats), per la qual cosa s'ha de pensar que els nivells de significació o, millor dit, els nivells d'astringència requerits per a l'avaluació de la significació es poden rebaixar, doncs existeix una probabilitat prèvia d'obtenir un resultat positiu. Amb uns pressupòsits com aquests, sembla que l'aplicació dels criteris tant astringents proposats per Lander i col·l., (Lander i Kruglyak 1995) són excessivament conservatius. L'ús de nivells de significació elevats per a minimitzar els falsos positius té l'inconvenient de generar falsos negatius (Rao i Gu 2001). Tot i així, el que sí està acceptat de forma universal, és que la rèplica d'altres estudis serveix com una confirmació d'un resultat positiu.

Quant a la utilització de múltiples models d'herència que s'han utilitzat en aquesta anàlisi, els treballs de Greenberg i Abreu amb la simulació de múltiples models (Greenberg i Abreu 2001), indiquen que per a l'estudi de malalties complexes les anàlisis paramètriques són una aproximació igual o més robusta que les anàlisis no paramètriques. A més, l'assaig de lligament sota els distints models de dominància amb

penetració reduïda i la correcció pels múltiples tests dona més potència al test que el que penalitza l'augment de l'error de tipus I.

En les anàlisis no paramètriques, tots els individus afectes tenen la mateixa taxa de fenocòpies, de forma que es té menys certesa que realment siguin portadors de l'al·lel malaltia. L'anàlisi paramètrica, en canvi, ha permès l'ús de les classes de probabilitat com una eina per incrementar la informació de lligament que es pot extreure de la mostra, maximitzant la informació dels individus de risc i minimitzant l'impacte de les fenocòpies, ja que podem assignar diferents graus de fenocòpies (genètiques o ambientals) a diferents individus depenent de l'edat, severitat o qualsevol altre caràcter definit com a factor de risc en la població. En les anàlisis presentades aquí es van aplicar criteris d'estratificació per edat, per sexe progenitor, i per Cw*6, criteris que per les evidències prèvies en altres poblacions i en la nostra mostra, s'ha cregut que podien ajudar a reduir l'heterogeneïtat de la mostra. L'increment de la significació que s'ha observat en efectuar els diferents tipus d'estratificació (edat, sexe progenitor, Cw*6) es pot interpretar com una prova indirecta de l'heterogeneïtat en la nostra població. Se sap que l'estratificació de la mostra augmenta el poder per detectar lligament quan realment hi ha present una etiologia heterogènia (ja sigui severitat del fenotip, etnicitat o edat d'aparició de la malaltia), però no quan és absent (Leal i Ott 2000).

Gens candidats de la regió *PSORS1*

L'estratègia que es va seguir després d'estudiar aquestes quatre regions va venir donada, en primer lloc, pel ràpid avanç en la publicació d'estudis similars de lligament en poblacions de diferent origen geogràfic: britàniques, centreeuropees, americanes, nordeuropees, i també mediterrànies (Nair et al. 1997; Trembath et al. 1997) (Enlund et al. 1999a) Capon et al. 1999a; (Lee et al. 2000; Veal et al. 2001) amb resultats coincidents en regions concretes (veure taula 19b, pàg. 63), i en segon lloc, per l'estructura de la mostra de pacients de la que disposàvem, que ens va fer pensar que l'aproximació més raonable quant a potència era un estudi de gens candidats.

Després de confirmar que 6p21 era el *locus* que millor significació tenia en la nostra mostra (de Cid et al. 2001b) i el que compartien la majoria de poblacions estudiades, es va decidir centrar-se en l'estudi dels gens

de la zona 6p21, amb la identificació de polimorfismes funcionals i en l'estudi de les variants associades a psoriasi en altres poblacions.

TCF19

El gen *TCF19* va demostrar ser molt polimòrfic. Després d'haver fet un triatge del gen en 188 cromosomes es van observar 8 canvis diferents, amb una variant cada 400 pb aproximadament, sent l'exó 2 el més polimòrfic dels tres.

Els tres canvis amb error de sentit descrits (P109T, P241L i V211M), encara que afecten a posicions conservades en mamífer com el *Sus sp*, són de caire conservatiu i presenten unes freqüències similars en els pacients i en els controls. Respecte a la variant CCTT3925del, cal destacar que es va observar només en els individus afectes. La posició de la deleció prop de l'acceptor d'*splicing* de l'exó 2 no afecta la seqüència consens, tot i així no es pot descartar una expressió alterada de *TCF19*, com ha estat reportat en altres casos; on seqüències repetides prop de l'acceptor s'associen a una expressió alterada del gen *CFTR* (Chu et al. 1993). No és probable que aquestes variants *per se* siguin la causa de predisposició observada en *PSORS1*. Els canvis observats tenen una freqüència entre el 9 i el 10% en la població general, de forma que en cas de ser al·lells de predisposició haurien de tenir una baixa penetració. Tanmateix, no es pot descartar que altres variants de la zona promotora o de la regió UTR no analitzada puguin estar implicades. Els criteris per establir la causalitat d'un gen en una malaltia estan basats en consideracions teòriques, i en la baixa freqüència de l'al·lel mutant, però en parlar de malalties complexes aquests criteris no s'adeqüen; és més, una alta freqüència de les variants de predisposició a la població general sembla ser la norma en moltes de les malalties complexes (Elder et al. 2001). No obstant, a part de les consideracions sobre la natura de les variants i la seva possible classificació *a priori* com a mutacions o polimorfismes, el fet més important és que cap de les variants presentava una associació amb psoriasi.

Altres estudis han analitzat el paper del *TCF19* però n'han descartat la seva implicació. Un estudi realitzat en una mostra japonesa, sí que ha realitzat un triatge complet del gen (Teraoka et al. 2000), identificant un possible haplotip de risc format per les variants 3306A-3332G en homozigosi. Aquest haplotip no ha estat observat en la mostra analitzada pel nostre equip. La diferència podria ser deguda a diferents determinants genètics en ambdues poblacions, que d'altra banda

explicarien les diferències epidemiològiques ja descrites d'una baixa prevalença, edat de presentació més tardana o caràcter esporàdic de la malaltia que caracteritza la psoriasi en la població japonesa (Oka et al. 1999). Alternativament poden estar relacionades amb el diferent bagatge genètic de les poblacions i el diferent patró de desequilibri de lligament a la regió. Així aquest haplotip de predisposició presenta un desequilibri amb altres al·lels diferents a Cw*6 (minoritari en la població caucàsica afecta) com *HLA-Cw*7* (Teraoka et al. 2000). Un altre estudi realitzat en una població caucàsica, més semblant a la nostra, també va descartar *TCF19* com a candidat, però no es pot considerar definitori, ja que no van fer un triatge exhaustiu per detectar variants en la seva població i l'estudi només va considerar tres variants (Nair et al. 1999).

HLA, CDSN, POU5F1 i HCR

L'estudi realitzat del locus *HLA-C* ha corroborat, com en altres poblacions, que en la població espanyola els portadors de l'al·lel *HLA-Cw*6* representen un grup de risc important per a desenvolupar psoriasi: el 60% dels pacients són portadors d'aquest al·lel. A partir de les famílies estudiades s'ha determinat que ser portador de Cw*6 comporta un risc de desenvolupar la malaltia 6,6 vegades superior, risc que s'ha confirmat mitjançant el tipatge d'un grup de pacients i d'individus controls no relacionats. La contribució directa dels al·lels HLA al risc de la malaltia ha estat molt discutit. Dintre de la regió HLA, l'al·lel Cw*6 ha estat associat a psoriasi en diverses poblacions (Tiilikainen et al. 1980; Mallon et al. 1999), però la implicació directa de l'al·lel no està clarament establerta com ho demostra el fet que: (1) no tots els afectes tenen l'al·lel Cw6 (ni tant sols part de l'haplotip ancestral EH57.1 o EH13.1 que l'inclou) (Jenisch et al. 1998), (2) només un 10% dels individus portadors desenvolupen la malaltia (Elder et al. 1994), i (3) el risc associat varia en diferents poblacions: B13/37-Cw6 és el principal en japonesos i B57-Cw6 en caucàsics i xinesos.

A la nostra població a part de l'al·lel Cw*6, dues de les variants dels gens *POU5F1* i *CDSN* s'associen de forma significativa amb psoriasi: la variant intrònica, denominada al·lel B, del gen *POU5F1* i la variant codificant *CDSN+1243*C* de la corneodesmosina. Aquests resultats en principi estan d'acord amb les dades observades en una altra població espanyola, on s'ha observat un fort efecte de l'al·lel B (Gonzalez et al. 2000). A diferència de l'estudi de González i col·l., l'associació que es va observar en la mostra analitzada pel nostre grup, és secundària a l'efecte

d'*HLA-Cw*6*, per la qual cosa s'ha cregut que l'associació seria produïda per un gen en desequilibri de lligament més que per un efecte de predisposició de la variant *POU5F1*, tal i com proposen González i col·l. Si bé és possible que altres canvis no estudiats en *POU5F1* poden ser realment la causa de l'associació en la mostra asturiana, aquesta hipòtesi és poc probable ja que el bagatge genètic de la població asturiana descrita per González i col·l. no pot ser tant diferent del de la població catalana. Alternativament, és possible que només part dels haplotips que inclouen totes dues variants siguin realment de risc i només un "tercer canvi" no descobert (en aquest o en un altre gen) sigui el causant.

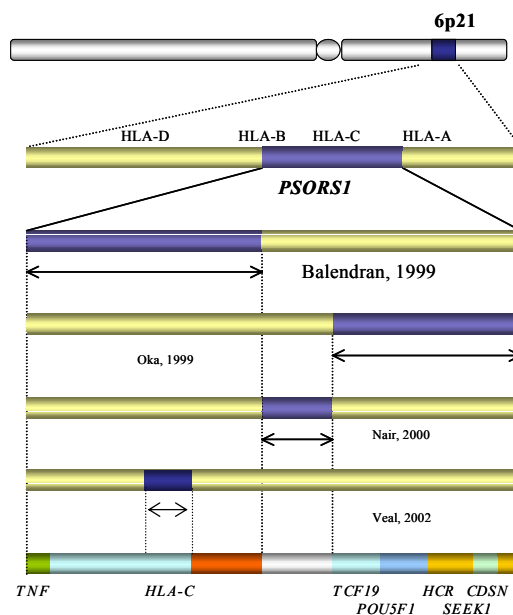


Figura 24

Esquema de la regió de 6p21 i el locus *PSORS1*. De dalt a baix s'indica quines han estat les regions de risc delimitades des de 1999. A la part inferior s'indica quins són els gens descrits en la regió en el darrer draft del Genoma Humà (*TNF*, factor de necrosi tumoral; *HLA-C*, locus C d'antígens leucocitaris; *TCF19*, factor de transcripció 19; *POU5F1*, Factor de transcripció de classe 5 amb dominis POU, 1; *HCR*, homòleg d'helix-a-coil-coiled-rod; *SEEK1*, proteïna seek1; *CDSN*, corneodesmosina)

En aquest sentit és de destacar la possible implicació de les variants de *CDSN*. Els resultats presentats pel nostre grup quan s'estratifica els pacients per *HLA-Cw*6* apunten a un efecte conjunt de les variants *CDSN+1243*C* i *HLA-Cw*6*, suggerint la presència d'un haplotip de risc. L'anàlisi de les freqüències genotípiques també confirma aquesta associació de manera indirecta, ja que es va observar que

no existeix una alteració de l'equilibri H-W en el *locus* *POU5F1*, però sí una distorsió molt evident en *HLA-C* i de forma lleugera en el cas de *CDSN*.

Aquestes dues aproximacions, la primera amb dades dels casos i controls, i la segona amb dades només dels casos, confirmen per separat els resultats de l'associació i posa de manifest que *CDSN* de forma independent a *HLA-Cw*6* pot tenir un efecte en la predisposició de psoriasis, encara que evidentment amb una baixa penetració, ja que la variant és molt freqüent en la població general.

Com ja s'ha esmentat al parlar de les distàncies genètiques dels marcadors de la regió *PSORS1*, tota la regió del MHC es caracteritza per una forta associació al·lèlica, on grans zones denominades "frozen-blocks" presenten una taxa de recombinació molt limitada (Marshall et al. 1993) que permet la conservació d'haplotips molt extensos (Foissac et al. 1997). En aquest estudi s'ha partit d'individus no relacionats, de forma que no s'ha determinat quins són els haplotips de risc en la nostra població. Per solucionar-ho es va realitzar un estudi d'haplotips mitjançant mètodes d'estimació, de forma que s'ha pogut fer un estudi d'associació considerant els haplotips, a més de conèixer quines són les relacions de lligament entre els marcadors de la zona en una mostra d'individus controls.

De l'anàlisi d'haplotips s'ha deduït que les tres variants associades a psoriasis [*HLA-Cw*6*, al·lel B del gen *POU5F1* (*POU5F1*B*) i la variant *CDSN+1243*C*] formen un haplotip de risc per a la psoriasis, amb una significació més alta que en el cas de les variants independents. Aquesta associació suggereix un efecte conjunt de les variants: funcional o si més no, per un efecte de desequilibri de lligament. Però quina és la relació entre les tres variants? I quin el risc que aporten? De la lectura de les mesures de desequilibri de lligament s'observa que en la mostra de controls, l'al·lel *HLA-Cw*6* presenta una associació important amb les variants *POU5F1*B* i *CDSN+1243*C*. En els pacients, però, el patró de desequilibri canviava; el desequilibri de *Cw*6* augmentava amb la variant *CDSN+1243*C* i disminuïa amb *POU5F1*B*. A més a més, *POU5F1*B* i *CDSN+1243*C* presenten un increment d'associació al·lèlica en el grup de pacients. Tot plegat s'ha interpretat com una associació asimètrica entre al·lèls de *CDSN*, *POU5F1* i *HLA-C* i la malaltia. Una explicació podria ser que només part dels haplotips estarien associats, i en canvi d'altres, originats per una recombinació entre *POU5F1* i *CDSN*, serien més comuns en la població control i no aportarien cap efecte de predisposició.

Aquestes dades estarien d'acord amb el fet que l'associació amb *Cw*6* augmenta en els pacients, però no amb les dades reportades recentment per Veal i col·l., que han observat un patró de desequilibri menor entre *CDSN* i *HLA*, similar en casos i controls (Veal et al. 2002). Aquest estudi, en canvi, ha identificat la regió nuclear de l'haplotip de risc en la zona centromèrica al *locus* *HLA-C*, regió en la que s'ha definit una regió crítica mínima de 10 kb (figura 24). Aquesta regió presenta un fort desequilibri de lligament amb *CDSN*, però menor amb variants de la zona *POU5F1*, la qual cosa estaria d'acord amb el que es va observar pel nostre grup, si es considera que aquesta regió mínima està molt pròxima a *HLA-C*. Possiblement en la mostra analitzada en la població espanyola aquestes regions estan en desequilibri de lligament.

Finalment, dintre de la regió candidata *PSORS1*, i inclòs en la regió telomèrica del que podríem considerar haplotip de risc de la nostra població, definit entre *HLA-C*, *POU5F1*, *CDSN*, hi mapa el gen *HCR*. *HCR* codifica per a una proteïna de funció desconeguda, que es troba sobreexpressada en les lesions de psoriasis (Asumalahti et al. 2000) i que s'ha suggerit pot estar implicada en la regulació de la diferenciació o proliferació dels queratinòcits (Asumalahti et al. 2002).

A nivell genètic, mitjançant un estudi d'associació de tipus familiar en poblacions nordeuropees, mediterrànies i confirmat en altres amb molt diferent *background* ètnic i geogràfic (índies i japoneses), es va identificar un haplotip comú associat a psoriasis en totes les poblacions estudiades (Asumalahti et al. 2002). Aquest, està format per les variants codificants Arg103Trp, Arg109Trp, Gly576Cys i Ser776Cys (anomenat haplotip *HCR*WWCC*) corresponent a les posicions 307 nt, 325 nt, 1723 nt i 2327 nt de la seqüència de cDNA. La variació de les tres primeres posicions (307, 325 i 1723), altera de forma important l'estructura de plegament d'*HCR* (Asumalahti et al. 2002). Aquest estudi, com ja es va posar de relleu en l'estudi d'associació de tipus cas-control que vam realitzar, va evidenciar l'existència d'una zona de desequilibri de lligament molt ampla en la zona *PSORS1*, a més de confirmar-ho com un efecte universal en les poblacions caucàsiques.

Quant al possible efecte de l'haplotip codificant *HCR*WWCC* observat en les nostres famílies, el fet que sigui molt freqüent a la població general no el descarta com a causant de predisposició, encara que hauria de tenir una penetració molt baixa, de forma que difícilment podria explicar l'alt risc associat al *locus* *PSORS1*. Aquest fet suggereix un comportament especial del *locus*

PSORS1, amb la presència d'altres determinants (variants al·lèliques i gèniques) en la regió. *HCR*WWCC* podria formar part d'un *cluster* de determinants lligats (amb HLA-C i *CDSN*), i la seva acció ser determinada per l'acció combinada d'un grup de *loci* molt pròxims, tal com s'ha suggerit en el cas del locus *IDDM1* de la diabetis tipus I (Lie et al. 1999). És possible que les variants presents en el *cluster* actuïn com a modificadores, es potenciïn o es combinin amb un resultat final similar. En aquest sentit malalties amb un patró d'herència mendelià clàssic com la malaltia de Hirschsprung o la síndrome de Bardet-Biedl han demostrat tenir un patró complex, de caracter digènic o fins i tot amb un efecte tri·al·lèlic (revisat a Badano i Katsanis, 2002). D'altra banda, l'existència de variants polimòrfiques intragèniques que tenen una funció patològica (o no) en funció de l'haplotip en el que es troben, s'ha observat en malalties monogèniques com la fibrosi quística (variants hipofuncionals, 5T), i també en altres d'herència complexa com l'asma, on només determinants haplotips d'*IL4RA* (gen de la cadena α del receptor de l'interleucina-4) presenten una associació, però no els SNPs de forma independent (Ober et al. 2000a).

L'estudi de Veal i col·l., on han definit les regions mínimes de risc que són transmeses amb la malaltia, ha posat de manifest que *HCR*WWCC* es troba present en tots els haplotips que presenten una sobretransmissió en els pacients, de forma que és difícil diferenciar entre l'efecte específic d'*HCR* del de la resta de determinants. D'altra banda, encara que en la majoria d'haplotips transmesos l'al·lel *HLA-C*w6* és present, un dels haplotips (denominat *cluster E*) que no presenta l'al·lel *HLA-Cw*6*, és portador de: la regió crítica mínima (10 kb) cap a 5' de HLA-C, de l'haplotip *HCR*WWCC* i de l'al·lel *CDSN+1243*C*. A més, alguns dels haplotips no transmesos són portadors de seqüències codificants de l'*HLA-C*. Tot plegat confirmant que l'al·lel *HLA-Cw*6* no és *per se* la causa de predisposició, encara la presència de la regió crítica en la regió cap a 5', pot implicar variacions en l'expressió d'aquest antígen de classe I. Aquestes resultats reforcen la idea que la variant telomèrica (*CDSN+1243*C*) comporta un risc. L'associació observada en diversos estudis de les variants de *CDSN* amb psoriasi i atribuïda a un fenomen de LD amb *HLA-Cw*6* (Allen et al. 1999; Jenisch et al. 1999; Tazi Ahnini et al. 1999; Enerback et al. 2000), potser no sempre és correcta, apuntant a una possible funció de les variants de la corneodesmosina, o bé d'un locus en LD amb *CDSN*, diferent de *HLA-Cw*6*.

Corol·lari

El fet que de forma consistent es repliqui el locus *PSORS1* en poblacions d'origen ètnic molt divers és indicatiu d'un paper com a gen major. Segurament en cada població el gen o locus secundari sigui diferent explicant l'heterogeneïtat genètica que s'evidencia en els nombrosos estudis reportats. La putativa "mutació" a *PSORS1* podria representar una variant molt més antiga que les presents en altres *loci*, i comú a la majoria de les poblacions, si més no en les poblacions caucàsiques, ja que de forma més repetida ha estat implicat el locus 6p21. Això podria tenir sentit donada la localització de la regió candidata en la zona de l'HLA, una regió portadora d'un haplotip molt conservat.

La presència d'un locus major a *PSORS1* i d'altres secundaris (com el putatiu locus evidenciat en aquest estudi a 4q35) podria explicar les diferències en la prevalença observada en diferents poblacions, però no pot explicar el diferent risc associat a l'al·lel *Cw*6* reportat en diferents poblacions (Mallon et al. 1999), a no ser que els determinants de risc en LD, centromèrics (Veal et al. 2002) o telomèrics (Nair et al. 2000) al locus *HLA-C*, en siguin la causa. Una altra explicació plausible és que dintre de la regió crítica existeixi més d'un gen de predisposició, sent la combinació d'aquests l'origen de la malaltia. Recentment s'ha posat de manifest l'herència digènica de la resistència severa a la insulina (Savage et al. 2002), on una herència en principi dominant amb baixa penetració ha resultat ser causada per la combinació de mutacions en dos gens diferents. Encara que l'estratègia dels haplotips és molt més potent que l'estudi individual de les variants, és difícil, mitjançant reducció a la regió mínima compartida, determinar quina és la regió de risc que porta la mutació. En alguns casos, aquesta aproximació ha conduït a resultats tant sorprenents i decebedors com el que reportaren Nair i col·l., (Nair et al. 2000), on s'ha arribat a determinar una regió que no conté cap gen, si bé és cert que no es pot descartar que elements reguladors no mapats puguin estar implicats.

Els al·lells HLA-C com ja s'ha esmentat, no semblen ser la causa directa de la malaltia en la psoriasi, a diferència d'altres malalties relacionades amb els antigens de MHC, com l'espondilitis anquilosant (MIM:1063000) (HLA-B27), la malaltia de Behçet (MIM:109650) (HLA-B51), on totes les evidències apunten a la implicació directa dels al·lells HLA. Així, variants de la zona codificant de l'al·lel com l'Ala73 (Ashaina, 1991) localitzades en un domini "butxaca" de reconeixement d'antigen, només ha estat associat en algunes poblacions, però no es troba únicament a *HLA-Cw*6* sinó a altres al·lells com *Cw*7*, per la qual cosa pot

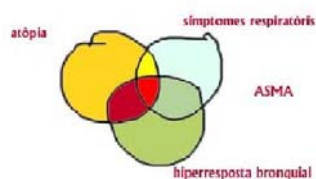
ser més un efecte degut a LD i no és probable que en sigui la causa. Una curiositat que fa pensar que HLA-C no és l'únic determinant i que altres haplotips no portadors d'*HLA-C* han d'estar implicats és el fet que l'herència que s'ha demostrat en la regió és recessiva, igual que en el treball de Nair i col·l., (Nair et al. 1997), i en canvi la majoria de pacients són heterozigots per l'al·lel Cw*6.

En l'estudi d'associació que s'ha realitzat amb casos i controls, la confirmació dels resultats observats en el lligament i el fet d'evidenciar una associació per una banda amb Cw*6 i d'altra banda amb l'haplotip *HLA-C/POU5F1/CDSN*, posa de manifest la suficient potència de la mostra per detectar una associació positiva. Les evidències prèvies en la nostra població (lligament) i en els estudis publicats per altres grups indiquen la presència d'un gen de predisposició en aquesta regió, la qual cosa podria fer pensar en obviar les correccions per múltiples tests ja que les evidències en la nostra mostra i les evidències en altres estudis, fan que la probabilitat d'associació augmenti, però quan s'aplica la correcció estadística l'associació segueix essent significativa després de corregir pel número de gens i al·lells testats. D'altra banda, es pot argumentar que la població control no està estrictament formada per individus sans sinó per població general (amb una prevalença de l'1,3%), però aquest fet, en el cas d'una troballa positiva no és negatiu, doncs la presència de genocòpies en la població control (encara que amb una freqüència molt baixa) juga en contra de l'associació. Evidentment, en els casos de resultats negatius o amb significacions *bordeliners*, la presència de genocòpies obscureix els resultats, de forma que seria necessària una anàlisi d'una mostra més àmplia.

Per concloure, una de les reflexions més clares que han eixit de l'anàlisi de la regió *PSORS1* és que les tècniques d'anàlisi genètica han arribat gairebé al límit de la seva potència, tant en el mapatge per lligament com en el de la localització fina per LD. La identificació de gen o de la combinació dels gens del *locus* haurà de venir de l'estudi directe de la funcionalitat dels gens de la zona. Un cas interessant és el de *CDSN*, un gen que en repetits estudis de refinament de la zona, o bé ha estat exclòs o bé no ha estat replicat en altres estudis, però que donat el patró d'expressió específica en la pell, i la seva funció en la diferenciació de l'epidermis no deixa d'estar en la diana de molts investigadors que el consideren un dels millors candidats de la zona. Encara que estudis funcionals de la proteïna han demostrat l'expressió alterada en psoriasi (Allen et al. 2001), no es coneix l'efecte *in vitro* de les variants o haplotips associats, però

s'ha de tenir en compte les limitacions de la detecció, amb pocs anticossos, i que no reconeixen zones potencialment implicades en la proteòlisi de la molècula durant el procés de descamació.

D'altra banda, el fet que *HCR* es sobreexpressi a les lesions de psoriasi però no l'expressió augmentada en la pell no afectada de pacients, pot ser atribuït a un efecte indirecte de l'estat de proliferació dels queratinòcits en la lesió. Junt amb la caracterització funcional de les variants de *CDSN*, la determinació de la funció d'*HCR* pot portar a l'establiment d'un patró d'acció del locus *PSORS1*. Tanmateix seria interessant la caracterització de les zones reguladores dels gens.



Els nivells sèrics d'IgEs han estat correlacionats amb l'HRB i amb l'asma en diferents estudis, i de forma general l'HRB i els fenotips atòpics han estat utilitzats per a identificar amb èxit regions del genoma que contenen gens de predisposició a la patogènesi de l'asma. L'asma és probablement un punt final de l'acció de múltiples gens i factors ambientals, mentre que els fenotips intermedis poden ser deguts a l'acció d'un número limitat de gens. En aquest capítol, sense deixar mai de considerar el fenotip global d'asma, s'ha estructurat la discussió dels resultats en funció dels fenotips associats.

La unió de l'IL4 al receptor IL4R induïx el canvi d'isotip en les cèl·lules B i producció d'IgEs. La producció d'IgEs i la unió al receptor de les cèl·lules diana desencadena el procés al·lèrgic, fenomen exacerbada en l'individu atòpic. El receptor de l'IL4 (IL4R), format per una cadena γ (IL2RG), comuna amb altres citocines, i una cadena d'alta afinitat (IL4RA), a la vegada compartida pel receptor dimèric de l'IL-13, es converteix en un nexa comú a diferents vies que fa que esdevingui un candidat interessant de predisposició a l'asma i a l'atòpia.

Receptor d'IL4 i nivells d'IgEs

El nostre grup ha observat que les variants A375, R406, P478 i R551, en dominància, s'associen a unes concentracions d'IgEs més elevades que els genotips homozigots per la variant més comuna. Aquests resultats, però, són diferents als que han observat Howard i col·l., que han associat E375, C406 i S478 amb unes concentracions més elevades d'IgEs amb un efecte recessiu (Howard et al. 2002). Una explicació d'aquestes diferències podria ser atribuïda a diferències ètniques, ja que com s'ha reportat no totes les poblacions presenten associat el mateix haplotip (Ober et al. 2000a). De forma alternativa, poden ser atribuïdes al fenotip "asmàtic" dels pacients analitzats. En el nostre cas l'associació es va observar en els individus asmàtics no atòpics i amb uns nivells sèrics d'IgEs baixos, mentre que els individus analitzats per Howard i col·l. presentaven nivells sèrics d'IgEs elevats i eren la majoria atòpics. A més, en la seva població és present un efecte de la variant de l'IL-13, i una interacció amb variants d'IL4RA (Howard et al. 2001), de manera que és possible que aquesta mostra no reflecteixi la contribució més fisiològica de les variants de IL4RA als nivells sèrics basals d'IgEs. D'altra banda, en la mostra analitzada pel nostre equip es va observar que, en el grup de pacients amb atòpia i en els individus

al·lèrgics amb nivells elevats d'IgEs, les concentracions associades als portadors d'alguna de les variants A375, R406, P478 eren lleugerament inferiors, encara que sense diferències estadísticament significatives. Aquestes discrepàncies suggereixen la presència d'altres interaccions gèniques en la generació de l'atòpia.

S'ha observat que les set variants de l'exó 12 presentaven un fort desequilibri de lligament, de manera que l'anàlisi d'haplotips aporta una significació més funcional a l'associació amb el fenotip. El nostre grup va observar que només l'haplotip format per les variants 375A-406R-411S-478P-551R-554V (*ARSPRV*) s'associava amb l'asma atòpic. Tanmateix, encara que de forma no significativa, aquest haplotip juntament amb *ECSSRV* eren més freqüents en els individus al·lèrgics que presentaven nivells d'IgEs superiors a 100UI/ml, que en els individus controls no al·lèrgics. Quatre de les sis variants incloses en l'haplotip *ARSPRV* (375A, 406R, 478P, 551R) s'associaven de forma individual amb nivells elevats d'IgEs sèriques, mentre que només 551R és present en *ECSSRV*. Aquestes observacions apuntaven a un efecte pleotròpic de la IL4RA en la regulació dels fenotips "asmàtics".

A la literatura existeix una gran variabilitat en els resultats d'estudis d'associació realitzats amb les variants d'IL4RA (Hershey et al. 1997; Mitsuyasu et al. 1998; Kruse et al. 1999; Mitsuyasu et al. 1999). En alguns casos amb resultats contradictoris, però que poden ser explicats per la manca d'anàlisi dels haplotips complets de la regió. En diferents grups ètnics existeix una associació amb asma o atòpia amb al·lèls d'IL4RA, però que difereixen en els haplotips associats (Ober et al. 2000a), suggerint-se que la predisposició, més que a un polimorfisme aïllat, és deguda a una combinació de variants, o haplotips funcionals (Risma et al. 2002).

En la mostra analitzada pel nostre grup la variant R551 presentava associats uns nivells elevats d'IgEs, a més, la variant formava part tant de l'haplotip

associat amb asma atòpic com dels dos haplotips més freqüents en els individus al·lèrgics. Això suggeriria un paper important en relació amb el fenotip atòpic (IgEs o +SPT). Estudis funcionals han demostrat que R551 produeix un guany de funció del receptor, amb una expressió elevada de FCER2 (CD23) i d'IgEs (Hershey et al. 1997). D'altra banda, la presència de variants distintes en els haplotips més freqüents en els pacients amb asma atòpic i en els pacients al·lèrgics indicava que no havia un efecte independent de la variant sinó que seria dependent d'haplotip. Experiments *in vitro* han demostrat que només certes combinacions de variants presenten una major sensibilitat a l'efecte de l'IL4. Així, s'ha descrit que la variant R551 només en combinació amb V50 presenta una major activació (Risma et al. 2002). En aquest sentit, malgrat que en la nostra mostra la presència *per se* d'I50 o V50 sembla ser independent dels nivells sèrics de les IgEs, s'ha observat en canvi una major freqüència de la variant I50 entre els individus al·lèrgics amb nivells d'IgEs molt elevats (superiors a 400UI/ml) en concordança amb l'estudi de Mitsuyasu i col·l. (1999), però no amb les dades presentades per Hershey i col·l. (2002). És possible que aquesta diferent funcionalitat depengui de les variants associades: en el grup d'al·lèrgics la variant I50 està associada a l'haplotip *ECSSRV*, mentre que en el grup d'asmàtics s'associa a *ARSPRV*.

Asma i atòpia (tests +SPT) presenten una elevada correlació, però s'ha hipotetitzat que presenten diferents etiologies moleculars. Donat l'alt grau de polimorfisme funcional dintre de la cadena d'IL4 α (zones d'unió a Jak, Irs, Stat6, Shp), és possible que diverses combinacions afectin de forma diferent a la funció o la interacció amb els seus lligands naturals: IL4 i IL13. Aquestes dues citocines tenen funcions diferents encara que solapants en el desenvolupament de l'asma. IL13 pot actuar de forma independent, i està relacionada amb la secreció mucosa i un increment de l'HRB (Webb et al. 2000; Foster et al. 2001; Mattes et al. 2002). Un estudi funcional *in vitro* que inclogui totes les variants, i no només la I50V i R551Q, dels distints haplotips associats amb asma o al·lèrgia posaria de manifest l'efecte pleotròpic del receptor d'IL4.

En aquest sentit s'ha de tenir en compte les variants S478P i S411L. Les dues presenten un desequilibri parcial amb les altres variants. S478P és troba prop dels dominis IRS, implicats en la transmissió de senyals proliferatives i antiapoptòtiques, a més ha estat implicada funcionalment en la regulació dels nivells d'IgEs (Kruse et al. 1999), i s'ha hipotetitzat un paper protector (conjuntament amb 411L) envers l'al·lèrgia (Kauuppi et al. 2001). L'absència de 411L en els al·lèrgics però no en els asmàtics (amb una freqüència

similar que els controls), i la presència de S478 en l'haplotip present en els pacients al·lèrgics, *ECSSRV*, apunta a una funció per a aquestes dues variants.

En vista dels resultats observats pel nostre grup i dels reportats en altres estudis (Hershey et al. 1997; (Ober et al. 2000a); (Howard et al. 2002) (Risma et al. 2002) sembla evident un paper del receptor d'IL4 en la regulació dels nivells d'IgEs, encara que no es pot descartar que una variant en desequilibri de lligament, dintre o fora de la regió codificant, o un efecte epigenètic puguin estar implicats. En aquest sentit enzims modificadors a nivell postranscripcional poden ser una nova diana en la cerca de gens candidats, afegint un grau més en la complexitat de l'anàlisi de les malalties comunes. Com a exemple, *AICDA* (LocusID:57379), un gen que codifica per a una deaminasa, ha estat associat a una immunopatologia caracteritzada per l'absència d'IgA, IgGs i IgEs, mitjançant processos d'*editing* que afecten al canvi de classe (Revy et al. 2000).

Regulació dels nivells d'IgEs

La regulació dels nivells d'IgEs és important ja que aquestes participen en la generació de les reaccions d'hipersensibilitat, per la unió als receptors d'IgEs (FCER1 i FCER2) presents a les cèl·lules efectores (mastòcits, basòfils, eosinòfils). A més mitjançant la interacció amb els receptors presents en altres tipus cel·lulars ajuden al manteniment de l'estat d'activació continuada del sistema immune amb nivells molt baixos de substàncies al·lèrgiques, modulant la capacitat presentadora de les APC, o de la presentació mitjançant IgEs.

FCER1 i FCER2

L'anàlisi de *FCER2* es va fer mitjançant un estudi de tipus cas-control amb marcadors microsatèl·lits de la regió 19p13.3. Aquesta anàlisi va evidenciar dos al·lels que presentaven una associació nominal amb asma i atòpia, en la posició *D19S922* i *D19S884*.

L'anàlisi es va realitzar com un estudi de rèplica d'una mostra de la població fina. L'al·lel *D19S922* D*3 presentava associació amb un risc de desenvolupar asma en les dues poblacions analitzades, amb un risc major en la població espanyola que la fina (Laitinen et al. 2000). Els resultats que es van observar en la mostra estudiada

pel nostre equip no van ser significatius després de les correccions per múltiples al·lels testats, però no deixava de ser curiós que el mateix al·lel pogués comportar un risc similar en ambdues poblacions. Una explicació difícil de creure era l'existència de zones molt llargues de desequilibri de lligament, conservades entre la població fina i l'espanyola de forma que poguessin suportar la idea del lligament amb *FCER2* com a gen candidat, i els al·lels dels marcadors *DI9S922* i *DI9S884*. D'altra banda, l'estudi de triatge mutacional que es va fer en la regió codificant de *FCER2* en els haplotips de risc en la població fina, no va identificar cap variant (Laitinen et al. 2000).

A nivell de fenotip les dues poblacions estudiades eren similars quant al diagnòstic d'asma i a l'edat dels pacients, però provenien d'un *background* genètic i ambiental absolutament diferent. La població fina, de la regió Kainuu en el nord-est de Finlàndia, ha sofert una expansió ràpida a partir de pocs fundadors, i presenta una variabilitat dels haplotips reduïda i molt conservada. Aquestes poblacions preserven regions fins de 12 cM en desequilibri (Kere 2001), en canvi en la població espanyola de la regió nord-est d'Espanya, amb unes característiques poblacionals diferents, és de suposar que els haplotips presents tinguin una conservació reduïda a la vegada que siguin poc freqüents. Així doncs, és possible que *FCER2* no sigui el candidat identificat per l'haplotip de risc fins i altres gens a la zona han de ser els causants de la predisposició. En aquest sentit, la localització d'una zona amb associació nominal que s'ha evidenciat en la mostra analitzada pel nostre equip entre els marcadors *DI9S922* i *DI9S884*, separats per 13 kb, pot indicar realment un locus de predisposició.

En aquesta zona mapa el gen *SCYA25* (acrònim de l'anglès, *small inducible cytokine subfamily A* (Cys-Cys), member 25) (LocusID:6370), un membre de la família de les CC-quimocines que s'expressa durant el desenvolupament del timus, i que pot estar implicat en el desenvolupament de la població de cèl·lules T (Vicari, 1997). *SCYA25* té una activitat quimiotàctica per als timòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques, i juntament amb el seu receptor (CCR9) s'ha implicat en funcions de regulació i especialització de la resposta a nivells de les mucoses (Papadakis et al. 2000).

Quant al receptor d'alta afinitat, FCER1, l'anàlisi amb un sol marcador microsatèl·lit intern del gen de la cadena beta, *FCER1B*, no va demostrar una freqüència alterada amb el fenotip asma ni en cap dels grups analitzats (Soriano et al. 2000). Amb una anàlisi similar, en una població de les Illes Canàries tampoc es va demostrar una associació amb asma bronquial en

individus sensibilitzats per àcars (Torres-Galvan et al. 2001).

L'estudi de les variants Ile181Leu i Glu27Gly del *FCER1B*, tampoc va reportar cap associació. La variant Ile181Leu associada amb asma en altres poblacions (Shirakawa et al. 1994b; Hill et al. 1995) no és polimòrfica en la nostra població. Altres estudis han fallat en la replicació de les dades originals (Duffy et al. 1995) suggerint possibles problemes derivats de l'heterogeneïtat genètica present entre poblacions (Hizawa et al. 1995), així com la consideració que la identificació de la variant Leu pot estar sotmesa a problemes artefactuals de la tècnica de detecció per ARMS (Hill et al. 1995).

Referent a l'altra variant analitzada; Gly237 presentava una freqüència incrementada en pacients amb asma, com ha estat reportat en altres poblacions, amb una freqüència superior a la detectada en els estudis anteriors realitzats (Hill i Cookson 1996; Shirakawa et al. 1996a), però sense cap diferència significativa entre asma o els fenotips associats. En aquests dos estudis l'associació s'ha demostrat amb asma infantil i amb la regulació dels nivells molt elevats d'IgEs (>1000UI/ml) respectivament, de forma que la manca de replicació en el nostre estudi pot estar relacionada amb el fenotip dels nostres pacients: una mitjana d'edat de 58 anys, una edat d'aparició adulta, uns nivells mitjans d'IgEs no molt elevats (147UI/ml) i només amb el 47% dels individus amb atòpia. En el nostre estudi tampoc es va observar una associació de cap de les variants estudiades amb l'HRB en la mostra de pacients adults, com ha estat reportat en altres estudis de forma independent a l'atòpia (van Herwerden et al. 1995).

Tot i així, el resultat negatiu de l'anàlisi del receptor d'IgEs no descarta que la regió 11q sigui portadora d'un gen de predisposició a asma. Estudis recents que demostren una regulació de l'expressió davant de l'exposició a diferents espècies d'àcars (Van Hage-Hamsten et al. 2002) avalen que *FCER1B* té un paper en el fenotip atòpic. En qualsevol cas, sembla poc probable que *FCER1B* estigui implicat en el desenvolupament de l'HRB en la mostra analitzada, però pel que fa a l'atòpia, és possible que el fet de no haver pogut definir les relacions parentals hagi disminuït la potència de l'estudi (Moffatt et al. 1992). En aquest sentit l'associació amb el cromosoma 11 ha estat reportada per diferents grups que a la vegada han identificat un efecte matern en l'herència (Shirakawa et al. 1994b; Hill et al. 1995; Moffatt i Cookson 1998).

ADRB2

Un dels factors que influeix en la concentració dels nivells d'IgEs en el sèrum és l'expressió d'ADRB2, encara que amb un efecte diferent en la població adulta i en la infantil. En la mostra infantil la variant Arg16 s'associava a nivells elevats d'IgEs (concentracions >200UI/ml), mentre que en la població adulta la variant Gly16 s'associava amb HRB en pacients asmàtics.

L'associació de Gly16 amb l'HRB en la mostra d'individus amb asma adult es va mantenir després de l'ajustament mitjançant regressió logística per l'edat, de forma que es pot pensar que no està associada amb altres formes d'HRB inespecífica lligades a l'edat com la MPOC. A més, el percentatge de pacients amb bronquitis crònica en la mostra d'asma adult és molt baix. Altres estudis realitzats en població asmàtica (Hall et al. 1995) o en població general (D'Amato et al. 1998), han demostrat que la variant Gly16 predispone al desenvolupament d'HRB, la qual cosa, juntament amb el fet que la variant no sigui més freqüent en els pacients, i que sigui molt freqüent en la població general, suggereix que principalment és una causa de variabilitat entre els individus més que una causa major d'asma. Alternativament, és possible que com s'ha vist en el cas d'*IL4RA*, una combinació de variants siguin més importants en determinar les relacions genotip-fenotip, que els SNPs individuals. En aquest sentit però, un estudi alemany ha proposat un efecte oposat de l'haplotip Gly16/Gln27/Thr164 (Ulbrecht et al. 2000). És probable que aquestes diferències siguin produïdes per un efecte combinatori de les variants, però també és possible que en ser realitzat en una mostra de la població general, els resultats no contemplin les possibles interaccions presents en la mostra de pacients amb asma.

En els pacients infantils l'absència d'associació amb l'HRB pot indicar que en edat infantil la predisposició a HRB no està influïda pel sistema ADRB-agonista, tenint un efecte només en una edat més avançada. De tota manera s'ha de tenir en compte que la mesura de l'HRB no va ser realitzada de la mateixa forma que en els adults, i per tant els resultats no són comparables. Malgrat tot, no es pot descartar un efecte de la variant Gly16 en la població infantil, i la manca d'associació podia ser deguda a baixa potència de la mostra per detectar l'efecte en l'HRB o la manca d'una mostra de controls adequada.

A més d'afectar a l'aparició d'HRB en adults, es va observar que la variant Arg16 s'associava amb la presència de nivells elevats d'IgEs en la mostra infantil. Aquesta associació no ha estat reportada anteriorment, però una associació entre la variant Gln27 amb nivells elevats d'IgEs, en nens amb una història d'asma, havia estat observada prèviament (Dewar et al. 1997). Altres

grups han posat de manifest la relació entre la variant a la posició 27 amb un risc d'asma; ja sigui incrementant-lo en el cas dels portadors de Gln27 (Hopes et al. 1998) o bé disminuint-lo per als portadors de Glu27 (Martinez et al. 1997). En el nostre estudi, degut a problemes tècnics en la determinació de la variant Gln27Glu, no s'ha pogut estudiar la distribució d'aquesta variant. Malgrat tot, el fet demostrat que com en altres poblacions, les variants Arg16 i Gln27 presentin una forta associació en poblacions hispanes (Martinez et al. 1997), juntament amb l'evidència que l'haplotip Arg16/Glu27 és força rar en les poblacions caucàsiques (Lipworth et al. 2002), indica que l'augment observat de l'al·lel Arg16 pot ser degut al desequilibri de lligament amb Gln27. En l'estudi d'Hopes i col·l., on s'observa una associació d'asma infantil amb Gln27 (Hopes et al. 1998), la població presentava una mitjana d'edat comparable a la de la mostra analitzada pel nostre grup, i encara que en el seu estudi s'associa amb asma diagnosticada, els efectes de la variant estan relacionats amb nivells elevats d'IgEs, tal i com es descriu en un treball anterior del grup (Dewar et al. 1997).

L'estimulació d'ADRB2 regula el to muscular de les vies aèries, la qual cosa evidentment el converteix en un candidat per a l'HRB, però com pot afectar això a l'establiment d'un fenotip atòpic?. Funcionalment existeix un lligam entre la senyalització d'ADRB2 i l'atòpia. S'ha observat que el sistema agonista-ADRB2 té un efecte regulador sobre l'expressió d'IL-4, i un efecte negatiu sobre IFN- γ (Mohede et al. 1996). A més s'ha descrit que la modulació del microambient en la maduració de les cèl·lules limfoides és la que determina l'estirp funcional de les cèl·lules T (Avni i Rao 2000). Tanmateix, encara que només s'ha demostrat a nivell de les cèl·lules T presents en el cordó umbilical, el sistema adrenoceptor actua sobre les cèl·lules T predisposant cap a una l'estirp funcional Th2 (Huang et al. 2001). D'altra banda, la variant Arg16 està present en haplotips que presenten una resistència molt gran a la *downregulació* per agonista (Green et al. 1994), la qual cosa pot estar produint un excés d'activació del receptor en aquests pacients. A part, altres canvis descrits en la regió promotora (Scott et al. 1999b), poden alterar l'expressió del receptor en cèl·lules perifèriques (Lipworth et al. 2002), encara que aquests canvis no semblen alterar la funció en sistemes *in vitro* (Scott et al. 1999a).

Finalment, respecte el paper de les variants d'ADRB2, el fet que s'hagin detectat diferències dintre del grup de pacients però no respecte a la població control analitzada, posa de manifest la poca idoneïtat de la mostra de controls, principalment en el cas de l'anàlisi

de dos fenotips com l'HRB i l'atòpia, que tenen una prevalença molt elevada a la població general. D'altra banda, és interessant destacar les diferències que es van observar entre les dues mostres de pacients. L'efecte d'ADRB2 durant els primers anys pot incidir en el risc de desenvolupar una manifestació al·lèrgica en edat infantil, i amb un posterior risc incrementat de desenvolupar asma, però no en les formes adultes de l'asma. En canvi, en les formes adultes pot estar associat amb la regulació del to muscular i el desencadenament de l'HRB associat amb l'asma. En el cas dels pacients adults amb asma s'ha estimat que el 50% dels casos són d'aparició en edat adulta (Bodner et al. 1997), amb una proporció de 30-50% d'origen atòpic, de manera que encara que d'una forma més reduïda, es podria posar de manifest el mateix efecte que l'observat en els individus infantils. Així doncs, és possible que les diferències observades respecte a l'efecte de les variants d'ADRB2 expressin un efecte pleotròpic en l'etiologia de l'asma, ja que el grup analitzat de pacients d'asma en adults té una edat d'aparició molt tardana, de manera que representa un grup d'aparició tardana al 100%, amb una baix component atòpic.

Eosinofília i CD14

L'exposició a productes bacterians influeix en la sensibilització al·lèrgica (von Mutius et al. 2000), de forma que factors genètics que modulen la seva acció poden estar implicats en el desenvolupament de l'asma o l'atòpia. CD14 és un receptor de *PAMPs* (de l'anglès *pathogen-associated molecular patterns*) expressat en cèl·lules mieloides i que actua com a mediador de la immunitat innata, produint l'alliberació de citocines proinflamàtores. L'activació de CD14 té un efecte oposat depenent del moment que es produeix la sensibilització al·lèrgica. En les cèl·lules T no primades (Th_0), l'estimulació de la via CD14-LPS produeix un increment de l'IL-12 i IL-18 amb una promoció de la resposta de tipus Th_1 , mentre que en les cèl·lules madures reforça la resposta inflamatòria de tipus Th_2 .

No hi ha estudis específics funcionals d'expressió de les variants de CD14, però s'ha observat que tant la forma soluble (sCD14) com la forma de membrana (CD14) s'expressen amb nivells més elevats en pacients amb asma que en controls (Alexis et al. 2001); nivells elevats de sCD14 es correlacionen amb una variant de la zona del promotor (CD14-159C). Aquesta variant està localitzada prop d'una zona d'activació de la

transcripció, en una posició d'unió a diversos factors de transcripció (SP1, Ap-2), la qual cosa indica la potencialitat funcional de la variant (LeVan et al. 2001).

El nostre equip ha estudiat dos grups d'individus asmàtics: en el grup d'asma infantil els individus atòpics representen el 100%, mentre que en el grup d'asma adult només representa la meitat (47%).

Els pacients infantils amb *atòpia2* presenten una freqüència augmentada de l'al·lel *CD14-159*T*. A més, l'al·lel -159T és més freqüent entre els individus amb eosinofília. D'altra banda, el fet que no s'observés una associació amb els nivells d'IgEs suggereix que l'associació amb el fenotip *atòpia2* es deu al pes majoritari d'eosinofília en la definició del fenotip *atòpia2*.

El sistema d'activació per CD14 s'ha implicat en la modulació dels nivells d'IgEs en poblacions infantils i adultes (Baldini et al. 1999; Koppelman et al. 2001), però segons els resultats observats en la mostra analitzada, també estaria regulant l'eosinofília perifèrica d'una forma independent als nivells sèrics d'IgEs. Aquestes dades no estan en principi d'acord amb treballs realitzats en altres poblacions on es reportava que l'al·lel T era protectort i s'associava a fenotips no atòpics, amb nivells baixos d'IgEs o amb un menor nombre de respostes SPT positives (Baldini et al. 1999; Gao et al. 1999; Koppelman et al. 2001; Vercelli et al. 2001). L'associació negativa observada en el nostre estudi amb els nivells sèrics baixos d'IgEs no és sorprenent, i en altres estudis tampoc no han observat una significació important de la variant CD14-159*T amb les IgEs en individus que presentaven una *RAST* positiu (Gao et al. 1999), fet que ha estat atribuït com una prova que *CD14* no és un *locus* d'atòpia (Gao et al. 1999). Aquest estudi, però, no va incloure una mesura d'eosinofília perifèrica, de forma que no descarten una implicació de CD14 en l'atòpia, a través de la regulació dels nivells d'eosinòfils circulants.

Baldini i col·l., han proposat una heterogeneïtat ètnica dels determinants genètics de l'atòpia; en els individus d'origen hispà no es va associar la variant de CD14 amb els nivells d'IgEs (Baldini et al. 1999). Una susceptibilitat ètnica diferent ja ha estat demostrada en estudis de cerca global de genoma (CSGA 1997). És possible que com en aquests estudis, CD14 no estigui relacionat amb l'asma o l'atòpia en la població espanyola. En aquest sentit l'estudi previ d'associació que es va realitzar amb marcadors microsatèl·lits de la regió 5q (presentat a la pàg.112) va fallar en demostrar associació amb atòpia, encara que en aquell estudi no es

van incloure mesures sobre eosinofília. L'anàlisi de sis microsatèl·lits a la regió 5q, no va evidenciar després de correcció per múltiples al·lells, una significació important, només els al·lells de *D5S658* i *D5S414* presentaven una major freqüència en els pacients amb asma respecte als controls (Soriano et al. 2000).

Els marcadors *D5S658* i *D5S414* es troben situats a la part telomèrica del *cluster* 5q, on mapen els gens *CD14* i *ADRB2* (figura 25). *D5S658* està situat a una distància de 0,5 Mb entre *CD14* i d'*ADRB2*. És possible que existeixi una regió en desequilibri de lligament que abracci els dos gens o bé, de forma més probable que diferents haplotips comparteixin les regions intergèniques. El *locus* d'atòpia que s'ha mapat en aquesta regió s'ha localitzat en la regió més centromèrica (Noguchi et al. 1998b), però altres estudis han situat en la regió telomèrica zones de lligament amb fenotips associats amb asma: un *locus* associat a HRB en un estudi en famílies amb asma (Postma et al. 1995) i d'altra banda, un lligament amb nivells elevats d'eosinòfils circulants un estudi de lligament en població infantil (Martinez et al. 1998). Aquest *locus* regulador dels nivells d'eosinòfils es va detectar just amb el marcador *D5S658*. L'eosinofília en nens es correlaciona amb l'asma crònic de forma independent de l'atòpia (Karakoc et al. 2002). Un segon estudi, ha detectat en aquesta regió al voltant de *D5S658*, un determinant gènic lligat amb la intensitat de la infecció pel paràsit *Schistosoma mansoni* (Marquet et al. 1996). Curiosament una elevada eosinofília ha estat associada a una major resistència a la infecció pel trematode *S. mansoni* (Sturrock et al. 1983). L'associació observada en l'estudi realitzat pel nostre equip d'una variant funcional de *CD14* amb eosinofília perifèrica en nens, apuntava a aquest *locus* com a causant de la susceptibilitat a la infecció a *S. mansoni*. D'altra banda, variants d'*ADRB2* poden explicar també la intensitat de la infecció observada a *S.mansoni*, ja que poden estar relacionades amb la modulació dels nivells d'IgEs, afectant d'aquesta forma la intensitat de la infecció. En aquest sentit, en una població infantil de Veneçuela amb una infecció endèmica per cucs (helminiasi) s'ha descrit que Gly16 confereix resistència a la infecció parasitària (Ramsay et al. 1999b).

Els resultats d'associació obtinguts en aquesta regió en principi demostren l'associació amb els fenotips d'asma, associació que desapareix en ser corregida pels múltiples al·lells. Evidentment una correcció d'aquesta mida requereix que l'efecte del canvi sigui molt fort o bé unes mides mostrals difícils d'assolir per tal de detectar-lo (Risch i Merikangas 1996). Els resultats presentats pel nostre equip en l'anàlisi individual de dos gens de la regió 5q (*CD14* i *ADRB2*) posen de manifest que les correccions efectuades en l'anàlisi de microsatèl·lits

poden ser excessives, fent aparèixer falsos negatius a la regió.

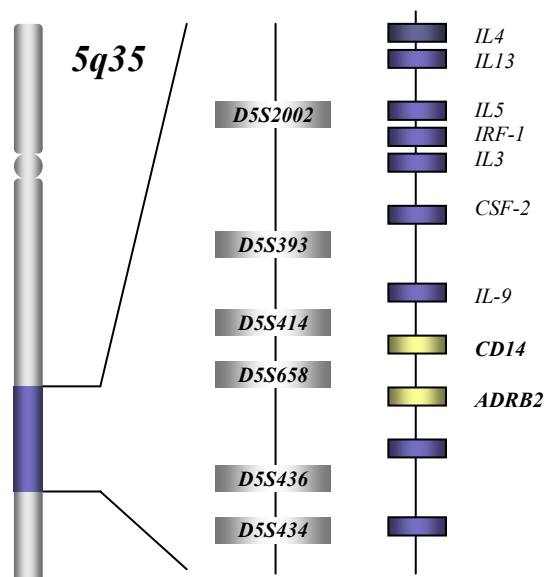


Figura 25

Esquema de la regió 5q31. Cluster 5q dels gens candidats. A la part dreta està representada la localització aproximada dels principals gens que mapen a la regió així com la localització dels marcadors microsatèl·lits (URL: Marshfield) estudiats en aquesta mostra.

Quant a l'eosinofília associada, aquesta ha estat descrita com un marcador de severitat en asma infantil, en termes de símptomes respiratoris, funció pulmonar, necessitat de medicació i resposta a histamina (Hughes et al. 2001). En general, els individus que desenvolupen asma en edat adolescent presenten nivells elevats d'IgEs i una acusada eosinofília en edat infantil (Martinez 1999). De manera coincident tots els pacients sense eosinofília (8%) són portadors en homozigosi de l'al·lel -159C. D'altra banda, en el nostre estudi els nens asmàtics portadors l'al·lel *CD14*-159T presenten un inici més primerenc de la malaltia. Un inici primerenc (i perduració dels símptomes) ha estat establert com a pronòstic de l'evolució de l'asma en l'adolescència, la qual cosa suggereix un risc més elevat pel desenvolupament de l'estat al·lèrgic i un pronòstic més greu en els individus *CD14*-159T, però no mitjançant la modulació de la resposta de les IgEs.

El grau d'eosinofília present en els individus pot estar relacionat funcionalment amb l'expressió de *CD14* de formes diferents: (1) degut a una elevada producció d'eosinòfils, per activació de les cèl·lules Th2 i producció

de citocines Il-4, Il-13, Il-5 i Il-9, o (2) degut a una major supervivència d'aquestes cèl·lules. Experiments amb cultius d'eosinòfils recolzen aquesta segona hipòtesi i han demostrat que CD14 és essencial per a la supervivència dels eosinòfils (induïda per LPS) (Meerschaert et al. 2000). Tanmateix, es desconeix si es veu afectada la població en sang o la resident en teixits.

No es van estudiar haplotips funcionals, però és possible que CD14-159 i CD14+1433 formin part d'un haplotip funcional, de la mateixa manera que els haplotips descrits per Vercelli i col·l (Vercelli et al. 2001). S'ha observat que *CD14+1433* presenta en els controls un desequilibri de lligament amb *CD14+159* ($D'=0,81$) i pràcticament total en els pacients, amb una fase *CD14-159T-CD14+1433G*. L'anàlisi per TDT de les variants en les 19 famílies amb asma atòpic, va demostrar una sobretransmissió (7/0) de l'al·lel *CD14+1433G*, però en canvi amb el TDT2 no s'ha observat cap haplotip transmès de forma preferent.

CD14 en adults Hipòtesi de l'higiene

Finalment, referent a la funció de CD14 en l'asma, les característiques de la mostra d'asma adult que es va recollir va permetre investigar sobre la Hipòtesi de la Higiene. Aquesta és una de les idees més atractives sobre l'etiologia de l'asma, i reactivada en els darrers anys, que vol explicar la relació inversa entre el descens de les infeccions infantils i l'augment de l'asma i les al·lèrgies a nivell mundial. La teoria afirma que una manca de maduració de les respostes de tipus Th2 a Th1 en el sistema immune infantil és deguda a una estimulació microbiana menor en les societats occidentals.

Donat el paper de CD14 en la regulació del reconeixement de motius bacterians, es va plantejar el paper de CD14 en la modulació de la resposta adaptativa, comprovant la possible implicació de la variant *CD14-159T* en la sensibilització al·lèrgica dels individus. La teoria era que, en el grup d'individus adults epidèmics la sensibilització demostrada a la soja podia estar acompanyada d'exposició a endotoxines, la qual seria la causa de l'augment de la severitat en els pacients amb asma establerta, però no en aquells individus sense asma, o encara no sensibilitzats, de forma que podria explicar la raó de l'absència de nens afectats durant l'epidèmia de soja de Barcelona. Segons la hipòtesi de la higiene, l'exposició a LPS (lipopolisacàrid) (o a altres productes bacterians) actuaria com a protector en sistemes

immunològics no *primats* antigènica. Si això fos cert, s'esperaria un augment de la freqüència de l'al·lel T en aquests individus, respecte als individus no epidèmics, controls o en els nens. Els resultats observats recolzen aquesta dada, ja que en els pacients amb asma adult amb nivells elevats d'IgEs (per sobre de la mitjana del grup, 148UI/ml) es va observar un increment de la freqüència de l'al·lel CD14-159 T en homozigosi.

Aquesta dada es pot interpretar com una confirmació de la hipòtesi de l'efecte de la via CD14-LPS en la modulació de l'asma, però s'ha de ser caute ja que només es va observar quan es van considerar només els individus adults, de forma que pot ser un reflex d'una sensibilització diferent en el grup d'asma adult sense consideració de la sensibilització per la pols de soja. Això però, no està d'acord en altres estudis realitzats en pacients adults on es va demostrar l'associació de l'al·lel T en homozigosi (Koppelman et al. 2001) o com a portador (Gao et al. 1999) amb uns nivells baixos d'IgEs. D'altra banda, s'ha de tenir en compte que en la mostra analitzada pel nostre equip, el 100% dels pacients representen casos d'aparició tardana de la malaltia, mentre que en els casos d'asma en adults són d'aparició infantil en un 50 % dels casos (Bodner et al. 1997).

Els indicis observats suggereixen un paper del control genètic de la resposta a productes bacterians en el desenvolupament dels fenotips associats amb atòpia. La contribució de l'exposició a endotoxines com LPS, ha estat demostrada en altres estudis fent servir un model animal d'asma amb o sense exposició a LPS (Tulic et al. 2000), i en humans, on individus homozigots per -159T han demostrat ser més sensibles a l'exposició a LPS (Vercelli et al. 2001). A més, altres línies d'evidència recolzen indirectament aquestes observacions i la seva implicació en l'asma. Així, en tres estudis independents de cerca aleatòria del genoma, amb asma o fenotips intermedis, s'ha descrit lligament de marcadors de la regió 4q35 amb HRB (Daniels et al. 1996), amb nivells elevats d'IgEs i la resposta específica d'IgEs (spIges) (Wjst et al. 1999), i amb asma (fenotip *loose asthma*, definit com la presència de símptomes o d'HRB) (Ober et al. 1998). En aquesta zona hi mapen els gens dels receptors Toll-like 2 i 3 (*TLR2* i *TLR3*), receptors presents en les cèl·lules dendrítiques (CD) que poden reconèixer els complexos sCD14-PAMPs presents en el medi. D'altra banda, s'ha demostrat una expressió regulada dels TLRs durant el desenvolupament de les CD (Visintin et al. 2001), que porta a l'establiment dels llinatges funcionals de tipus Th1 o Th2 (Kapsenberg et al. 1999).

TNF i atòpia

En aquest estudi s'ha observat una associació significativa de l'al·lel TNF2 amb la presència de respostes positives a test SPT (>1 test SPT).

L'estudi presentat aquí recolza un paper de TNF2 en el desenvolupament de l'atòpia en població espanyola, com ha estat reportat en altres estudis i fenotips associats amb asma: amb HRB (Li Kam Wa, 1999), asma (Moffatt i Cookson 1997; Winchester et al. 2000), asma agut (Witte et al. 2002), símptomes respiratoris (Chagani et al. 1999) i atòpia (Castro et al. 2000). L'associació amb atòpia ha estat realitzada en una mostra de població espanyola (Castro et al. 2000). En aquell estudi TNF2 presentava una freqüència major en individus atòpics, respecte individus sans, amb una freqüència de gairebé el doble que el que es va observar en la nostra mostra. Aquestes diferències són difícils d'explicar per raons ètniques, potser una explicació més probable sigui que TNF està implicat únicament en la resposta SPT específica, ja que en la mostra adulta no s'ha observat associació amb el fenotip *atòpic* (definit com la presència de SPT o/i nivells elevats d'IgEs), de forma que una sensibilització diferent podria ser la causa de les diferències apreciades. Està establert que l'exposició al·lèrgica com a factor de risc difereix entre les poblacions, havent-se'n descrit diferències entre les poblacions mediterrànies i les del centre de la península.

Respecte a la mostra infantil, el nostre equip, però, no s'ha observat cap associació amb asma atòpic. Això és podria explicar per un paper específic de TNF en formes adultes d'asma atòpic. En aquest sentit un estudi longitudinal amb 493 nens ha demostrat que TNF2 no representa un risc a desenvolupar trastorns al·lèrgics en nens (Zhu et al. 2000). Altres estudis realitzats en mostres infantils han demostrat una associació amb l'altre al·lel TNF (TNF1) (Albuquerque et al. 1998; Trabetti et al. 1999), o bé amb TNF2. Aquests, però, són estudis de mida molt reduïda (Winchester et al. 2000) o que presenten una barreja d'individus adults i infantils (35% de pacients adults) (Trabetti et al. 1999). Una dada que sembla recolzar el paper diferent de TNF depenent de l'edat, és que *Ltα2* és més freqüent en el cas dels nens amb una edat d'aparició de la malaltia inferior a 3 anys, suggerint uns nivells menors de TNF en relació amb una edat de presentació més primerenca: amb una edat mitjana dels homozigots d'1,8 anys respecte a 3,4 en els individus portadors (*Ltα 1/2* i *Ltα 1/1*). En aquest sentit, encara que es basa només en una observació molt limitada, els individus homozigots per a *Ltα2/TNF1* no presentem eosinofília perifèrica, la qual cosa pot estar relacionada amb els nivells més baixos associats amb l'al·lel TNF1, i la funció de TNF en l'influx de cèl·lules

implicades en l'asma bronquial (Lassalle et al. 1993). Un dels principals activadors de TNF és LPS, de forma que és possible que els individus amb un genotip de baixa expressió (*Ltα 2-TNF1*), estiguin protegits i direccionin la resposta immunitària cap a una resposta de tipus no al·lèrgica.

TNF és una de les principals citocines inflamatòries (Holgate 2000), i un dels principals efectes és l'increment de l'expressió de molècules d'adhesió, com ICAM1 i VCAM. De fet, s'ha reportat una major expressió d'ICAM1 en l'asma bronquial (Bentley et al. 1994). ICAM1 actua com a molècula que vehicula les cèl·lules inflamatories a través de l'epiteli, la qual cosa fa que la sobreexpressió estigui relacionada amb una major influx de cèl·lules de la inflamació. D'altra banda, les cèl·lules T $\gamma\delta$, han estat relacionades amb la defensa innata contra els microorganismes, havent-se demostrat que intervenen en la maduració de les cèl·lules dendrítiques (CD) via TNF (Ismaili et al. 2002), induint en les CD un augment en la producció d'IL-12. Aquest augment de IL-12 pot comprometre negativament el desenvolupament del llinatge al·lèrgic (Th2), de forma que els nivells alts de TNF podrien protegir contra el desenvolupament de l'al·lèrgia afavorint una resposta inflamatòria no al·lèrgica, mentre que en pacients amb un asma establert, o amb un menor component al·lèrgic, pot representar una més fàcil sensibilització i una major presència de reaccions SPT.

Quant als al·lells específics de TNF, el fet que els dos individus homozigots per a TNF2 presentin uns nivells baixos d'IgEs, i en el cas del pacient infantil no presenti una història de malalties al·lèrgiques a la família, fa pensar que TNF2 no és l'al·lel de predisposició. Així doncs, encara que la variant -308TNF G/A (TNF 1/2) ha estat associada a nivells d'expressió diferencial de TNF (Kroeger et al. 2000) és probable que no sigui l'única i que d'altres variants de la zona estiguin implicades en la regulació del promotor, la qual cosa explicaria la raó per què altres estudis no han reportat aquest efecte amb TNF.

Knight i col·l., en un estudi de la predisposició a una forma cerebral de la malària en poblacions africanes han demostrat que altres variants de la zona del promotor (*TNF-376*) presenten nivells més elevats de producció de TNF *in vitro*, evidenciant dintre de la regió del promotor de TNF més d'un efecte independent en la regulació de TNF (Knight i Kwiatkowski 1999). Aquest estudi de forma interessant ha mostrat que les variants de TNF poden estar sotmeses a una pressió adaptativa. De la mateixa forma, és possible que en diferents poblacions les diferències amb l'al·lel associat siguin causades per la diferent càrrega ambiental. Trabetti i col·l. han suggerit que una diferent prevalença de les infeccions

helmíntiques, en podia ser la causa (Trabetti et al. 1999). Evidentment, no es pot descartar que l'efecte observat amb TNF estigui produït per algun gen en desequilibri de lligament. En aquest sentit, s'ha reportat la presència d'haplotips més extensos, $L\alpha 1$ -TNF2-HLA-DR, presents de més freqüentment en pacients amb asma i HRB (Moffatt et al. 1999).

Receptors de cèl·lules T

Està demostrat que el tipus d'al·lergogen influencia el desenvolupament de la malaltia. Així, individus que responen als àcars de la pols tenen més risc de desenvolupar asma que en resposta a altres al·lergògens (Sears et al. 1989). A més, la susceptibilitat a determinats al·lergògens varia entre poblacions (Martinez 1997). A la regió 14q diverses cerques han mapat un locus lligat amb asma (CSGA 1997) i HRB, (Malerba et al. 1999) i algunes han detectat *loci* que controlen la resposta específica de forma independent dels nivells totals d'IgEs (Hizawa et al. 1998). Dintre d'aquesta regió el *locus* TCR δ/γ ha estat reportat lligat a la resposta específica d'IgEs (Moffatt et al. 1994; Mansur et al. 1999).

L'anàlisi d'un marcador microsatèl·lit pròxim a $TCR\alpha$ va reportar diferències nominals en la freqüència de dos al·lels: $FCA.TAI*4$ i $FCA.TAI*8$. Després de correcció pel número de test, la significació per a $FCA.TAI*8$ encara era significativa, amb una menor prevalença. Aquest resultat va ser imputat a un efecte de compensació per l'augment de l'altre marcador $FCA.TAI*4$ (Soriano et al. 2000), però aquesta disminució pot ser també atribuïda a un efecte protector. En aquest sentit en models animals amb asma induïda, s'han identificat les cèl·lules T δ/γ com a reguladores negatives de la reactivitat bronquial (Lahn et al. 2001), de forma que la manca de determinada especificitat TCR δ/γ pot estar relacionada amb una major susceptibilitat a l'asma. Nosaltres, però no vam detectar cap variació en els individus amb HRB. Respecte al gen per a la cadena α , l'efecte seria més difícil d'explicar per una manca de funció ja que a diferència de les TCR δ/γ , encara que se sap que determinades especificitats poden determinar una resposta, no s'ha associat a cap efecte dominant negatiu (Moffatt et al. 1997). De forma interessant el *locus* que codifica per a la cadena gamma del TCR, s'ha observat recentment lligat amb eosinofília i HRB (a metacolina) en una població australiana (Leaves et al. 2002). Les cèl·lules $\gamma\delta$ poden modular la presència d'eosinòfils en el lloc d'inflamació (Penido et al. 1997; Lahn et al. 1999). El nostre equip en l'estudi de tres marcadors de la regió 7p15, associada amb asma en una població fina

(Laitinen et al. 2001), va observar una associació amb els nivells elevats d'IgEs i un marcador de la regió ($D7S2550$). Aquesta associació, encara que limitat, com a resultat d'un estudi de rèplica pot suggerir un paper de les cèl·lules TCR δ/γ en el desenvolupament de l'asma en la nostra població.

Corol·lari

Com a resum, els resultats observats en els estudis de segregació, de lligament i d'associació en múltiples poblacions, i els nostres mateixos resultats, suggereixen que molt gens estan involucrats en la patogènesi de l'asma, però que cap d'ells té un efecte en la predisposició prou fort com per a ser un contribuïdor major al risc de la malaltia. Aquests resultats són esperats ja que la patogènesi de l'asma és complexa i és probable que les alteracions en moltes de les vies immunes portin al mateix efecte final, és a dir, que actuïn de forma redundants, la qual cosa també és d'esperar en un sistema com l'immunitat. L'evolució de la malaltia és paral·lela a la maduració del sistema immunitari, i l'efecte que l'ambient té en la modificació del seu comportament comporta riscos diferents en diferents edats i situacions, malgrat una base genètica comuna. Tanmateix, com es demostra en els estudis genètics, és possible que existeixin alguns gens comuns, però també és clar que les influències genètiques i ambientals controlen la penetració d'aquest gens d'asma.

L'estudi realitzat pel nostre grup ha posat de manifest un efecte genètic en la modulació dels fenotips asmàtics, amb unes diferències entre els pacients amb asma adult i asma infantil. Els processos ambientals són crítics en la determinació de la progressió de la malaltia. Aquestes diferències estan relacionades amb la sensibilització diferent que han sofert els grups de pacients analitzats. Tot i la bona definició dels símptomes d'asma i l'estandardització de les característiques clíniques, la manca d'associació observada amb el grup total d'asma adult posa de manifest una heterogeneïtat important dins d'aquest grup, encara que també s'ha de tenir molt en compte la manca d'un grup control adequat. D'altra banda és possible que el grup d'asma adult sigui etiològicament més heterogeni que el grup de pacients infantils: dintre del grup adult, el grup anomenat "epidèmic" presentava un pronòstic diferent al de no epidèmics dos anys després de l'epidèmia (Sabria et al. 1994).

Molts factors, tant ambientals (localització geogràfica, temps de l'estudi, medicació), com genètics (heterogeneïtat genètica, interaccions, pleiotropia,

penetració incompleta) influeixen el fenotip asmàtic en una forma que s'escapa en molts dels dissenys experimentals. Dades com la història natural dels pacients haurien de ser incloses, com a base diferencial entre els grups de pacients.

Quant a les expectatives de la cerca genètica de l'asma, l'estudi de factors modificadors del fenotip, o estudis farmacogenòmics, seran importants en el futur, de cara a una intervenció mèdica en la malaltia de l'asma. D'altra banda, l'asma i el seu desenvolupament ofereixen un magnífic camp per l'estudi de la plasticitat del sistema immune i la comprensió dels mecanismes de regulació, de cara a una intervenció preventiva o curativa.

Per què CFTR i asma?. El paper de CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) en la malaltia pulmonar, la principal manifestació en els pacients de fibrosi quística (FQ), és clara i ben descrita. La seva funció va més enllà de la regulació dels fluids epitelials, havent-se comprovat la seva implicació en l'adhesivitat bacteriana i la infecció, fenomen clau dintre de l'evolució de la malaltia quística pulmonar (Pilewski i Frizzell 1999). Altrament, CFTR s'ha demostrat important tant a nivell de l'epiteli respiratori com d'altres cèl·lules no epitelials localitzades en l'arbre bronquial. D'altra banda, l'asma és una malaltia multifactorial on múltiples gens, condicionats per l'ambient, contribueixen, amb un grau més o menys intens, a crear una base de predisposició en l'individu. La majoria dels gens que han estat implicats en la predisposició a asma tenen una implicació directa o indirecta en el control o modulació de les vies d'acció immunitària. En cap cas s'ha identificat una relació directa per lligament amb el gen *CFTR*. Tot i així, l'important grau de polimorfisme del gen, l'alta freqüència d'alguna de les mutacions gèniques de *CFTR* i la creixent evidència de la funció pleotròpica de CFTR, fan que sigui un camp d'investigació molt important i actiu dintre de l'estudi dels candidats modificadors de l'asma.

Síntomes respiratoris en portadors de mutacions

L'elevada incidència (1/2500 nounats) d'una malaltia tant deletèria com la FQ encara no s'ha explicat de forma convincent. Tanmateix, s'ha proposat que l'alta incidència pot ser deguda a una avantatge dels portadors heterozigots de mutacions al gen *CFTR*. Una de les primeres passes que es va decidir fer, va ser testar la presència de la prevalença d'asma en els parents de pacients de FQ, portadors de mutacions a *CFTR*.

El nostre laboratori és centre de referència per al diagnòstic genètic de FQ i s'han analitzat més de 640 pacients de FQ (Casals et al. 1997). La simple revisió dels historials clínics dels individus, però, és poc informativa. Els símptomes d'obstrucció de les vies en els pacients amb asma poden ser confoses amb la simptomatologia obstructiva pròpia de la FQ si l'exploració no es realitza segons uns estàndards. Per aquest motiu, per tenir unes dades més objectives de la prevalença de l'asma entre els individus portadors de mutacions en *CFTR*, es va distribuir una enquesta a 7000 individus d'arreu de l'Estat Espanyol.

Tal com s'explica en la secció de resultats, el qüestionari va ser dissenyat de forma anàloga als descrits pels estàndards de la IUATLD. L'eficiència dels qüestionaris sobre símptomes respiratoris en la validació d'un diagnòstic d'asma no s'ha pogut realitzar de forma específica en aquest cas, però qüestionaris com aquest han estat utilitzats eficientment en molts dels estudis epidemiològics i genètics de l'asma (ECRHS 1996; ISAAC 1998; Koppelman et al. 1999).

En aquest estudi dels 462 qüestionaris que es van incloure, el 15,4% dels individus afirmava tenir problemes respiratoris (sense especificar), dels quals el 61,5% (n=43) presentaven uns símptomes respiratoris coincidents amb un diagnòstic d'asma (9,4% dels enquestats) i un 53% (n=37) (8% del total) presentaven símptomes de rinitis al·lèrgica.

La proporció de portadors amb símptomes d'asma és elevada respecte a l'estimada en població espanyola, que és aproximadament del 5% en adults (rang d'edat de 20-44) (ECRHS 1996; Grupo español del estudio europeo del asma 1996). Aquesta elevada prevalença no es deu a un biaix per un excés de pacients infantils, els quals tenen una prevalença d'asma superior. Al contrari, el disseny de l'estudi d'entrada introdueix un biaix positiu cap a una selecció de la població adulta. Els enquestats presenten una edat mitjana de 56 anys amb una edat que varia des de 12 anys fins a un màxim de 92 anys. D'altra banda, com una explicació de l'elevada prevalença detectada, es podria objectar que el diagnòstic d'asma va ser sobrevalorat per una estimació a l'alça dels símptomes respiratoris. Els símptomes respiratoris no sempre són diagnòstic d'asma, però l'ús de la combinació de símptomes ha estat utilitzat com a mesura d'asma en nombrosos estudis. L'ús de qüestionaris respiratoris ha estat l'instrument més validable pel diagnòstic de l'asma (O'Connor i Weiss 1994), i en tot cas, s'ha observat que infravaloren els casos reals d'asma (Kauppi et al. 1998).

Quant a les mutacions reportades, el grup d'individus amb problemes respiratoris presentaven una major prevalença de les mutacions F508del i G542X: un 68 % i un 7% respecte a una prevalença de 53% i 3,5%, respectivament, observades en la població espanyola (Casals et al. 1997). La mateixa tendència va ser observada en el grup amb símptomes respiratoris d'asma, però sense diferències respecte als portadors sense símptomes. Tres dels 22 pacients amb asma són portadors de les mutacions R1066C, R334W i W1282X, respectivament, amb una freqüència relativa més elevada que en la mostra de pacients sense asma, encara que el

baix número de pacients amb asma fa que no siguin més que indicis sense significació estadística.

La proporció d'individus amb símptomes respiratoris d'asma entre els portadors de la mutació F508del era lleugerament superior, però no diferent al que presentaven els individus portadors d'altres mutacions (8,4% vs 6,8%; $p=0,6$). Dahl i col·l., en una mostra de 17.000 individus de la població danesa, van investigar 9200 individus per la presència d'asma i per la mutació F508del, observant una prevalença d'asma major en els portadors de la mutació (Dahl et al. 1998). Aquest estudi va ser discutit degut al seu disseny en la forma de seleccionar individus de la població general i també per la forma de realitzar el diagnòstic mitjançant l'autodiagnòstic dels pacients (Kauffmann et al. 1998; Super et al. 1998; Swift i Su 1998). A més, treballs anteriors apuntaven a un efecte contrari, postulant una protecció contra els efectes severos de l'asma (Mennie et al. 1995; Schroeder et al. 1995). Però, la prova de l'efecte deleteri de la mutació en l'evolució de l'asma la va donar el mateix grup recentment: en una anàlisi prospectiva dels pacients portadors de F508del, han demostrat la implicació directa de la mutació en la funció pulmonar en pacients amb una història familiar d'asma (Dahl et al. 2001).

L'estudi realitzat pel nostre grup va demostrar una major prevalença dels símptomes d'asma en els individus portadors de mutacions que en la població general, la qual cosa està d'acord amb els resultats observats per Dahl i col·l. D'altra banda, s'ha de considerar el fet de que l'estudi no sigui representatiu de la població de portadors, donat el baix percentatge de resposta a l'enquesta (8,4%).

Elevada prevalença de variants de CFTR en pacients amb asma

En l'estudi de portadors de mutacions es va evidenciar una major freqüència de símptomes respiratoris. L'estudi, però, en estar limitat a les mutacions causants de FQ, presentava un poder reduït. El següent pas va ser estendre l'estudi a (1) totes les variants del gen mitjançant l'anàlisi completa de les regions codificants del gen, i (2) analitzar una mostra de pacients amb asma ben caracteritzats pel diagnòstic d'asma i un grup de controls.

El nostre equip va realitzar un estudi de la prevalença de les mutacions de *CFTR* en relació amb els fenotips d'asma, realitzant un estudi en dos grups ben

classificats i diferenciats: asma adult (edat mitjana=56) (Lazaro et al. 1999) i asma infantil (edat mitjana=15) (de Cid, 2002).

Es va detectar una elevada prevalença de les variants de *CFTR* en la mostra de pacients amb asma (n=194) respecte a la població control analitzada (n=65). En total es van identificar 20 mutacions amb error de sentit, a més de la deleció F508del i la variant intrònica IVS8-(T)₅.

En l'estudi de població adulta (n=144) es van identificar 21 pacients amb variants amb error de sentit (15%), un pacient amb la F508del (0,07%) i 10 pacients amb un o dos al·lels IVS8-(T)₅ (7%) (Lazaro et al. 1999). La proporció en la mostra infantil (n=50) era similar amb 8 pacients amb una o dos variants amb error de sentit (16%) i dos pacients amb l'al·lel IVS8-(T)₅ (4%), però molt diferent quan a la mutació F508del; tres pacients amb F508del (6%) (de Cid, 2002).

canvi de sentit (veure figura 26). El conjunt total de les variants observades en cadascuna de les mostres de pacients i de la població control, s'ha adjuntat en l'annex 3.

La proporció de variants amb error de sentit és sensiblement elevada en tots dos grups (15 % i 16 % respectivament). De les 22 variants detectades, només una afecta l'*splicing*, (IVS8-(T)₅), una altra és una deleció (F508del), i el 80% són de canvi d'aminoàcid, un percentatge molt elevat si és té en compte que només representen el 44% de les mutacions totals de FQ reportades. Tanmateix, una major freqüència de variants que poden modificar la funcionalitat de la proteïna de forma menys dràstica seria en principi el patró que s'esperaria de les mutacions relacionades amb l'asma. D'altra banda, sembla evident que les interaccions de *CFTR* amb asma no poden ser simples, donades l'elevada variabilitat al·lèlica i funcional de *CFTR* i l'heterogeneïtat fenotípica i etiològica de l'asma. En aquest sentit, la diferent freqüència de la mutació F508del observada entre les dos mostres de pacients pot representar una diferent interacció en la modulació de l'asma en els diferents estadis d'evolució de l'asma

A part d'aquestes variants es van observar 13 variants intrònics no codificants i sis variants sense

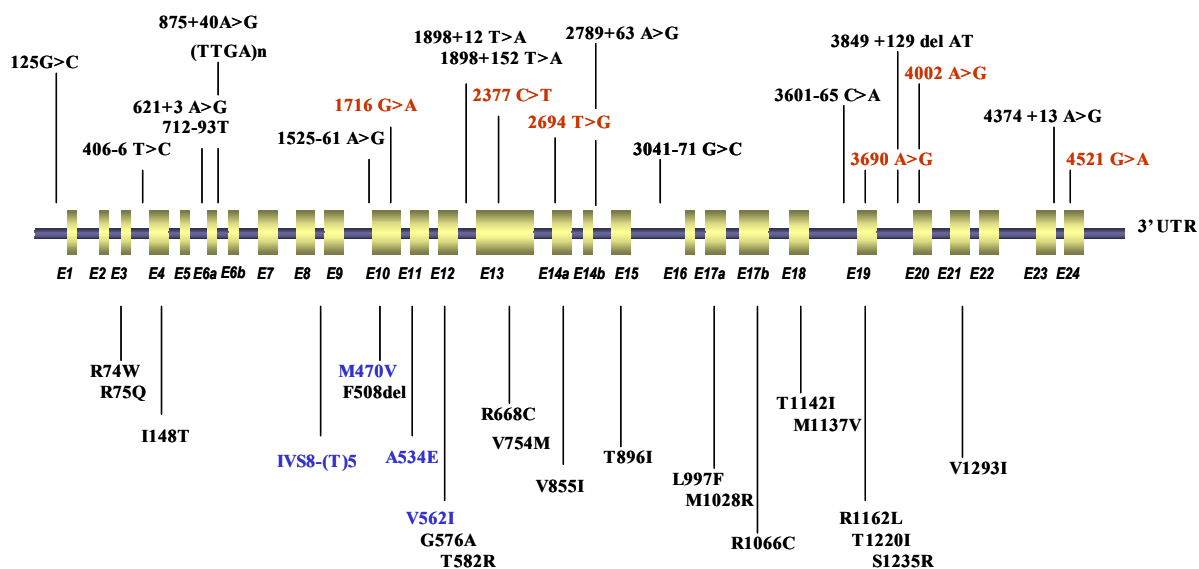


Figura 26

Representació esquemàtica de l'estructura genòmica *CFTR*. A la part superior estan senyalades les variants de la regió no codificant i les variants sense canvi de sentit de la regió codificant (marcades en roig). A la part inferior es representa la localització de les variants observades en la regió codificant, a més de la variant intrònica IVS8-(T)₅. En blau estan marcades les variants que també s'han identificat en la població general. No tota la regió intrònica va ser analitzada

Tant la posició com la natura dels canvis d'aminoàcid tenen unes característiques que suggereixen una funció fenotípica important de CFTR.

Quan es va comparar la seqüència completa de CFTR en diferents espècies de mamífers (bovina, ovella, ratolí, conill), peixos (*dogfish*) i amfibis (*Xenopus*) es va observar que la majoria dels canvis es localitzaven en posicions conservades evolutivament. Els canvis que no presentaven una gran conservació estaven en posicions que poden ser importants en la funcionalitat de la proteïna. La variant V754M, pot afectar la regulació del canal, ja que la posició adjacent Ser753 és una diana de fosforil·lació per cAMP/PKA (Sheppard i Welsh 1999). Altres, com A534E, estan associats a clínica de FQ o bé en posicions on s'ha descrit mutacions de FQ.

Una altra característica de les variants observades és que cap dels canvis és de tipus conservatiu, a excepció de G576A. El CFTR com a canal iònic pot veure afectada la seva funció per canvis de càrrega dels residus que formen el porus del canal.

Les mutacions que es van identificar presenten una distribució diferent en els dominis de la proteïna (figura 27). La proporció observada d'un canvi cada 80 aminoàcids de mitjana varia entre els dominis funcionals de la proteïna. La mitjana augmenta a 1/40 aminoàcid en el segon domini transmembrana (MSD2) i en les regions d'unió a ATP (NBD1 i NBD2), i en canvi són pràcticament absents en la regió de MSD1 (1/269 aminoàcid) i en la zona reguladora (R) (1/160 aminoàcid) (veure figura 27). Aquesta aparent distribució anormal de les variants pot ser útil per a esbrinar quines són les funcions alterades de CFTR en asma. D'una banda, la baixa freqüència de mutacions en el domini R suggeriria un efecte lleu d'aquestes variants en l'asma; la part aminoterminal del domini regulador està altament conservada i mutacions de canvi d'aminoàcid han estat implicades en els processos de processament de la proteïna (Vankeerberghen et al. 1998). El fet de trobar una baixa freqüència de mutacions en el domini R podria ser esperable, però el que sí que és curiós, és l'asimètrica distribució de les mutacions en els dos dominis transmembrana. Ésta descrit que els dominis TM 4, 5, 6 i 12 formen el porus del canal, però tenen diferents funcions. Així, s'ha demostrat que el domini TM12 està implicat en una alteració de la conductància del canal. En canvi, altres dominis com el TM6, semblen ser essencials en la selectivitat del canal. Els canvis identificats en els dominis transmembrana es localitzen en els TM 9,10 i 12; de manera que és possible que les variants detectades influeixin en la conductivitat, més que en l'especificitat iònica del canal. Altres canvis presents en el domini

MSD2 poden alterar la conductància del canal, com els canvis de càrrega (M1028R). D'altra banda, els dominis intracel·lulars (ICL) afecten al processament intern de la proteïna i la funció del canal, encara que en aquest punt no són equivalents: els dos primers (ICL1-2) ajuden a l'estabilització del porus i els altres (ICL3-4) actuen de forma oposada (Sheppard i Welsh 1999). És possible que les variants observades, malgrat la seva localització dispersa, actuïn en una sola direcció, augmentat la conductància del canal CFTR. La major part de les variants estan localitzades en la part intracitoplasmàtica del canal, encara que degut a que la major part de la proteïna és de localització citoplasmàtica, la posició en la part interna (*loop* interns i dominis NFB1/2 i R) suggereix que les funcions associades al fenotip asmàtic es deuen a possibles interaccions amb els sistemes de senyalització interna o de regulació d'altres canals, més que per la modificació d'especificitats externes com en el cas de l'adhesió a *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella typhi*, associat a canvis en el domini ECL1 (Pier 2000).

La quantitat de funció residual del canal influeix en la severitat de la manifestació clínica de la malaltia (Estivill 1996), però altres factors addicionals han de ser presents per a poder explicar la variació de la severitat entre grups de pacients amb la mateixa mutació. Encara que hi ha molts estudis sobre l'estructura del canal de Cl⁻, és possible que les alteracions no estiguin relacionades només amb el transport de clorur i s'hagin de plantejar altres aproximacions funcionals.

Efecte dominant de les variants

L'anàlisi dels dos grups de pacients va revelar que els pacients amb mutacions amb error de sentit presenten una "associació" amb la variant M470. Tant en la mostra d'asma adult com d'asma infantil, no existeixen diferències quant a la freqüència de la variant M470 o V470, però el 90% dels pacients adults i tots els pacients infantils portadors d'una variant de canvi d'aminoàcid són alhora portadors de l'al·lel hiperfuncional M470. De forma oposada, només el 63% dels pacients no portadors de variants en són portadors, una freqüència similar a la present en la població general (Lazaro et al. 1999). S'ha suggerit que la combinació de diferents al·lells en els *loci* polimòrfics produeix una funció reduïda o insuficient que pot estar implicada en l'expressió de la malaltia quística (FQ) (Cuppens et al. 1998).

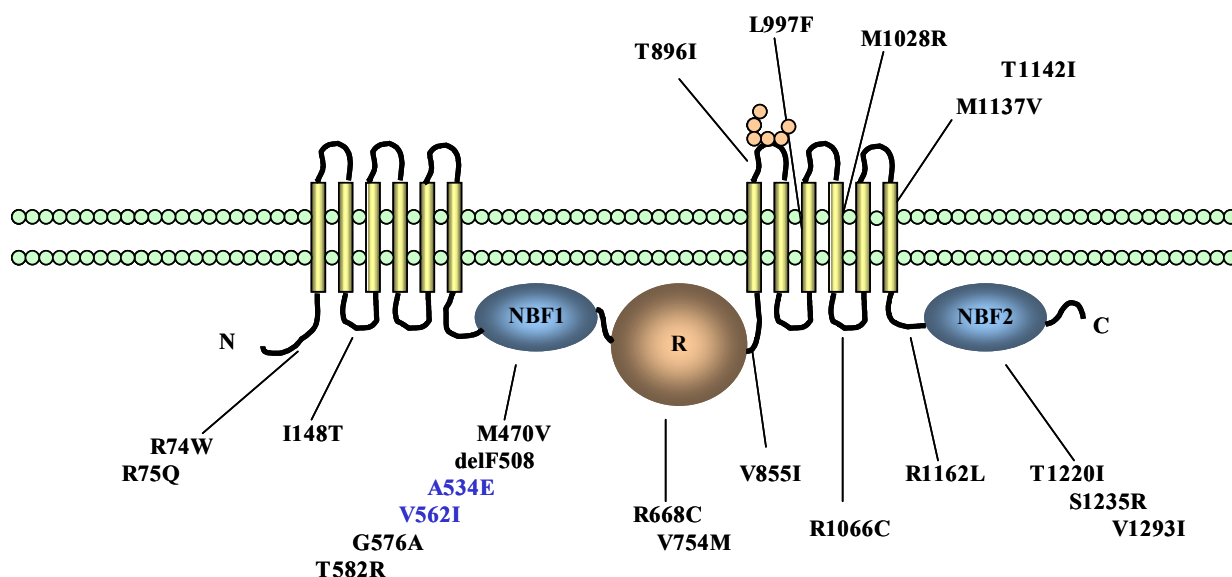


Figura 27

Representació de l'estructura teòrica de CFTR segons les prediccions de Riordan i col·l., on s'observa que la majoria de les variants identificades en els pacients estan situades en la part intracitoplasmàtica del canal. En blau estan marcades les variants que també s'han trobat en la població general.

És possible que la presència de l'al·lel M470 en els individus portadors de variants amb error de sentit en els pacients amb asma tingui un efecte en els transcrits que tant pot ser en *trans* com en *cis* (Wei et al. 2000), i que aquesta associació funcional sigui la causa del desequilibri que s'observa. Encara que s'ha descrit que algunes de les mutacions més comunes s'han originat en un haplotip comú (Mateu et al. 2002), el desequilibri de lligament entre les variants amb error de sentit i la M470V, tot i la baixa taxa de recombinació existent a la zona, és difícil de creure donada la situació tant dispersa de les variants en la seqüència gènica de *CFTR*.

L'efecte de les variants amb error de sentit sembla presentar un efecte dominant en l'asma. La freqüència de l'al·lel IVS8-(T)₅ és similar a la detectada en la població general i en tot cas sembla estar disminuïda respecte als controls no asmàtics (de Cid et al. 2001a). Cap dels portadors de variants de canvi d'aminoàcid ho són de la variant hipofuncional IVS8-(T)₅. A més, el 83% (10/12) dels individus asmàtics que són portadors de la variant 5T presenten (en compensació?) la variant hiperfuncional M470, i cap és portador de l'haplotip TG₁₂-T₅, associat amb una menor expressió de transcrits funcionals (Cuppens et al. 1998). La combinació de l'al·lel 5T amb V470 ha estat observada en pacients amb ABCD (de Meeus et al. 1998) i l'haplotip TG₁₂-T₅ en homozigosi ha estat descrit en un

pacient amb símptomes de malaltia pulmonar *CF-like* (Noone et al. 2000).

Mutacions o polimorfismes

Un dels problemes habituals després de la identificació de variants de seqüència d'un gen és el de decidir quines són causants de la malaltia i quines no. Normalment el caràcter patogènic d'una mutació s'estudia en una mostra clínicament ben caracteritzada i amb estudis *in vitro*. Aquesta darrera opció, que sens dubte és la més correcta, és difícil de portar a terme amb totes les mutacions identificades a *CFTR*.

Generalment, mutacions o variants del gen *CFTR* han estat referenciades de forma clàssica com variants mutagèniques referint-se al fenotip clàssic de FQ, ja que principalment el triatge s'ha realitzat en individus de risc de FQ. No obstant, els casos atípics amb nivells normals de transport d'ions de clor constitueixen fins el 2% dels pacients, la qual cosa posa de manifest que l'espectre d'anormalitats produïdes per efecte de variants *CFTR* és més ampli. Algunes de les variants identificades en la mostra de pacients han estat descrites a la població general, espanyola o bé d'altres regions (grega, italiana, francesa), però, això no implica que aquestes no tinguin un valor patogènic.

Bombieri i col·l. van proposar un concepte teòric basat en la freqüència de les variants en població general com a base per a determinar el límit o les possibilitats d'esbrinar el caràcter patogènic d'una mutació (Bombieri et al. 2000a). Aquest estudi, en el qual el nostre equip va col·laborar, es presenta l'anàlisi de la regió codificant en individus de la població general de quatre poblacions de la regió mediterrània: nord-est d'Itàlia, centre d'Itàlia, sud de França i nord-est de Espanya. Es va observar que la prevalença de les variants codificants de *CFTR* era menor en la mostra espanyola, però la distribució de les variants identificades (incloent variants sense canvi de sentit, variants no codificants de la zona del promotor o variants intròniques), i sense tenir en compte les variants patogèniques per a FQ, no presentava una diferència significativa entre poblacions (Bombieri et al. 2000a).

Seguint la hipòtesi proposada en aquest treball, 8 de les 12 variants detectades en la mostra de la població general espanyola i no descrites com a patogèniques (veure taula 3 i 4 de treball 5, pg, 135) van ser considerades com a al·lèls comuns classificables com a al·lèls no causants de FQ (anomenades EDC, de *Easy demonstrable common mutations*). En canvi, les altres variants detectades en baixa freqüència, entre 1/100 i 1/250, eren variants de les quals era necessari un triatge en una mostra molt més àmplia per a esbrinar el paper patogènic. Entre aquestes variants estan les mutacions R668C, G576A, L997F, i R75Q, detectades en una mostra de 368 cromosomes de la població general espanyola (Lazaro et al. 1999) i amb unes freqüències en conjunt, majors al llindar patogènic del 3% proposat en relació amb FQ. Donada la freqüència acumulada en conjunt, no totes poden ser classificades com a patogèniques, al menys per a FQ, però hi ha dades que recolzen el seu paper patogènic. Així doncs, existeixen evidències no confirmades que una mutació amb error de sentit (D565G) associada amb R668C pot associar-se a un defecte d'*splicing* i a un *skipping* de l'exó 12 (Tzetis, Journal of Cystic Fibrosis, 1 (2002). S35-S58). D'altra banda, la variant R75Q ha estat associada a formes benignes (*mild*) de FQ, amb suficiència pancreàtica (www.CFTR.org/nw31), i a casos d'infertilitat masculina. Aquestes mutacions, encara que presents també en individus de població general diferent a l'espanyola (Bombieri et al. 1998; Tzetis et al. 2001), han estat relacionades en diversos estudis amb altres patologies, com la hipertripsinèmia del nouat (Castellani et al. 2001) i la pancreatitis idiopàtica en el cas de la variant L997F (Gomez Lira et al. 2000); el desenvolupament de bronquiectàsies disseminades (Bombieri et al. 1998; Tzetis et al. 2001) en el cas de R75Q, G576A, R668C i L997F, i en el cas de la variant

R75Q amb sarcoïdosi (Bombieri et al. 2000b). Respecte al fenotip d'asma, les variants L997F i R75Q han estat descrites en una mostra de pacients grecs (Tzetis et al. 2001). El fet que aquestes mutacions fossin presents en unes proporcions semblants en la mostra control no-asmàtica estudiada en el projecte EGEA (de Cid et al. 2001a), es pot atribuir a diferències geogràfiques respecte a la població francesa i en una hipotètica diferència entre el *background* genètic associat amb aquestes variants; de forma que en una població presenti un caràcter patogènic, però no en l'altra, de forma similar al posat de manifest en l'anàlisi del receptor d'IL4 (Ober et al. 2000a). En aquest sentit s'ha descrit certes combinacions que poden ser patogèniques, com la descrita en la població turca; un cas d'un individu heterozigot compost per la variant TG₁₁-T₅-V470, i la mutació G576A en combinació amb TG₁₁-T₇-M470, que va morir als tres mesos a causa d'una infecció sinopulmonar amb *Pseudomonas aeruginosa*, i nivells salins elevats (Onay et al. 2001).

L'expansió de l'espectre de malalties associades a mutacions en *CFTR*, fa que la interpretació del caràcter patològic d'una variant sigui més difícil de fixar.

Correlació amb el fenotip

L'anàlisi dels pacients amb asma va posar de manifest que les variants del gen *CFTR* presentaven una freqüència augmentada entre els pacients A més, la majoria de les variants detectades comportaven una importància funcional com es despenia de (1) l'estudi de la conservació entre espècies i de l'elevat grau de conservació que presenten els residus, i (2) de la implicació en formes lleus de FQ o en altres malalties. Com era d'esperar en el cas d'un gen que actua com a modificador, i dintre del patró d'herència complexa que presenta l'asma, la majoria dels canvis que s'han trobat en els pacients amb asma són canvis que no alteren dramàticament l'estructura de la proteïna. ¿Però com afecten aquest canvis tant heterogenis al desenvolupament de l'asma?, ¿contribueixen tots al mateix fenotip "asma"?

La presència d'HRB en els malalts de FQ i en el curs evolutiu de la malaltia no està ben definida. No obstant, diversos estudis epidemiològics han demostrat que l'HRB és present entre els pacients de FQ (Davis 1989). De forma interessant, l'estudi de la funció pulmonar en 316 portadors obligats de mutacions de FQ va observar un increment de la prevalença de les sibilacions i una

funció pulmonar reduïda (FEV1) respecte als controls sans (Davis i Vargo 1987).

Encara que la presència de sibilacions està estretament relacionada amb els fenòmens d'HRB, no sembla haver una correlació entre les variants i l'HRB. L'anàlisi de la funció pulmonar en els pacients adults portadors de les variants de canvi d'aminoàcid no va demostrar la presència d'alteracions importants en la FEV1 o en els tests d'HRB (amb provocació amb metacolina o per prova dilatadora) (Lazaro et al. 1999; de Cid et al. 2001a), però sí va evidenciar entre els portadors de mutacions una major freqüència de símptomes respiratoris definits per la presència de sibilacions amb respiracions curtes, (Lazaro et al. 1999). Això concorda amb els resultats observats d'una major prevalença dels símptomes respiratoris reportada en l'enquesta realitzada a portadors obligats de mutacions *CFTR*.

D'altra banda, l'anàlisi completa de *CFTR* en una població d'origen finès no va evidenciar cap variant en una mostra de 20 pacients amb asma diagnosticada i una prova d'HRB positiva. Aquest resultat potser es deu al baix número de pacients analitzats, o bé al fet que la prevalença de FQ en la població fina és baixa així com l'heterogeneïtat de les mutacions identificades, i el paper modificador de *CFTR* en asma representa un risc molt menor que en altres poblacions, de fet el número de portadors és de $\gg 1/50$. A més, les poblacions on s'ha demostrat una major presència de variants entre la població asmàtica són d'origen mediterrani, on existeix una prevalença elevada de FQ (i de portadors) i una elevada heterogeneïtat en les mutacions (Casals et al. 1997; Tzetis et al. 1997).

Tot i així, la major presència de símptomes entre els pacients adults era evident (Lazaro et al. 1999; de Cid et al. 2001a), de forma que era possible que *CFTR* influís altres manifestacions del fenotip asmàtic, però no el desenvolupament de l'HRB.

Entre les dues mostres de pacients analitzades, la freqüència de portadors de variants amb error de sentit era similar (al voltant del 15%), però existia una diferència important, fins d'un ordre de magnitud major en la mostra infantil (3/50) quant a la freqüència de la mutació F508del. La baixa freqüència en la mostra de pacients adults es va atribuir en principi a la diferència d'edat entre el grup de pacients, ja que la mutació F508del s'ha relacionat amb un pronòstic pitjor i una taxa major de declivi de la funció pulmonar tant en els pacients amb FQ (Corey et al. 1997) com entre els portadors sans (Dahl et al. 2001).

Els pacients de FQ presenten una mitjana d'IgEs més elevada i un major número de test SPT positius, però no s'ha pogut correlacionar amb els pares (Davis 1989).

En la població de pacients infantils estudiada es va observar que els portadors de mutacions de canvi d'aminoàcid tenen una mitjana de tests positius major que els no portadors (2,17 vs 1,56, $p=0,045$). Com ja s'ha esmentat, en els pacients adults portadors de variants de *CFTR* es va observar una major presència de símptomes respiratoris, en canvi, no es va associar a un fenotip atòpic. Contràriament, els portadors presentaven uns nivells inferiors d'IgEs sèriques i una menor resposta específica que els no portadors. Aquestes diferències amb la mostra infantil poden estar relacionades amb una resposta diferent de l'acció de les variants durant l'evolució de la malaltia asmàtica. L'asma ha estat descrita com una malaltia amb dues fases: la primera o de sensibilització es produeix a la infància. La diferència entre l'edat de la presentació de l'asma entre les dues poblacions (8 vs 37) pot estar en la base d'una diferència en l'evolució de la malaltia en les dues mostres de pacients. És probable que les variants interaccionin de forma diferent amb el rerafons genètic durant la infància i en l'edat adulta.

En aquest sentit, s'ha demostrat que cèl·lules mononuclears perifèriques (PBMC) de pacients amb FQ tenen una capacitat molt disminuïda de secretar IFN- γ en relació a les cèl·lules no-FQ (Moss et al. 2000). A més, s'ha observat que en soques de ratolins amb un perfil Th1 (productores de IFN- γ), l'eliminació de *Pseudomonas aeruginosa* és més eficient que en soques de perfil Th2 (Moser et al. 1997). Aquesta deficient producció de citocines de tipus Th1 pot afavorir l'establiment d'un perfil responent de tipus TH2, al·lèrgic (Romagnani 2001). De forma concordant, s'ha hipotetitzat que la inflamació és prèvia a la infecció present en els malalts de FQ (Khan et al. 1995). A més a més, s'ha descrit que en els individus amb test SPT específics és més probable que es presenti una colonització per *P. aeruginosa*, que en els que presenten test SPT negatius (Wilmott et al. 1985).

Hi ha diverses línies d'evidència que recolzen un defecte intrínsec del sistema immune en la FQ, amb un paper de les citocines i de les cèl·lules limfoides en la predisposició a la inflamació. Així doncs, s'ha descrit la seva expressió del canal en cèl·lules limfoides (Chen et al. 1989) i el seu paper en l'activació dels eosinòfils en pacients amb FQ (Koller et al. 1995), i en la regulació de la secreció en les cèl·lules B (Bubien 2001). D'altra banda, *CFTR* interactua amb les citocines, ja sia per la regulació de *CFTR* per les citocines (Dong et al. 1995) o per la regulació de *CFTR* en l'expressió d'aquestes; la *downregulació* d'IL-10 en pacients FQ (Bonfield et al. 1995), regulació positiva d'IL12 després de l'activació per LPS (Hasko et al. 2002).

La presència d'una interacció amb altres factors de predisposició genètica a l'asma sembla ser més important per al risc que comporta la mutació F508del que les variants de canvi d'aminoàcid. És possible que la manca de proteïna funcional a la membrana no sigui suficient com a factor de predisposició pel desenvolupament de la malaltia, com ho demostra la menor freqüència d'haplotips hipofuncionals en els pacients que no pas en la població general (Lazaro et al. 1999; de Cid et al. 2001a), i sigui una activitat extra del canal la que causi aquesta acció, o bé una interacció amb altres sistemes (Naren et al. 1997). En aquest sentit, de forma concordant en un estudi realitzat en una mostra de la població danesa, s'ha observat que la mutació F508del, a part de ser més freqüent en asmàtics, presenta associat un major declivi de la funció respiratòria en els individus que tenen una història d'asma familiar (Dahl et al. 2001). No hi ha un estudi semblant amb altres variants funcionals, però en el nostre estudi respecte les variants de canvi d'aminoàcid, es va observar la manca d'història familiar en el grup de portadors, i d'altres estudis que han reportat una alta prevalença de variants de canvi d'aminoàcid associades a asma, no l'han associat a una història familiar en els pacients (Tzetis et al. 2001).

Corol·lari

Convencionalment, els canvis inflamatoris presents en els malalts de FQ s'han associat a la infecció, però diverses evidències posen de manifest que pot ser anterior. Aquest efecte inflamatori de CFTR pot representar un risc associat al curs de la malaltia de FQ, però també un factor de predisposició a desenvolupar processos al·lèrgics i asma.

L'elevada prevalença de portadors de mutacions (i de variants) a la població caucàsica pot representar un important grup de risc pel desenvolupament de l'asma o atòpia. Un estudi prospectiu dels pacients estudiats en el grup infantil podria ser interessant de cara a establir una correlació entre el curs dels símptomes asmàtics i el genotip complet de *CFTR*. A més a més, dades d'altres polimorfismes associats amb el desenvolupament de l'asma podrien ser incorporades en l'estudi amb l'extensió a l'estudi molecular del genotip dels pares, de manera que podria ajudar a determinar les relacions existents entre el genotip i el curs de la malaltia. D'altra banda la determinació del fenotip clàssic associat a FQ, amb test de suor, o del potencial nasal (NPD), hauria de ser un requisit per l'incorporació d'individus en aquest tipus d'estudis.

CONCLUSIONS —————

PSORIASI

L'estudi de quatre regions candidates en una mostra de casos familiars de psoriasis de la nostra població ha permès determinar que:

- ✓ Els loci *PSORS1* i *PSORS3* contenen un determinant genètic de predisposició a psoriasis en la població espanyola.
- ✓ L'al·lel *HLA-Cw*6* és un al·lel marcador de risc per desenvolupar psoriasis i s'associa a una presentació primerenca de la malaltia i a una distribució preferent de les lesions en les extremitats.
- ✓ L'herència de *PSORS1* presenta un efecte parental amb un component predominantment patern, suggerint un efecte de silenciació en la regió.
- ✓ L'haplotip codificant *HCR*WWCC* associat amb *HLA-Cw*6*, és un determinant de risc compartit en poblacions d'origen ètnic molt divers.
- ✓ No es pot descartar *CDSN* com a factor etiològic de la malaltia.
- ✓ El factor de predisposició *PSORS1* podria ser un locus múltiple de predisposició, compostat per una combinació de diferents determinants gènics lligats.
- ✓ *PSORS3* conté un gen de predisposició en la població espanyola que interacciona amb *PSORS1* sota un model d'acció no epistàtic, implicant possiblement dues vies d'acció diferents.

ASMA

L'anàlisi d'una bateria de gens candidats en dues poblacions de pacients asmàtics, adults i infantils, ha evidenciat un efecte modificador diferent segons l'edat, permetent extreure les següents conclusions:

- ✓ Les variants A375, R406, P478 i R551 del gen de la cadena α del receptor d'IL4 (*IL4RA*) s'associen amb uns nivells basals d'IgEs més alts en els individus no atòpics.
- ✓ Els haplotips codificants d'*IL4RA* s'associen de forma diferent amb asma atòpic i amb al·lèrgia, suggerint un efecte pleotròpic d'*IL4RA* en la etiologia de l'asma.
- ✓ La variant del promotor s'associa a una elevada eosinofília, i podria ser considerada un marcador pronòstic greu en el desenvolupament de la malaltia en edat infantil. D'altra banda *CD14-159T* en adults, però no en nens, s'associa a uns nivells elevats d'IgEs.
- ✓ *BADR2* pot estar modificant el fenotip atòpic mitjançant la regulació dels nivells d'IgEs en l'asma d'aparició primerenca, però no sembla fer-ho en pacients amb asma adult.
- ✓ Els nivells de la citocina proinflamatòria TNF estan associats en adults amb la presència d'atòpia cutània, però no en nens, suggerint una implicació diferent depenent de l'edat.
- ✓ No s'ha pogut demostrar la implicació dels gens dels receptors d'IgEs com a gens de predisposició en la població espanyola, en canvi l'anàlisi de la regió 19p13 suggereix *SCYA25* com a possible gen candidat.

- ✓ Mutacions a *CFTR* s'associen a asma: el 15% dels pacients d'asma adult i el 16% dels pacients amb asma infantil són portadors de variants a *CFTR*, mentre que només el 3% ho són en la població general analitzada.
- ✓ Les variants amb error de sentit identificades en els pacients es troben associades amb la variant hiperfuncional M470 però no amb al·lels hipofuncionals, suggerint una funció dominant en l'etiologia de l'asma.
- ✓ *CFTR* actua com a gen modificador de l'asma: les variants amb error de sentit s'associen amb una edat de presentació més tardana, en canvi, la mutació F508del s'associa a una presentació més primerenca.

Annex 1

Mètodes

Per a les pràctiques comunes de laboratori els manuals que s'ha fet servir han estat:

Sambrook, J., et al. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2^a edició (Nova York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Ausubel, F. M. et al. (1994). *Current protocols in Molecular Biology*. (Nova York, John Wiley and Sons).

Extracció de DNA

Per la major part de les anàlisis realitzades es va partir del DNA, que va ser aïllat a partir de mostres de sang pel mètode d'extracció salina (Miller et al. 1988).

Anàlisi de SSCPs/HD

Els fragments varen ser analitzats en gels de poliacrilamida al 12% utilitzant el sistema comercial *Excel DNA Analysis Kit* (Pharmacia Biotech) o del 10% *DNA Analysis Kit* (Pharmacia Biotech) amb l'equip *Multiphor II Electrophoresis Unit* (Pharmacia Biotech) i /o *Genephor II Electrophoresis Unit*. De forma suplementària es van fer servir en l'anàlisi de la cadena simple, gels verticals d'acrilamida (29:1) al 10-16%.

Els gels eren revelats per tinció de plata, de forma manual o emprant el sistema comercial *DNA Syber Staining Kit* (Pharmacia Biotech) en el cas dels gels horitzontals.

Establiment de línies cel·lulars

A partir de 10 ml de sang es va aïllar la fracció de limfòcits mitjançant separació en gradient de densitat amb centrifugació amb *Ficoll* (Hypaque).

Aproximadament 1×10^6 cèl·lules varen ser incubades durant 2hrs a 25°C amb virus d'Epstein-Barr (EBV) (sobrenadant de la línia productora B95-8 (ATCC:CRL-1612) i després varen ser suplementades amb medi RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementat amb sèrum boví al 15% i amb CsA (Sandoz) (200µM). Posteriorment van ser incubades en condicions usuales de cultiu a 37°C i 5% CO₂ durant 2 dies, temps després del qual es va suplementar amb medi de cultiu RPMI 1640 amb 10% de sèrum i es va deixar en cultiu (aprox., dues setmanes) fins l'aparició d'agregats cel·lulars.

Aquestes línies es varen criopreservar o bé s'utilitzaren per a l'anàlisi citogenètica en metafase de les regions candidates.

Obtenció de Metafases

A partir de sang fresca o a partir de cultius de línies cel·lulars es va realitzar un cultiu de 1ml de sang o $0,5 \times 10^6$ de cèl·lules amb l'activador policlonal PHA (GIBCO-BRL) (o sense, en el cas de les línies) durant 72 hores i després es va realitzar la producció de metafases amb incubació amb colcemid (KaryoMAX colcemid GIBCO-BRL).

Les metafases produïdes es varen conservar com a pellets fixats en metanol/acètic a 4°C i com a metafases esteses a sobre de portes a -20°C.

Triatge mutacional de TCF19

Es va realitzar un triatge de la seqüència codificant i de les zones d'unió intró-exó del gen *TCF19*.

A partir dels encebadors descrits per Nair (Nair et al. 1995) es va dissenyar un parell d'encebadors interns a l'exó 2 (2a i 2b), per a facilitar i millorar l'eficiència de l'anàlisi (a partir de la seqüència genòmica (GDB: U25826)) (taula 52)

Taula 52

Seqüència dels encebadors emprats en l'anàlisi de TCF19

Fragment	Encebadors	Amplificat (pb)	PCR °C
Exó 1	aatggatgcctgaagtggaagag tggtgggaagatgaaggtctggac	432	60
Exó 2A	cagatttctccactcctgactctgg gcaagctccggccccagcc	404	59
Exó 2B	gctctttggtccacccaactagg ttccatctattccacctccgtgc	339	62
Exó 3	ggctcaccttagttctcagaccac cttcctgtagtcattccctcttg	482	56

La reacció de PCR es va realitzar en un volum final de 25µl, amb 50-100ng de DNA genòmic. Les condicions de termociclat varen ser, 4' a 95°C, 35 cicles de, 30'' a 95°C, 30'' 60°C (exó 1), 59°C (exó 2a), 62°C (exó 2b) i 56°C (exó 3) amb 5' d'extensió a 74°C.

Les condicions de temperatura i temps de carrera són diferents per a cada fragment analitzat, intentant, però, visualitzar tant la doble cadena com la simple. Les condicions optimitzades estan descrites a la taula 53,

Taula 53**Condicions d'anàlisi de SSCP/HD**

Fragment	gel	T ^a	Temps
Exó 1	Excel Gel	15°C	3h 45min
Exó 2a*	Gel vertical 12%	4°C	16h
Exó 2b*	Gel vertical 12%	4°C	16h
Exó 2a	Excel Gel	15°C	3h 45min
Exó 2b	Excel Gel	15°C	3h 45min
Exó 3	Excel Gel	15°C	3h 45min

Anàlisi de *CDSN*

Es varen analitzar per restricció les variants *CDSN1240 (G/T)* i *CDSN1243 (C/T)* amb digestió amb *MspI* i *HphI* respectivament tal com es descriu a Ahnini i col·l., 1999 (Tazi Ahnini et al. 1999). Els al·lells de referència són *CDSN1240 +2 (G)* amb una diana *MspI* i *CDSN 1243 (C)* amb una diana *HphI*.

Anàlisi de *POU5F1*

Les variants *POU5F1 +2 (T/G)* i *+5856 (A/G)* es varen analitzar per restricció amb *MnII* i *HindIII* tal com es descriu a González i col·l., 2000 (Gonzalez et al. 2000). Els al·lells de referència són *POU5F1 +2 (T)*, amb una diana *MnII*, i *POU5F1+ 5856(G)* (anomenat al·lel B), sense la diana *HindIII*.

Anàlisi de *HLA-Cw6*

L'anàlisi de la variant *Cw*6* es va realitzar per restricció, primer amb *Sma I* tal com es descriu a Ahnini i col·l., 1999 (Tazi Ahnini et al. 1999), i posteriorment amb digestions seqüencials amb *MspAII* i *DdeI* que detecten SNPs en les posicions +102 +142 i +213 les quals permeten definir l'al·lel *Cw*6* de forma inequívoca, tal i com descriu a Tatari i col·l., 1995 (Tatari et al. 1995).

Anàlisi de microsatèl·lits

L'anàlisi de microsatèl·lits es va realitzar mitjançant amplificació per PCR i visualització amb gels d'acrilamida.

L'anàlisi es va realitzar amb gels verticals d'acrilamida i visualitzats per tinció manual amb plata en cas que els marcadors fossin no fluorescents, o de forma automàtica amb gels verticals de seqüència

(seqüenciadors automàtics ABI 377 i 373, Foster City) o en electroforesi en capil·lar (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Foster City) en cas que els encebadors fossin marcats amb fluorescència.

Anàlisi de *CFTR*

L'anàlisi de la regió codificadora i zones flanquejants del *CFTR* va ser realitzada mitjançant SCCPs/HD (taula 56), i per DGGes (gels denaturants en gradient) sense cap modificació tal i com descriu Costes i col·l., 1993 (Costes et al. 1993).

L'anàlisi de la variant 470M/V en l'exó 10 va ser estudiada de forma específica per anàlisi de restricció i visualització en gels d'agarosa (Cuppens et al. 1994). La variant IVS8-(T)_n en l'intró 8, es va analitzar per DGGes (Fanen et al. 1992) o amb una PCR *nested* i visualització amb gels d'acrilamida (Chillon et al. 1995). La variant IVS8-(TG)_m va ser analitzada per seqüenciació directa en els cas dels individus portadors de la variant IVS8-(T)₅, amb els encebadors; 19D1 (5'-*aaa ata tct gac aaa ctc atc*) i 19R2 (5'-*aaa ata cct tcc agc act ac*).

La reacció de PCR es va realitzar en un volum final de 25µl, amb 50-100 ng de DNA genòmic. Les condicions de termociclat varen ser, 4' a 95°C, 35 cicles de, 30'' a 95°C, 30'' d'anellat amb temperatures entre 54-57°C amb 5' d'extensió a 74°C. A la taula 54 es resumeix la seqüència dels encebadors, la mida de l'amplificat i les condicions d'anàlisi utilitzades per a l'anàlisi de *CFTR*. Les condicions han estat posades a punt durant un llarg temps d'experiència, per l'equip de diagnòstic de FQ del Centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'IRO.

Anàlisi de *ADRB2*

L'anàlisi de la variant *ADRB2 Gly16Arg* es va realitzar per restricció amb els encebadors 5' *cct tct tgc tgg cac ccc at 3'* i 5' *gga agt cca aaa ctc gca cc 3'* (a partir de la seqüència d'*ADRB2* GDB:J02960).

Els fragments es varen visualitzar en gels d'acrilamida 6% i tinció amb bromur d'etidi després de digestió amb *Nco I*. Els al·lells de referència són *ADRB2 gly16(G)* amb una diana *NcoI* i *ADRB2 arg16(C)* sense diana *NcoI*.

La variant *ADRB2Gln27Glu* es va analitzar per amplificació amb primers específics i visualització en agarosa, tal com està descrit (Turki et al. 1995). Els al·lells de referència són *ADRB2 gln 27 (C)* i *ADRB2 glu 27 (G)*.

Taula 54

Resum de les seqüències dels encebadors utilitzats i les condicions optimitzades per l'anàlisi de SSCP/HD dels fragments

Fragment	Encebadors	Amplificat (pb)	PCR (c°)	Temps (hrs)
Exó 1*	gcaccagagtagtagtct acacgccctcctttctgtg	192	57	1:45
Exó 2	gaccaaatacagtgaaatctg ggctcaagcaatcctctca	334	55	1:45
Exó 4	tcacatagtgatgacctct gtaccagctcactactaatt	436	55	2
Exó 6a*	ttagtgtgctcagaaccacg ctatgatagcagcagctctg	385	54	1:45
Exó 6b*	aataatgcccatctgtgataa gagtggaagtgtaccatca	31	54	1:45
Exó 7*	agaccatgctcagatcttccat gcaaagttcattagaactgat	410	54	2
Exó 10*	gcagagtacctgaaacagga cattcacagtagcttaccca	493	55	2:15
Exó 13a*	tgctaaaatacagacatattgca cagaatctggtactaaggacag	532	55	2:30
Exó 13b*	ctcaatccaatacactatagaa tacacctatcctaatcctatgat	498	55	2:15
Exó 16	aatgcctctactgtgac gcaatagacaggaactcaa	294	54	1:30
Exó 17a	aagaaataaacactgacacact gaatctcaaatagctctatagc	294	54	1:30
Exó 19	atttctgttagttcattgaaaa gttcagactctgcaaatataa	588	56	2:45
Exó 22*	cataagctttcagaactcctg gttcacctgaaagcagcctat	339	54	1:45
Exó 24	tttgagcctgtgccactttct agctccaattccatgaggtga	362	54	1:45

* seqüències originàriament descrites per . Les altres seqüències han estat modificades pels membres del grup de FQ de l'IRO amb l'objectiu d'incrementar l'eficàcia de l'amplificació
El temps de carrera està referit a l'anàlisi feta amb el

Anàlisi de *CD14*

L'anàlisi de la variant del promotor *CD14-159(C/T)* es va realitzar per restricció amb *AvaII* segons està descrit (Baldini et al. 1999). Els al·lels de referència són *CD14-159 (C)*, sense diana *AvaII* i *CD14-159 (T)*, amb una diana *AvaII*.

L'anàlisi de la variant *CD14 +1344 (G/C)* a l'exó 2 es va realitzar per restricció amb *HPF4H*, prèvia amplificació amb els encebadors *5'gga taa cct gac act gga cg 3'* i *5' tgg atc tta ggc aaa gcc cc 3'* (a partir de la seqüència de *CD14* GDB:X13334).

Anàlisi d'*IL4-R*

L'anàlisi de les variants I50V i Q551R es va realitzar parcialment per ASO i restricció amb encebadors modificats en el cas de Q551R, tal i com està descrit (Mitsuyasu et al. 1999). Posteriorment es varen analitzar els canvis E375A, C406R, S411L, S478P i V554L a més de l'estudiat Q551R, tots ells a l'exó 12. Els canvis varen ser analitzats per amplificació i clonació d'un fragment de 1657 pb amb posterior seqüenciament del fragment complet. L'anàlisi de la seqüència va permetre composar els haplotips individuals pels canvis de l'exó 12 (Lozano et al. 2001).

Anàlisi de *TNF*

L'anàlisi de la variant *TNF-308 (G/A)* es va realitzar mitjançant hibridació radioactiva amb oligonucleòtids específics (ASO radioactiva) segons està descrit (Moffatt i Cookson 1997). Els al·lels de referència són *TNF1 (G)* i *TNF2 (A)*.

Anàlisi de *Lta*

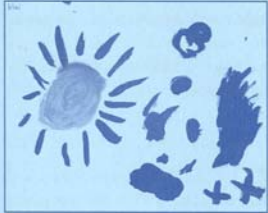
L'anàlisi de la variant *Lta* es va realitzar per restricció amb *NcoI* tal i com està descrit (Moffatt i Cookson 1997). Els al·lels de referència són *Lta1* amb una diana *NcoI* i *Lta 2 sense diana NcoI*.

Annex 2

En aquest annex s'adjunta els qüestionaris i butlletins informatius que es van dissenyar durant el procés d'allistament d'individus en l'estudi.

Díptic informatiu de l'estudi de psoriasi
qüestionari *PSORIGEN*
qüestionari *ASMAGEN*
qüestionari Enquesta de Símtomes Respiratoris
en Portadors de Mutacions en *CFTR*.

¿Tiene usted psoriasis?



ESTUDIO GENÉTICO DE LA PSORIASIS EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

Lea este folleto

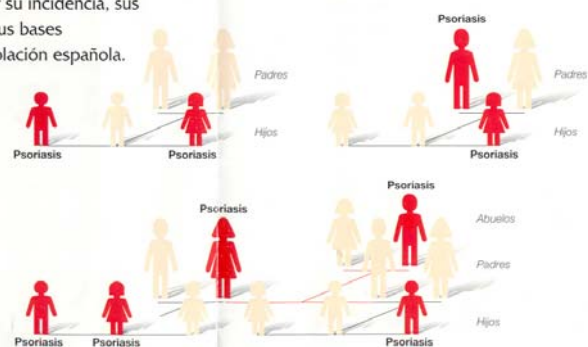
Usted puede colaborar

La psoriasis es una enfermedad crónica, inflamatoria y no infecciosa de la piel que afecta aproximadamente a un 2% de la población. Aunque no se conoce el origen de la enfermedad, se sabe que es un proceso multifactorial en el que participan factores genéticos y ambientales.

El Servicio de Dermatología y el Servicio de Genética Médica y Molecular del Hospital Clínic de Barcelona, en colaboración con Glaxo Wellcome, van a realizar un estudio epidemiológico sobre la psoriasis, con el objetivo de evaluar su incidencia, sus formas clínicas, y sus bases genéticas en la población española.

Si usted padece psoriasis, y pertenece a una familia en la que hay más miembros que también la padecen, tanto ellos como usted pueden participar voluntariamente en el estudio.

En los siguientes ejemplos se representan los modelos más habituales de manifestación de la psoriasis en familias:



ASMAGEN**ID:****1-CENTRO:****SERVICIO:****2-FACULTATIVO:****3-PACIENTE** (PUEDE AÑADIRSE ETIQUETA):

APELLIDOS:

NOMBRE:

SEXO: HOMBRE MUJER

EDAD / FECHA DE NACIMIENTO:

4-DATOS FAMILIARES / GENEALOGIA:**POBLACION Y PROVINCIA DE ORIGEN:**

PACIENTE:

PADRE: ABUELO PATERNO:

ABUELA PATERNA:

MADRE: ABUELO MATERNO:

ABUELA MATERNA:

CONSANGUINEIDAD: SI NO

OTROS FAMILIARES CON ASMA, DERMATITIS ATÓPICA, RINITIS, POLIPOSIS, CONJUNTIVITIS:

 NO SI _____

FAMILIARES CON OTRAS ALERGIAS CONOCIDAS:

 NO SI _____TABAQUISMO MADRE PADRE CUIDADORES NO PACIENTECANTIDAD <10 c.d. 10-30 c.d. >30 c.d.SINTOMATOLOGÍA AHOGOS SIBILANCIAS TOS**HÁBITAT**ANIMALES DOMÉSTICOS SI _____ NOMOQUETA SI NOZONA DE RESIDENCIA RURAL URBANA INDUSTRIAL**DIBUJAR ARBOL GENEALOGICO (3 GENERACIONES):**
 HOMBRE ASMA/ATOPIA
 MUJER ASMA/ATOPIA
 HOMBRE SANO
 MUJER SANA
 PACIENTE FALLECIDO
 MATRIMONIO
 MATRIMONIO CONSANGUINEO

Especificar al lado de cada símbolo las alteraciones clínicas relacionadas (atopia, rinitis, otros)

5-DATOS CLINICOSLACTANCIA MATERNA MIXTA ARTIFICIALDERMATITIS ATÓPICA: SI NOEDAD DE INICIO: _____ AÑOS DE EVOLUCIÓN _____ INGRESOS UCI: SI NO

PRICK _____

RAST POSITIVO A _____ IgE _____

EOSINÓFILOS EN PLASMA (FASE ESTABLE) _____ EN MOCO _____

CLASIFICACIÓN DEL ASMA: GRAVE MODERADA LEVE CRÓNICADIAGNÓSTICO RINITIS IgE DEPENDIENTE SI → BHR → SI → CLÍNICA FUNCIONAL NO NO ASMA IgE DEPENDIENTE ETIOLOGÍA _____ ASMA IgE NO DEPENDIENTE CON CARGA FAMILIAR ALÉRGICA ASMA IgE NO DEPENDIENTE SIN CARGA FAMILIAR ALÉRGICA

PSORIGEN**ID:** (NO RELLENAR)**1-CENTRO:****SERVICIO:****2-FACULTATIVO:****3-PACIENTE** (PUEDE AÑADIRSE ETIQUETA):

APELLIDOS:

NOMBRE:

SEXO: HOMBRE MUJER

EDAD / FECHA DE NACIMIENTO:

TELÉFONO:

4-DATOS FAMILIARES / GENEALOGIA:*POBLACION Y PROVINCIA DE ORIGEN:*

PACIENTE:

PADRE: ABUELO PATERNO:

ABUELA PATERNA:

MADRE: ABUELO MATERNO:

ABUELA MATERNA:

*FAMILIARES:*CONSANGUINEIDAD: SI NOOTROS FAMILIARES CON PSORIASIS: SI NO

*EN CASO NEGATIVO INDICAR: N° DE HERMANOS: _____ N° DE HIJOS: _____

***EN CASO AFIRMATIVO DIBUJAR ARBOL GENEALOGICO EN EL REVERSO:**
 HOMBRE AFECTO
 MUJER AFECTA
 HOMBRE SANO
 MUJER SANA
 PACIENTE FALLECIDO
 MATRIMONIO
 MATRIMONIO CONSANGUINEO
5-DATOS CLINICOS*FECHA DE INICIO:**MORFOLOGIA DE LAS LESIONES:*
 GUTTATA
 PLACAS
 PEQUEÑAS
 MEDIANAS
 GRANDES
 PUSTULAS
 ERITRODERMIA
LOCALIZACION:
 CARA
 C. CABELLUDO
 TRONCO
 P. MANOS
 P. PIES
 BESS
 BEII
 UÑAS
 PLEGUES
 ARTICULACIONES
ARTROPATIA: SI NO*EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS:*
 BIOPSIA
 ANALITICA
 RADIOLOGIA
HÁBITOS TÓXICOS:
FUMADOR <10 c.d.
 10-30 c.d.
 >30 c.d.
ALCOHOL DIARIO
 FIN DE SEMANA
 OCASIONAL
 VINO, CERVEZA, CAVA
 LICORES
ENFERMEDADES INFECCIOSAS CRÓNICAS:
 HEPATITIS CRÓNICA
 OTROS
OTRAS ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS SI _____ NO

Annex 3

En aquest annex s'adjunta els resultats del triatge de *CFTR* de les mostres de pacients amb asma

analitzats i dels grup d'individus de la població general analitzats.

		1	2	3	4	5	6a	(TTGA)	7	8	9	Poly TG	Poly T	10	M470V	11	12	15a	15b	14a	14b	15	16	17a	17b	18	19	20	21	22	23	24			
asma adult	SB-1	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N			
asma adult	SB-3	185 G/C	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
asma adult	SB-4	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N		
asma adult	SB-6	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N		
asma adult	SB-9	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	11 10	59	470 M/M	N	1898+12 T/A	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	4521 G/A		
asma adult	SB-10	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 A/A	N	N	N	N	N			
asma adult	SB-12	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
asma adult	SB-14	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	77		470 M/M	N	N	N	N	N	2694 G/O	N	N	N	N	N	N	4002 A/G	N	N	N	N	N	4521 A/A	
asma adult	SB-15	185 G/C	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-16	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-17	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-20	N	N	N	N	N	875+90 A/G		67	N	N	N	12 11	58	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 A/A	N	N	N	N	N	N	4521 A/A
asma adult	SB-22	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-24	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-25	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-26	N	N	N	N	406.6 T/C	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-30	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1716 G/A	470 M/M	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-32	N	N	N	N	N	875+90 A/G		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	R1060C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-34	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-35	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-36	N	N	R75Q	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-37	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-40	N	N	N	N	N	875+90 A/G		67	N	N	N	79	dalP808	470 M/M	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-43	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-45	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-47	N	N	R75Q	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-49	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-50	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-52	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-53	125 G/C	N	N	N	N	N		66	N	N	N	79		470 M/M	N	1898+152 A/A	N	N	N	2694 G/O	N	N	N	N	N	3898+129 dalAT T12001	4002 A/G	N	N	N	N	N	4521 G/A	
asma adult	SB-55	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-56	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	79		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-58	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-61	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-63	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-64	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-65	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-67	N	N	N	N	N	N		77	N	N	na	77		470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-68	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-69	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79		470 M/M	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	T11421	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-70	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-73	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77	1716 G/A	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-74	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-75	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-77	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77	dup1716+51961	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-79	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-80	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-82	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-92	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A R1162L	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-95	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	77	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-96	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-97	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	4002 A/G	N	N	N	N	N	4521 A/A
asma adult	SB-99	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	77		470 M/M	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	
asma adult	SB-105	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	79		470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-107	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-109	N	N	N	N	N	N		66	N	N	N	99		470 M/M	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A
asma adult	SB-111	N	N	N	N	N	N		67	N	N	N	79	1525-41 A/O	470 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
asma adult	SB-112	N	N	N	N	N	N		77	N	N	N	77		470 M/V	N	1898+152 T/A	R668C	N	2694 T/O	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	N	4521 G/A	
asma adult	SB-113	N	N																																

		1	2	3	4	5	6a	6b	7	8	9	Poly T	10	11	12	13a	13b	14a	14b	15	16	17a	17b	18	19	20	21	22	23	24			
control	2M	195 G/C	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	2P	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	3M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	8M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	9M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	9P	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
control	17M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A	
control	20M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A	
control	20P	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	25M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	29M	195 G/C	N	N	N	N	875+90 A/G	67	N	N	na	TT	1535-61 A/G	970 M/M	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	3001-65 C/A	9002 A/G	N	N	N	9521 G/A	
control	29P	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A	
control	31P	125 G/C	N	N	N	N	N	66	N	N	N	TT	970 M/M	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	36M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	9002 A/G	N	N	N	9521 G/A	
control	36P	N	N	N	N	N	N	67	N	N	na	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A	
control	37M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	AS39E	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	37P	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	39M	125 G/C	N	N	N	N	N	66	N	N	N	TT	970 M/M	N	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	39P	N	N	N	N	N	875+90 A/G	77	N	N	N	TT	970 M/M	N	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	3001-65 A/A	N	N	N	N	9521 A/A	
control	40M	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
control	40P	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	41M	125 G/C	N	N	N	N	N	66	N	N	N	TT	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	41P	N	N	N	N	N	N	76	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/M	VS601	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	42M	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/M	N	N	N	N	9699 G/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	N	
control	98-1104	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	na	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	98-67	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	98-48	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-204	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-195	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-115	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-103	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-68	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-46	N	N	N	N	N	875+90 A/G	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-39	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-19	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	97-9	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	96-365	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2699 A/G	N	N	N	N	N	N
control	96-354	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1716 G/A	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-247	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-171	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-160	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	96-141	195 G/C	N	N	N	N	N	67	N	N	N	19 19	57	1535-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
control	96-92	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9521 G/A
control	96-222	N	N	N	N	N	875+90 A/G	77	N	N	N	TT	N	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-243	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-100	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	3601-65 C/A	N	N	N	N	9521 G/A	
control	96-90	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	96-80	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	96-8	N	N	N	N	N	N	77	N	N	N	TT	N	970 V/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	96-3	125 G/C	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	9699 T/G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	97-202	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	97-154	N	N	N	N	N	N	67	N	N	N	TT	1525-61 A/G	970 M/V	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	na	
control	97-131	N																															

REFERÈNCIES ---

Referències i informació dels programes d'anàlisi genètica utilitzats

MLINK / FASTLINK

ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/linkage_and_mapping/FASTLINK/fastlink

G. M. Lathrop and J.-M. Lalouel, Easy Calculations of *Lod scores* and Genetic Risks on Small Computers, *American Journal of Human Genetics*, 36(1984), pp. 460-465.

G. M. Lathrop, J.-M. Lalouel, and R. L. White, Construction of Human Genetic Linkage Maps: Likelihood Calculations for *Multilocus* Analysis, *Genetic Epidemiology* 3(1986), pp. 39-52.

WEBprelink

<http://linkage.rockefeller.edu/gui/webprelink>

W. Li, V.F.G. Haghighi, T.C. Matise, J. Ott, "Using web browser as the graphical user interface for linkage analysis", *American Journal of Human Genetics*, supplement, 59, #1782 (1996)

LINKUTIL package

<http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>

2LD

<http://linkage.rockefeller.edu/software/>

SimIBD

http://watson.hgen.pitt.edu/register/soft_doc.html

Davis S, Schroeder M, Goldin LR, Weeks DE (1996) Nonparametric Simulation-Based Statistics for Detecting Linkage in General Pedigrees. *American Journal of Human Genetics* 58:867-880

GENEHUNTER v1.0, v2.0 i v2.1

<http://www.fhcrc.org/labs/kruglyak/Downloads/index.html>

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and Nonparametric Linkage Analysis: A Unified Multipoint Approach. *American Journal of Human Genetics* 58:1347-1363

GENEHUNTER imprinting v1.3 i GENEHUNTER two-locus v1.3

<http://www.meb.uni-bonn.de/imbie/mitarbeiter/strauch/>

K. Strauch, R. Fimmers, T. Kurz, K.A. Deichmann, T.F. Wienker, and M.P. Baur. "Parametric and Nonparametric Multipoint Linkage. Analysis with Imprinting and Two-Locus-Trait Models: Application to Mite Sensitization". *American Journal of Human Genetics* 66:1945-1957, 2000.

SLINK

<http://linkage.rockefeller.edu/software/slink>

Ott J (1989) Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4175-4178

Cottingham Jr RW, Idury RM, Schaffer AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53:252-263

Weeks DE, Ott J, Lathrop GM (1990) SLINK: a general simulation program for linkage analysis. *Am J Hum Genet* 47(3):A204 (Supplement)

PMPLUS /EH PLUS (*Estimating Haplotype-frequencies*)

<http://linkage.rockefeller.edu/software/eh>

Zhao JH, Curtis D, Sham PC. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered* 2000; 50: 133-139.

GAS (Genetic Analysis System)

<http://linkage.rockefeller.edu/software/gas>

Lathrop GM. Estimating genotype relative risks. *Tissue Antigens* 1983; 22: 160-166.

GENEPOP (population genetics software package)

<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>

Powercalculator

<http://www.stat.ucla.edu/powercalculator>

Referències i informació en bases de dades electròniques

Acció Psoriasi	http:// www.psoriasi.org
Asthma Gene Database	http://cooke.gsf.de/asthmagen
EBI (European Bioinformatics Institute, UK)	http://srs.ebi.ac.uk
Cataleg de gens humans amb empremta genètica	http://www.otago.ac.nz/IGC
CEPH-Généthon, Centre des études des polymorphisms humaines	http://www.cephb.fr
European Molecular Biology Laboratory, Germany(http://www.embl-heidelberg.de/
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
SNPs database	http://snp.cshl.org/
The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/
The Genome Data Base (GDB)	http://gdbwww.gdb.org/
Marshfield, The Center for Medical Genetics	http://research.marshfieldclinic.org/genetics/
National Center for Biotechnology Information, on NIH, USA (NCBI)	http://www.NCBI.nlm.nih.gov/
Webprelink	http://linkage.rockefeller.edu/gui/webprelink
Web resources of genetic linkage analysis	http://linkage.rockefeller.edu/

Bibliografia

- Abdelilah S, Latifa K, Esra N, Cameron L, Bouchaib L, Nicolaides N, Levitt R, Hamid Q (2001) Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release. *J Immunol* 166:2768-74.
- Abele D, Dobson R, Grahan J, Hil C (1963) Heredity and psoriasis. *Archi Dermatol* 88:38-47.
- Agarwal S, Avni O, Rao A (2000) Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* 12:643-52
- Aiyer R, Aggarwal B (1987) Tumour necrosis factors. In: Podock E (ed) *CRC handbook of Cytolytic Lymphocytes and complement as Effectors of the Immune System*. CRC Press, Boca Raton
- Akai S, Okayama H, Shimura S, Tanno Y, Sasaki H, Takishima T (1992) Delta F508 mutation of cystic fibrosis gene is not found in chronic bronchitis with severe obstruction in Japan. *Am Rev Respir Dis* 146:781-3.
- Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN (1998) Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 28:578-84.
- Alexis N, Eldridge M, Reed W, Bromberg P, Peden DB (2001) CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 107:31-5.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-8.
- Algermissen B, Sitzmann J, LeMotte P, Czarnetzki B (1996) Differential expression of CRABP II, psoriasin and cytokeratin 1 mRNA in human skin diseases. *Arch Dermatol Res* 288:426-30.
- Aligne CA, Auinger P, Byrd RS, Weitzman M (2000) Risk factors for pediatric asthma. Contributions of poverty, race, and urban residence. *Am J Respir Crit Care Med* 162:873-7.
- Allen G, Harvald B, Shields J (1967) Measures of twin concordance. *Acta Genet Stat Med* 17:475-81
- Allen M, Ishida-Yamamoto A, McGrath J, Davison S, Iizuka H, Simon M, Guerrin M, Hayday A, Vaughan R, Serre G, Trembath R, Barker J (2001) Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. *Lab Invest* 81:969-76.
- Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC, Barker JN (1999) A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 353:1589-90.
- Amelung PJ, Panhuysen CI, Postma DS, Levitt RC, Koeter GH, Francomano CA, Bleecker ER, Meyers DA (1992) Atopy and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosomes 11q and 6p. *Clin Exp Allergy* 22:1077-84.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A (1992) Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *Jama* 267:1794-7.
- Anto JM, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Suarez-Cervera M, Vazquez L (1989) Community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. Toxicological Committee. *N Engl J Med* 320:1097-102.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-34.
- Asumalahti K, Laitinen T, Ikonen-Vatjus R, Lokki ML, Suomela S, Snellman E, Saarialho-Kere U, Kere J (2000) A candidate gene for psoriasis near HLA-C, HCR (Pg8), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele. *Hum Mol Genet* 9:1533-42.
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, Elomaa O, Moser M, de Cid R, Ripatti S, Vorechovsky I, Marcusson JA, Nakagawa H, Lazaro C, Estivill X, Capon F, Novelli G, Saarialho-Kere U, Barker J, Trembath R, Kere J (2002) Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 11:589-97.
- ATS. American Thoracic Society Committee on diagnostic standards for nontuberculous diseases (1962) Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. A statement by American Thoracic Society. *American Review Respiratory disease* 85:762
- Avni O, Rao A (2000) T cell differentiation: a mechanistic view. *Curr Opin Immunol* 12:654-9.
- Badano J, Katsanis N (2002). Beyond Mendel: An evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Gen* 3: 779-789
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6259-63.
- Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD (1999) A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:976-83.
- Baldini M, Vercelli D, Martinez FD (2002) Review article CD14: an example of gene by environment interaction in allergic disease. *Allergy* 57:188-92.

- Barbera J.A, Cosío M.G (1995) Enfermedades obstructivas de las vías aéreas. In: Rozman C (ed) Medicina interna. Vol I. Mosby / Doyma, Barcelona, pp 734-754
- Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG (1996) Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* 37:41-50.
- Barnes PJ (2000) Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest* 117:10S-4S.
- Barnes RI, Wilson RH, Young M, Kuykendahl L, Cao K, Fernandez-Vina M, Menter A, Bowcock AM (1998) Mapping of psoriasis susceptibility loci reveals evidence for HLA-dependent and HLA-independent loci. *The American Journal of Human Genetics* 63:A281
- Basagana X, Sunyer J, Zock JP, Kogevinas M, Urrutia I, Maldonado JA, Almar E, Payo F, Anto JM (2001) Incidence of asthma and its determinants among adults in Spain. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1133-7.
- Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD (1993) Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med* 178:1271-81.
- Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD (1995) Intralesional T-lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 105:89S-94S.
- Batten J, Muir D, Simon G, Cedric C (1963) *The Lancet*:1348-1350
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress- inducible MICA. *Science* 285:727-9.
- Bazaraal M, Orgel HA, RN H (1974) Genetics of IgE and allergy: serum IgE levels in twins. *J Allergy Clin Immunol* 5:228-304
- Becker JW, Burke W, McDonald G, Greenberger PA, Henderson WR, Aitken ML (1996) Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis and atopy in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 109:1536-40.
- Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, Trent JM (1998) Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9979-84.
- Becklake MR, Ernst P (1997) Environmental factors. *Lancet* 350 Suppl 2:SIII10-3.
- Bellido JB, Sunyer J (1997) [The evolution of mortality due to asthma in the age groups 5-34 and 5- 44. Spain, 1975-1991]. *Gac Sanit* 11:171-5.
- Bentley AM, Durham SR, Kay AB (1994) Comparison of the immunopathology of extrinsic, intrinsic and occupational asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 4:222-32.
- Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB (1992) Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 146:500-6.
- Bernhard JD (1996) Clinical differences in juvenile vs adult-onset psoriasis. *Br J Dermatol* 135:501-2.
- Bertranpetit J, Calafell F (1996) Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: evolutionary considerations. *Ciba Found Symp* 197:97-114
- Beyer K, Nickel R, Freidhoff L, Bjorksten B, Huang SK, Barnes KC, MacDonald S, Forster J, Zepp F, Wahn V, Beaty TH, Marsh DG, Wahn U (2000) Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers. *J Invest Dermatol* 115:906-8.
- Bhalerao J, Bowcock AM (1998) The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet* 7:1537-45
- Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP (1989) Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337:187-9.
- Blumenthal MN, Namboodiri K, Mendell N, Gleich G, Elston RC, Yunis E (1981) Genetic transmission of serum IgE Levels. *Am J Med Genet* 10:219-28
- Bodner C, Godden D, Ross S, Little J, Douglas JG, Legge J, Seaton A, Friend J (1999) Bronchial hyperresponsiveness and adult onset wheeze: the influence of atopy. *Eur Respir J* 14:335-8.
- Bodner C, Ross S, Douglas G, Little J, Legge J, Friend J, Godden D (1997) The prevalence of adult onset wheeze: longitudinal study. *Bmj* 314:792-3.
- Bodner CH, Ross S, Little J, Douglas JG, Legge JS, Friend JA, Godden DJ (1998) Risk factors for adult onset wheeze: a case control study. *Am J Respir Crit Care Med* 157:35-42.
- Boehnke M (2000) A look at linkage disequilibrium. *Nat Genet* 25:246-7.
- Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gile LS, Luisetti M, Pignatti PF (1998) Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet* 103:718-22.
- Bombieri C, Giorgi S, Carles S, de Cid R, Belpinati F, Tandoi C, Pallares-Ruiz N, Lazaro C, Ciminelli BM, Romey MC, Casals T, Pompei F, Gandini G, Claustres M, Estivill X, Pignatti PF, Modiano G (2000a) A new approach for identifying non-pathogenic mutations. An analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet* 106:172-8.
- Bombieri C, Luisetti M, Belpinati F, Zuliani E, Beretta A, Baccheschi J, Casali L, Pignatti PF (2000b)

- Increased frequency of CFTR gene mutations in sarcoidosis: a case/control association study. *Eur J Hum Genet* 8:717-20.
- Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:257-61.
- Boulet LP, Lavolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boutet M (1997) Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 112:45-52.
- Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A (2001) Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet* 10:1793-805.
- Brandrup F, Holm N, Grunnet N, Henningsen K, Hansen HE (1982) Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62:229-36.
- Brenner W, Gschnait F, Mayr WR (1978) HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch Dermatol Res* 262:337-9.
- Bruderman I, Cohen R, Shachor J, Horowitz I (1987) Bronchial response to methacholine in parents of asthmatic children. *Chest* 91:210-3.
- Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H (1994) Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 24:73-80.
- Bubien JK (2001) CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pflugers Arch* 443:S36-9.
- Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP (1996) Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 335:1799-805.
- Burden AD, Javed S, Bailey M, Hodgins M, Connor M, Tillman D (1998) Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol* 110:958-60.
- Burney P (1998) Ten years of research on asthma in Europe. The European Community Respiratory Health Survey. *Rev Epidemiol Sante Publique* 46:491-6.
- Burney PG, Chinn S, Rona RJ (1990) Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the national study of health and growth 1973-86. *Bmj* 300:1306-10.
- Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D (1994) The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 7:954-60.
- Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L (1999) Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet* 65:183-91.
- Capon F, Novelli G, Semprini S, Clementi M, Nudo M, Vultaggio P, Mazzanti C, Gobello T, Botta A, Fabrizi G, Dallapiccola B (1999a) Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol* 112:32-5.
- Capon F, Semprini S, Chimenti S, Fabrizi G, Zambruno G, Murgia S, Carcassi C, Fazio M, Mingarelli R, Dallapiccola B, Novelli G (2001) Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 116:728-30.
- Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, Novelli G (1999b) Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *Am J Hum Genet* 65:1798-800.
- Carroll JM, Romero MR, Watt FM (1995) Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83:957-68.
- Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X (1997) High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* 101:365-70.
- Castellani C, Benetazzo MG, Bonizzato A, Pignatti PF, Mastella G (1999) Cystic fibrosis mutations in heterozygous newborns with hypertrypsinemia and low sweat chloride. *Am J Hum Genet* 64:303-4.
- Castellani C, Gomez Lira M, Frulloni L, Delmarco A, Marzari M, Bonizzato A, Cavallini G, Pignatti P, Mastella G (2001) Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in idiopathic pancreatitis. *Hum Mutat* 18:166.
- Castro J, Telleria JJ, Linares P, Blanco-Quiros A (2000) Increased TNFA*2, but not TNFB*1, allele frequency in Spanish atopic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10:149-54.
- Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, Fitzgerald JM, Sandford AJ (1999) 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* 160:278-82.
- Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, Kurland HH, Karasek MA, Wilkinson DI, Carlo DJ, et al. (1994) CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9282-6.
- Chen JH, Schulman H, Gardner P (1989) A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis. *Science* 243:657-60.

- Chia NV, Stuart P, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT (2001) Variations in the HCR (Pg8) gene are unlikely to be causal for familial psoriasis. *J Invest Dermatol* 116:823-4.
- Chiba-Falek O, Parad RB, Kerem E, Kerem B (1999) Variable levels of normal RNA in different fetal organs carrying a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splicing mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1998-2002.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332:1475-80.
- Christophers E, Sterry W (1993) Psoriasis. In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen A, Freeman GJ (eds) *Dermatology in General Medicine*. Vol II
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 3:151-6.
- CIBA. Foundation Guest Symposium (1959) Terminology, definition and clasification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax* 14:286
- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS (1998) Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 339:653-8.
- Collee JM, ten Kate LP, de Vries HG, Kliphuis JW, Bouman K, Scheffer H, Gerritsen J (1993) Allele sharing on chromosome 11q13 in sibs with asthma and atopy. *Lancet* 342:936.
- Cook PW, Pittelkow MR, Piepkorn M (1999) Overexpression of amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a psoriasis-like cutaneous phenotype. *J Invest Dermatol* 113:860.
- Cooke RA, Van der Veer A (1916) Human sensitization. *Journal of Immunology* 16:201-205
- Cookson WO, Hopkin JM (1988) Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet* 1:86-8.
- Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM (1989) Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1:1292-5.
- Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE, Coleman R, Leaves NI, Trembath RC, Moffatt MF, Harper JI (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27:372-3.
- Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y, Nakumura Y, et al. (1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340:381-4.
- Corey M, Edwards L, Levison H, Knowles M (1997) Longitudinal analysis of pulmonary function decline in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 131:809-14.
- Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, Alves H, et al. (1998) New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10746-50.
- Costes B, Fanen P, Goossens M, Ghanem N (1993) A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 2:185-91
- Counahan R, Mearns MB (1975) Prevalence of atopy and exercise-induced bronchial lability in relatives of patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 50:477-81.
- Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA (1994) A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* 264:707-10.
- CSGA T (1997) A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat Genet* 15:389-92.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 101:487-96.
- Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, De Boeck C, Cassiman JJ (1994) CFTR haplotype backgrounds on normal and mutant CFTR genes. *Hum Mol Genet* 3:607-14.
- Dahl M, Nordestgaard BG, Lange P, Tybjaerg-Hansen A (2001) Fifteen-year follow-up of pulmonary function in individuals heterozygous for the cystic fibrosis phenylalanine-508 deletion. *J Allergy Clin Immunol* 107:818-23.
- Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Nordestgaard BG (1998) DeltaF508 heterozygosity in cystic fibrosis and susceptibility to asthma. *Lancet* 351:1911-3.
- D'Amato M, Scotto d'Abusco A, Maggi E, Menna T, Sacerdoti G, Maurizio SM, Iozzino S, De Santo C, Oreste U, Tosi R, D'Amato G, Baltadijeva D, Bjorksten B, Freidhoff LR, Lahoz C, Marsh DG, Rashef A, Ruffilli A (1996) Association of responsiveness to the major pollen allergen of *Parietaria officinalis* with HLA-DRB1* alleles: a multicenter study. *Hum Immunol* 46:100-6.
- D'Amato M, Vitiani LR, Petrelli G, Ferrigno L, di Pietro A, Trezza R, Matricardi PM (1998) Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with beta2- adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. *A*

- population study. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1968-73.
- Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO (1996) A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383:247-50.
- Davis P (1989) Airway responsiveness and atopy in cystic fibrosis. In: Weiss S, Sparrow D (eds) *Airway responsiveness and atopy in the development of chronic lung disease*. Raven Press, New York
- Davis PB, Vargo K (1987) Pulmonary abnormalities in obligate heterozygotes for cystic fibrosis. *Thorax* 42:120-5.
- Davis S, Schroeder M, Goldin LR, Weeks DE (1996) Nonparametric simulation-based statistics for detecting linkage in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 58:867-80.
- de Cid R, Chomel JC, Lazaro C, Sunyer J, Baudis M, Casals T, Le Moual N, Kitzis A, Feingold J, Anto J, Estivill X, Kauffmann F (2001a) CFTR and asthma in the French EGEA study. *Eur J Hum Genet* 9:67-9.
- de Cid R, Volpini V, Almasy L, Otero D, Estivill X, Lazaro C (2001b) [Analysis of psoriasis susceptibility regions in the Spanish population: evidence of a major gene involved in psoriasis in the 6p21 region]. *Med Clin (Barc)* 117:49-51.
- de Meeus A, Guittard C, Desgeorges M, Carles S, Demaille J, Claustres M (1998) Linkage disequilibrium between the M470V variant and the IVS8 polyT alleles of the CFTR gene in CBAVD. *J Med Genet* 35:594-6.
- De Rie MA, Cairo I, Van Lier RA, Bos JD (1996) Expression of the T-cell activation antigens CD27 and CD28 in normal and psoriatic skin. *Clin Exp Dermatol* 21:104-11.
- De Sanctis GT, Merchant M, Beier DR, Dredge RD, Grobholz JK, Martin TR, Lander ES, Drazen JM (1995) Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nat Genet* 11:150-4.
- Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen FT, Witt CS, Abraham LJ, Dawkins RL (1992) Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Hum Immunol* 34:242-52.
- Deichmann KA, Schmidt A, Heinzmann A, Kruse S, Forster J, Kuehr J (1999) Association studies on beta2-adrenoceptor polymorphisms and enhanced IgE responsiveness in an atopic population. *Clin Exp Allergy* 29:794-9.
- Dewar JC, Wheatley AP, Venn A, Morrison JF, Britton J, Hall IP (1998) Beta2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clin Exp Allergy* 28:442-8.
- Dewar JC, Wilkinson J, Wheatley A, Thomas NS, Doull I, Morton N, Lio P, Harvey JF, Liggett SB, Holgate ST, Hall IP (1997) The glutamine 27 beta2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families. *J Allergy Clin Immunol* 100:261-5.
- Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, et al. (2000) Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1812-8.
- Dizier MH, Sandford A, Walley A, Philippi A, Cookson W, Demenais F (1999) Indication of linkage of serum IgE levels to the interleukin-4 gene and exclusion of the contribution of the (-590 C to T) interleukin-4 promoter polymorphism to IgE variation. *Genet Epidemiol* 16:84-94.
- Dizier MH, Hill M, James A, Faux J, Ryan G, le Souef P, Lathrop M, Musk AW, Demenais F, Cookson W (1995) Detection of a recessive major gene for high IgE levels acting independently of specific response to allergens. *Genet Epidemiol* 12:93-105
- Dodge R, Cline MG, Burrows B (1986) Comparisons of asthma, emphysema, and chronic bronchitis diagnoses in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 133:981-6.
- Donfack J, Tsalenko A, Hoki DM, Parry R, Solway J, Lester LA, Ober C (2000) HLA-DRB1*01 alleles are associated with sensitization to cockroach allergens. *J Allergy Clin Immunol* 105:960-6.
- Dong Q, Louahed J, Vink A, Sullivan CD, Messler CJ, Zhou Y, Haczku A, Huaux F, Arras M, Holroyd KJ, Renauld JC, Levitt RC, Nicolaides NC (1999) IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice. *Eur J Immunol* 29:2130-9.
- Dong YJ, Chao AC, Kouyama K, Hsu YP, Bocian RC, Moss RB, Gardner P (1995) Activation of CFTR chloride current by nitric oxide in human T lymphocytes. *Embo J* 14:2700-7.
- Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, Holgate T, Morton NE (1996) Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1280-4.
- Drazen JM, Takebayashi T, Long NC, De Sanctis GT, Shore SA (1999) Animal models of asthma and chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 2:37-47.
- Duffy DL, Healey SC, Chenevix-Trench G, Martin NG, Weger J, Lichter J (1995) Atopy in Australia. *Nat Genet* 10:260.
- Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 142:1351-8.
- Duffy DL, Spelman LS, Martin NG (1993) Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol* 29:428-34.

- Dumur V, Lafitte JJ, Gervais R, Debaecker D, Kesteloot M, Lalau G, Roussel P (1990) Abnormal distribution of cystic fibrosis delta F508 allele in adults with chronic bronchial hypersecretion. *Lancet* 335:1340.
- Dupre D, Audrezet MP, Ferec C (2000) Atopy and a mutation in the interleukin-4 receptor gene. *N Engl J Med* 343:69-70.
- ECRHS (1996) Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J* 9:687-95.
- Edfors-Lubs ML (1971) Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 26:249-85.
- Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ (1999) Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104:1001-6.
- Elder JT, Astrom A, Pettersson U, Tavakkol A, Griffiths CE, Krust A, Kastner P, Chambon P, Voorhees JJ (1992) Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J Invest Dermatol* 98:673-9.
- Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ (1994) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 130:216-24.
- Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N, Christophers E, Voorhees JJ (2001) The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137:1447-54.
- Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Billings JK, Brown MD, Headington JT, Cooper KD, Baadsgaard O, Duell EA, Annesley TM, et al. (1986) Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *Jama* 256:3110-6.
- Elston RC, Guo X, Williams LV (1996) Two-stage global search designs for linkage analysis using pairs of affected relatives. *Genet Epidemiol* 13:535-58.
- Elston RC, Stewart J (1971) A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered* 21:523-42.
- Enerback C, Martinsson T, Inerot A, Wahlstrom J, Enlund F, Yhr M, Swanbeck G (1997) Evidence that HLA-Cw6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Acta Derm Venereol* 77:273-6.
- Enerback C, Nilsson S, Enlund F, Inerot A, Samuelsson L, Wahlstrom J, Swanbeck G, Martinsson T (2000) Stronger association with HLA-Cw6 than with corneodesmosin (S-gene) polymorphisms in Swedish psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 292:525-30.
- Engelkamp D, Schafer BW, Mattei MG, Erne P, Heizmann CW (1993) Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6547-51.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M, Torinsson A, Martinsson T, Swanbeck G (1999a) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered* 49:2-8.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M, Torinsson A, Riley J, Swanbeck G, Martinsson T (1999b) Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* 7:783-90.
- Epstein EH, Jr. (1996) The genetics of human skin diseases. *Curr Opin Genet Dev* 6:295-300.
- Estivill X (1996) Complexity in a monogenic disease. *Nat Genet* 12:348-50.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 10:135-54.
- Falk CT, Rubinstein P (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* 51:227-33.
- Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M (1992) Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 13:770-6.
- Farber EM, Nall ML (1974) The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* 148:1-18.
- Farber EM, Nall ML, Watson W (1974) Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol* 109:207-11.
- Farrer LA, Cupples LA (1998) Determining the genetic component of a complex diseases. In: Haines JL, Pericak-Vance MA (eds) *Approaches to Gene Mapping in Complex Diseases*. Wiley-Liss, Inc, New York, pp 93-129.
- Ferrandiz C, Bordas X, Garcia-Patos V, Puig S, Pujol R, Smandia A (2001) Prevalence of psoriasis in Spain (Epiderma Project: phase I). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15:20-3.
- Ferrandiz C, Pujol RM, Garcia-Patos V, Bordas X, Smandia JA (2002) Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J Am Acad Dermatol* 46:867-73.
- Ferrero E, Goyert SM (1988) Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD14. *Nucleic Acids Res* 16:4173.
- Fischer GF, Pickl WF, Fae I, Ebner C, Ferreira F, Breiteneder H, Vikoukal E, Scheiner O, Kraft D (1992) Association between IgE response against Bet v I, the major allergen of birch pollen, and HLA-DRB alleles. *Hum Immunol* 33:259-65.
- Foissac A, Crouau-Roy B, Faure S, Thomsen M, Cambon-Thomsen A (1997) Microsatellites in the HLA

- region: on overview. *Tissue Antigens* 49:197-214.
- Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, Mahalingam S, McKenzie AN, Rothenberg ME, Young IG, Matthaei KI, Webb DC (2001) Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* 179:173-81.
- Fraki JE, Briggaman RA, Lazarus GS (1982) Uninvolved skin from psoriatic patients develops signs of involved psoriatic skin after being grafted onto nude mice. *Science* 215:685-7.
- Fried RG, Friedman S, Paradis C, Hatch M, Lynfield Y, Duncanson C, Shalita A (1995) Trivial or terrible? The psychosocial impact of psoriasis. *Int J Dermatol* 34:101-5.
- Frizzell RA (1995) Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Am J Respir Crit Care Med* 151:S54-8.
- Fry L (1988) Psoriasis. *Br J Dermatol* 119:445-61.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266:107-9.
- Gao PS, Mao XQ, Baldini M, Roberts MH, Adra CN, Shirakawa T, Holt PG, Martinez FD, Hopkin JM (1999) Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. *Clin Genet* 56:164-5.
- Gao PS, Mao XQ, Kawai M, Enomoto T, Sasaki S, Tanabe O, Yoshimura K, Shaldon SR, Dake Y, Kitano H, Coull P, Shirakawa T, Hopkin JM (1998) Negative association between asthma and variants of CC16(CC10) on chromosome 11q13 in British and Japanese populations. *Hum Genet* 103:57-9.
- Gasparini P, Savoia A, Luisetti M, Peona V, Pignatti PF (1990) The cystic fibrosis gene is not likely to be involved in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:297-9.
- Gerrard JW, Rao DC, Morton NE (1978) A genetic study of immunoglobulin E. *Am J Hum Genet* 30:46-58.
- Gervais R, Lafitte JJ, Dumur V, Kesteloot M, Lalau G, Houdret N, Roussel P (1993) Sweat chloride and delta F508 mutation in chronic bronchitis or bronchiectasis. *Lancet* 342:997.
- Gomez Lira M, Benetazzo MG, Marzari MG, Bombieri C, Belpinati F, Castellani C, Cavallini GC, Mastella G, Pignatti PF (2000) High frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator mutation L997F in patients with recurrent idiopathic pancreatitis and in newborns with hypertrypsinemia. *Am J Hum Genet* 66:2013-4.
- Gonzalez S, Martinez-Borra J, Del Rio JS, Santos-Juanes J, Lopez-Vazquez A, Blanco-Gelaz M, Lopez-Larrea C (2000) The OTF3 gene polymorphism confers susceptibility to psoriasis independent of the association of HLA-Cw*0602. *J Invest Dermatol* 115:824-8.
- Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, Gonzalez-Roces S, Sanchez del Rio J, Rodriguez Perez A, Brautbar C, Lopez-Larrea C (1999) The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 42:1010-6.
- Gottlieb AB (1990) Immunologic mechanisms in psoriasis. *J Invest Dermatol* 95:18S-19S.
- Gottlieb DJ, Beiser AS, O'Connor GT (1995a) Poverty, race, and medication use are correlates of asthma hospitalization rates. A small area analysis in Boston. *Chest* 108:28-35.
- Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG (1995b) Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1:442-7.
- Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD (2000) A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 105:506-13.
- Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A (1998) Polymorphisms of the beta chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fepsilon RI-beta) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1487-92.
- Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB (1995a) Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:25-33.
- Green SA, Turki J, Hall IP, Liggett SB (1995b) Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. *Pulm Pharmacol* 8:1-10.
- Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB (1994) Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33:9414-9.
- Greenberg DA, Abreu PC (2001) Determining trait locus position from multipoint analysis: accuracy and power of three different statistics. *Genet Epidemiol* 21:299-314.
- Greenberger PA (1988) Allergic bronchopulmonary aspergillosis and fungoses. *Clin Chest Med* 9:599-608.
- Grimbacher B, Holland SM, Puck JM (1998) The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 338:1073-4.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T (2001) Costimulation of

- CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-60.
- Gross NJ (1980) What is this thing called love? --or, defining asthma. *Am Rev Respir Dis* 121:203-4.
- Grupo español del estudio europeo del asma (1995) Estudio Europeo del Asma: Prevalencia de síntomas relacionados con el asma en cinco áreas españolas. *medicina clínica* 104:483-491
- Grupo español del estudio europeo del asma (1996) Prevalencia de síntomas relacionados con el asma en cinco áreas españolas. *Med Clin (Barc)* 106
- Guedjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA, Runarsdottir EH, Gulcher JR, Stefansson K, Valdimarsson H (2002) HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with Psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *J Invest Dermatol* 118:362-5.
- Guerrin M, Simon M, Montezin M, Haftek M, Vincent C, Serre G (1998) Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with the product of the S gene and allows improved characterization of its processing during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:22640-7.
- Gupta MA, Gupta AK (1995) Age and gender differences in the impact of psoriasis on quality of life. *Int J Dermatol* 34:700-3.
- Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM (2001) A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest* 108:527-36.
- Haczku A, Takeda K, Hamelmann E, Oshiba A, Loader J, Joetham A, Irvin C, Kikutani H, Gelfand EW (1997) CD23 deficient mice develop allergic airway hyperresponsiveness following sensitization with ovalbumin. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1945-55.
- Hall IP, Wheatley A, Wilding P, Liggett SB (1995) Association of Glu 27 beta 2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet* 345:1213-4.
- Hallett WY, Knudson AG, Jr., Massey FJ, Jr. (1965) Absence of detrimental effect of the carrier state for the cystic fibrosis gene. *Am Rev Respir Dis* 92:714-24.
- Hamelmann E, Gelfand EW (1999) Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 120:8-16.
- Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ, Jr., Blumenthal MN (1991) Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 48:873-9.
- Hardas BD, Zhao X, Zhang J, Longqing X, Stoll S, Elder JT (1996) Assignment of psoriasis to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 106:753-8.
- Hasko G, Deitch EA, Nemeth ZH, Kuhel DG, Szabo C (2002) Inhibitors of ATP-Binding Cassette Transporters Suppress Interleukin-12 p40 Production and Major Histocompatibility Complex II Up-Regulation in Macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 301:103-10.
- Hasstedt SJ, Meyers DA, Marsh DG (1983) Inheritance of immunoglobulin E: genetic model fitting. *Am J Med Genet* 14:61-6.
- Hauser ER, Boehnke M (1998) Genetic linkage analysis of complex genetic traits by using affected sibling pairs. *Biometrics* 54:1238-46.
- Hayden CM, Goldblatt J, LeSouef PN (2000) A novel polymorphism (g1344G>C) in exon 2 of the CD14 gene. *Hum Mutat* 15:122.
- Heinzmann A, Grotherr P, Jerkic SP, Lichtenberg A, Braun S, Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (2000a) Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13-24. *Clin Exp Allergy* 30:1555-61.
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, et al. (2000b) Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 9:549-59.
- Helgreen L (1967) Psoriasis: The prevalence in sex, age and occupational groups in total populations in Sweden. Morphology, inheritance and association with other skin and rheumatic diseases, Stockholm
- Henseler T, Christophers E (1985) Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13:450-6.
- Henseler T, Christophers E (1995) Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 32:982-6.
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA (1997) The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337:1720-5.
- Hewett D, Samuelsson L, Polding J, Enlund F, Smart D, Cantone K, See CG, Chadha S, Inerot A, Enerback C, Montgomery D, Christodolou C, Robinson P, Matthews P, Plumpton M, Wahlstrom J, Swanbeck G, Martinsson T, Roses A, Riley J, Purvis I (2002) Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map. *Genomics* 79:305-14.
- Hijazi Z, Haider MZ, Khan MR, Al-Dowaisan AA (1998) High frequency of IgE receptor Fc epsilonRIbeta variant (Leu181/Leu183) in Kuwaiti Arabs and its association with asthma. *Clin Genet* 53:149-52.
- Hill MR, Cookson WO (1996) A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilonRI-beta E237G): associations with measures of atopy and

- bronchial hyper-responsiveness. *Hum Mol Genet* 5:959-62.
- Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO (1995) Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *Bmj* 311:776-9.
- Hizawa N, Freidhoff LR, Chiu YF, Ehrlich E, Luehr CA, Anderson JL, Duffy DL, Dunston GM, Weber JL, Huang SK, Barnes KC, Marsh DG, Beaty TH (1998) 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* 102:436-42.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Ohnuma N, Kodama N, Kojima J, Ohe M, Kawakami Y (1995) Association between high serum total IgE levels and D11S97 on chromosome 11q13 in Japanese subjects. *J Med Genet* 32:363-9.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Ohe M, Itoh A, Furuya K, Ohnuma N, Kawakami Y (1992) Lack of linkage between atopy and locus 11q13. *Clin Exp Allergy* 22:1065-9.
- Hoey T, Schindler U (1998) STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:582-7.
- Hohler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, de Vlam K, Veys E, Marker-Hermann E (2002) Differential association of polymorphisms in the TNFalpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 61:213-8.
- Hohler T, Kruger A, Schneider PM, Schopf RE, Knop J, Rittner C, Meyer zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E (1997) A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 109:562-5.
- Holgate T (2000) *Asthma and Rhinitis*. Blackwell Science, Oxford
- Holloway JW, Lonjou C, Beghe B, Peng Q, Gaunt TR, Gomes I, Hall IP, Dewar JC, Wilkinson J, Thomas NS, Holgate ST, Morton NE (2001) Linkage analysis of the 5q31-33 candidate region for asthma in 240 UK families. *Genes Immun* 2:20-4.
- Holroyd KJ, Martinati LC, Trabetti E, Scherpbier T, Eleff SM, Boner AL, Pignatti PF, Kiser MB, Dragwa CR, Hubbard F, Sullivan CD, Grasso L, Messler CJ, Huang M, Hu Y, Nicolaidis NC, Buetow KH, Levitt RC (1998) Asthma and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region. *Genomics* 52:233-5.
- Hopes E, McDougall C, Christie G, Dewar J, Wheatley A, Hall IP, Helms PJ (1998) Association of glutamine 27 polymorphism of beta 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study. *Bmj* 316:664.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG (1984) Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol* 73:265-70.
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER (2002) Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 70:230-6.
- Huang MT, Yang YH, Lin YT, Lu MY, Wang LH, Tsai MJ, Chiang BL (2001) Beta2-agonist exerts differential effects on the development of cord blood T cells but not on peripheral blood T cells. *Pediatr Allergy Immunol* 12:17-20.
- Hughes JM, Rimmer SJ, Salome CM, Hodge L, Liu-Brennan D, Woolcock AJ, Armour CL (2001) Eosinophilia, interleukin-5, and tumour necrosis factor-alpha in asthmatic children. *Allergy* 56:412-8.
- Hull J, Thomson AH (1998) Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 53:1018-21.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-5.
- Immervoll T, Loesgen S, Dutsch G, Gohlke H, Herbon N, Klugbauer S, Dempfle A, Bickeboller H, Becker-Follmann J, Ruschendorf F, Saar K, Reis A, Wichmann HE, Wjst M (2001) Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum Mutat* 18:327-36.
- ISAAC (1998) Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 12:315-35.
- Iselius L, Williams WR (1984) The mode of inheritance of psoriasis: evidence for a major gene as well as a multifactorial component and its implication for genetic counselling. *Hum Genet* 68:73-6
- Ishihara M, Yamagata N, Ohno S, Naruse T, Ando A, Kawata H, Ozawa A, Ohkido M, Mizuki N, Shiina T, Ando H, Inoko H (1996) Genetic polymorphisms in the keratin-like S gene within the human major histocompatibility complex and association analysis on the susceptibility to psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 48:182-6.
- Ismaili J, Olislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M (2002) Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol* 103:296-302.
- Jansen DF, Timens W, Kraan J, Rijcken B, Postma DS (1997) (A)symptomatic bronchial hyper-responsiveness and asthma. *Respir Med* 91:121-34.
- Jarvis D, Luczynska C, Chinn S, Burney P (1995) The association of age, gender and smoking with total

- IgE and specific IgE. *Clin Exp Allergy* 25:1083-91.
- Jenisch S, Henseler T, Nair RP, Guo SW, Westphal E, Stuart P, Kronke M, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT (1998) Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/-C region. *Am J Hum Genet* 63:191-9.
- Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE, Westphal E, Voorhees JJ, Christophers E, Kronke M (1999) Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 54:439-49.
- Jenkins MA, Hopper JL, Bowes G, Carlin JB, Flander LB, Giles GG (1994) Factors in childhood as predictors of asthma in adult life. *Bmj* 309:90-3.
- Jetten AM (1990) Multi-stage program of differentiation in human epidermal keratinocytes: regulation by retinoids. *J Invest Dermatol* 95:44S-46S.
- Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, Madsen P, Rasmussen HH, Gesser B, Etzerodt M, Honore B, Celis JE, Thestrup-Pedersen K (1996) Psoriasin: a novel chemotactic protein. *J Invest Dermatol* 107:5-10.
- Kamitani A, Wong ZY, Dickson P, van Herwerden L, Raven J, Forbes AB, Abramson MJ, Walters EH, Harrap SB (1997) Absence of genetic linkage of chromosome 5q31 with asthma and atopy in the general population. *Thorax* 52:816-7.
- Kapsenberg ML, Hilkens CM, Wierenga EA, Kalinski P (1999) The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 2:33-6.
- Karakoc F, Remes ST, Martinez FD, Wright AL (2002) The association between persistent eosinophilia and asthma in childhood is independent of atopic status. *Clin Exp Allergy* 32:51-6.
- Kauffmann F, Chomel JC, Kitzis A, Feingold J (1998) DeltaF508 heterozygosity and asthma. EGEA Co-operative Group. *Lancet* 352:985-6; discussion 986-7.
- Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, Ecochard D, Feingold J, Gormand F, Grimfeld A, Lathrop M, Matran R, Neukirch F, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Vervloet D, Lockhart A (1999) EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy)-- descriptive characteristics. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:17-21.
- Kauppi P, Laitinen LA, Laitinen H, Kere J, Laitinen T (1998) Verification of self-reported asthma and allergy in subjects and their family members volunteering for gene mapping studies. *Respir Med* 92:1281-8.
- Kauppi P, Laitinen T, Ollikainen V, Mannila H, Laitinen LA, Kere J (2000) The IL9R region contribution in asthma is supported by genetic association in an isolated population. *Eur J Hum Genet* 8:788-92.
- Kere J (2001) Human population genetics: lessons from Finland. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:103-28
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-80.
- Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1075-82.
- Kimura K, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yokouchi Y, Takeda K, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H (1999) Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population. *Hum Mol Genet* 8:1487-90.
- Kleeberger SR, Levitt RC, Zhang LY, Longphre M, Harkema J, Jedlicka A, Eleff SM, DiSilvestre D, Holroyd KJ (1997) Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice. *Nat Genet* 17:475-8.
- Kleeberger SR, Reddy S, Zhang LY, Jedlicka AE (2000) Genetic susceptibility to ozone-induced lung hyperpermeability: role of toll-like receptor 4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:620-7.
- Kligman D, Hilt DC (1988) The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13:437-43.
- Knight JC, Kwiatkowski D (1999) Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 111:290-8.
- Kogevinas M, Anto JM, Soriano JB, Tobias A, Burney P (1996) The risk of asthma attributable to occupational exposures. A population-based study in Spain. Spanish Group of the European Asthma Study. *Am J Respir Crit Care Med* 154:137-43.
- Koller DY, Urbanek R, Gotz M (1995) Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 152:629-33.
- Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M (1996) Regulation of epidermal expression of keratin K17 in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 107:569-75.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 31:241-7.
- Konstantinova NV, Duong DM, Remenyik E, Hazarika P, Chuang A, Duvic M (1996) Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in

- those derived from psoriatic fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107:615-21.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G (1993) Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-8.
- Koppelman GH, Meijer GG, Postma DS (1999) Defining asthma in genetic studies. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:1-4.
- Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER (2001) Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 163:965-9.
- Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ (2000) Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine* 12:110-9.
- Krueger GG, Duvic M (1994) Epidemiology of psoriasis: clinical issues. *J Invest Dermatol* 102:14S-18S.
- Kruglyak L (1999) Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22:139-44.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347-63.
- Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (1999) The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96:365-71.
- Kruse S, Mao XQ, Heinzmann A, Blattmann S, Roberts MH, Braun S, Gao PS, Forster J, Kuehr J, Hopkin JM, Shirakawa T, Deichmann KA (2000) The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic PAF-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma. *Am J Hum Genet* 66:1522-30.
- Ku DH, Chang CD, Koniecki J, Cannizzaro LA, Boghosian-Sell L, Alder H, Baserga R (1991) A new growth-regulated complementary DNA with the sequence of a putative trans-activating factor. *Cell Growth Differ* 2:179-86.
- Kuster H, Zhang L, Brini AT, MacGlashan DW, Kinet JP (1992) The gene and cDNA for the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. *J Biol Chem* 267:12782-7.
- Lacy P, Moqbel R (2000) Eosinophil cytokines. *Chem Immunol* 76:134-55.
- Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G, O'Brien R, Gelfand EW, Born W, Kanehiro A (1999) Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med* 5:1150-6.
- Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Konowal A, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK (2001) gammadelta T cells as regulators of airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 125:203-10.
- Laing IA, Hermans C, Bernard A, Burton PR, Goldblatt J, Le Souef PN (2000) Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161:124-7.
- Laing IA, Goldblatt J, Eber E, Hayden CM, Rye PJ, Gibson NA, Palmer LJ, Burton PR, Le Souef PN (1998) A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. *J Med Genet* 35:463-7.
- Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J (2001) A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 28:87-91.
- Laitinen T, Kauppi P, Ignatius J, Ruotsalainen T, Daly MJ, Kaariainen H, Kruglyak L, Laitinen H, de la Chapelle A, Lander ES, Laitinen LA, Kere J (1997) Genetic control of serum IgE levels and asthma: linkage and linkage disequilibrium studies in an isolated population. *Hum Mol Genet* 6:2069-76.
- Laitinen T, Ollikainen V, Lazaro C, Kauppi P, de Cid R, Anto JM, Estivill X, Lokki H, Mannila H, Laitinen LA, Kere J (2000) Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 161:700-6.
- Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11:241-7.
- Lander ES, Green P (1987) Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2363-7.
- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48.
- Lassalle P, Gosset P, Delneste Y, Tsicopoulos A, Capron A, Joseph M, Tonnel AB (1993) Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 94:105-10.
- Lawrence S, Beasley R, Doull I, Begishvili B, Lampe F, Holgate ST, Morton NE (1994) Genetic analysis of atopy and asthma as quantitative traits and ordered polychotomies. *Ann Hum Genet* 58:359-68.
- Lazaro C, de Cid R, Sunyer J, Soriano J, Gimenez J, Alvarez M, Casals T, Anto JM, Estivill X (1999) Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma. *Hum Mutat* 14:510-9.
- Leal SM, Ott J (2000) Effects of stratification in the analysis of affected-sib-pair data: benefits and costs. *Am J Hum Genet* 66:567-75.
- Leaves NI, Bhattacharyya S, Wiltshire S, Cookson WO (2002) A detailed genetic map of the

- chromosome 7 bronchial hyper- responsiveness locus. *Eur J Hum Genet* 10:177-82.
- Lee FI, Bellary SV, Francis C (1990) Increased occurrence of psoriasis in patients with Crohn's disease and their relatives. *Am J Gastroenterol* 85:962-3.
- Lee YA, Ruschendorf F, Windemuth C, Schmitt-Egenolf M, Stadelmann A, Nurnberg G, Stander M, Wienker TF, Reis A, Traupe H (2000) Genomewide scan in German families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet* 67:1020-4.
- Lensmar C, Nord M, Gudmundsson GH, Roquet A, Andersson O, Jornvall H, Eklund A, Grunewald J, Agerberth B (2000) Decreased pulmonary levels of the anti-inflammatory Clara cell 16 kDa protein after induction of airway inflammation in asthmatics. *Cell Mol Life Sci* 57:976-81.
- LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, Vercelli D (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 167:5838-44.
- Levitt RC, Eleff SM, Zhang LY, Kleeberger SR, Ewart SL (1995) Linkage homology for bronchial hyperresponsiveness between DNA markers on human chromosome 5q31-q33 and mouse chromosome 13. *Clin Exp Allergy* 25 Suppl 2:61-3.
- Lie BA, Todd JA, Pociot F, Nerup J, Akselsen HE, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Ronningen KS, Thorsby E, Undlien DE (1999) The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. *Am J Hum Genet* 64:793-800.
- Lipworth B, Koppelman GH, Wheatley AP, Le Jeune I, Coutie W, Meurs H, Kauffman HF, Postma DS, Hall IP (2002) Beta2 adrenoceptor promoter polymorphisms: extended haplotypes and functional effects in peripheral blood mononuclear cells. *Thorax* 57:61-6.
- Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA (1998) JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 10:271-8.
- Lomholt G (1963) Psoriasis: Prevalence, Spontaneous Course, and Genetics; a census study on the prevalence of skin diseases on the Faroe Islands. G.E.C. Gad
- Longo G, Strinati R, Poli F, Fumi F (1987) Genetic factors in nonspecific bronchial hyperreactivity. An epidemiologic study. *Am J Dis Child* 141:331-4.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Palys B, Schoni MH, Redemann B (1998) DeltaF508 heterozygosity and asthma. *Lancet* 352:985; discussion 986-7.
- Lozano F, Places L, Vila JM, Padilla O, Arman M, Gimferrer I, Suarez B, Lopez de la Iglesia A, Miserachs N, Vives J (2001) Identification of a novel single-nucleotide polymorphism (Val554Ile) and definition of eight common alleles for human IL4RA exon 11. *Tissue Antigens* 57:216-20.
- Ludin C, Hofstetter H, Sarfati M, Levy CA, Suter U, Alaimo D, Kilchherr E, Frost H, Delespesse G (1987) Cloning and expression of the cDNA coding for a human lymphocyte IgE receptor. *Embo J* 6:109-14.
- Luo J, Ji Y, Peng Y, Xiao J, Yao Y, Xu H, Yang M, Zhen J, Lu D, Jin L (1999) [Linkage analysis of chromosome 5 and asthma in a Chinese population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 16:318-20.
- McGraw DW, Forbes SL, Kramer LA, Liggett SB (1998) Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *J Clin Invest* 102:1927-32.
- Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Olsen E, Kiil J, Walbum E, Andersen AH, Basse B, et al. (1991) Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 97:701-12.
- Malerba G, Patuzzo C, Trabetti E, Lauciello MC, Galavotti R, Pescolliderung L, Whalen MB, Zanoni G, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF (2001) Chromosome 14 linkage analysis and mutation study of 2 serpin genes in allergic asthmatic families. *J Allergy Clin Immunol* 107(4):654-8.
- Malerba G, Lauciello MC, Scherpbier T, Trabetti E, Galavotti R, Cusin V, Pescolliderung L, Zanoni G, Martinati LC, Boner AL, Levitt RC, Pignatti PF (2000) Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1587-90.
- Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescolliderung L, Boner AL, Pignatti PF (1999) Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:27-30.
- Mallon E, Bunce M, Savoie H, Rowe A, Newson R, Gotch F, Bunker CB (2000) HLA-C and guttate psoriasis. *Br J Dermatol* 143:1177-82.
- Mallon E, Bunker CB (2000) HIV-associated psoriasis. *AIDS Patient Care STDS* 14:239-46.
- Mallon E, Newson R, Bunker CB (1999) HLA-Cw6 and the genetic predisposition to psoriasis: a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol* 113:693-5.
- Mansbridge JN, Knapp AM (1987) Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol* 89:253-63.
- Mansur AH, Bishop DT, Markham AF, Morton NE, Holgate ST, Morrison JF (1999) Suggestive evidence for genetic linkage between IgE

- phenotypes and chromosome 14q markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1796-802.
- Mao XQ, Shirakawa T, Kawai M, Enomoto T, Sasaki S, Dake Y, Kitano H, Hagihara A, Hopkin JM, Morimoto K (1998) Association between asthma and an intragenic variant of CC16 on chromosome 11q13. *Clin Genet* 53:54-6.
- Marchand E, Verellen-Dumoulin C, Mairesse M, Delaunois L, Brancalone P, Rahier JF, Vandenas O (2001) Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 119:762-7.
- Marenholz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D (2001) Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome Res* 11:341-55.
- Margaritte-Jeannin P, Clerget-Darpoux F, Hors J, Deschamps I (1995) Testing parental imprinting in insulin-dependent diabetes mellitus by the marker-association-segregation-chi² method. *Am J Hum Genet* 56:1080-7.
- Marquet S, Abel L, Hillaire D, Dessein H, Kalil J, Feingold J, Weissenbach J, Dessein AJ (1996) Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat Genet* 14:181-4.
- Marsh DG, Bias WB, Ishizaka K (1974) Genetic control of basal serum immunoglobulin E level and its effect on specific reaginic sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:3588-92.
- Marsh DG, Huang SK (1991) Molecular genetics of human immune responsiveness to pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 21 Suppl 1:168-72.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH (1994) Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264:1152-6.
- Marshall B, Leelayuwat C, Degli-Esposti MA, Pinelli M, Abraham LJ, Dawkins RL (1993) New major histocompatibility complex genes. *Hum Immunol* 38:24-9.
- Martinez FD (1997) Complexities of the genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S117-22.
- Martinez FD (1999) Maturation of immune responses at the beginning of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103:355-61.
- Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R (1997) Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest* 100:3184-8.
- Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Wright AL, Taussig LM (1994) Evidence for Mendelian inheritance of serum IgE levels in Hispanic and non-Hispanic white families. *Am J Hum Genet* 55:555-65.
- Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP (1998) Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1739-44.
- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ (1995) Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 332:133-8.
- Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J (2002) Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet* 70:257-64.
- Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, Simson L, Hogan SP, Koskinen A, McKenzie AN, Dent LA, Rothenberg ME, Matthaei KI, Young IG, Foster PS (2002) Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med* 195:1433-44.
- Mattes J, Yang M, Siqueira A, Clark K, MacKenzie J, McKenzie AN, Webb DC, Matthaei KI, Foster PS (2001) IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the il-4 α chain in the allergic lung. *J Immunol* 167:1683-92.
- Matthews D, Fry L, Powles A, Weber J, McCarthy M, Fisher E, Davies K, Williamson R (1996) Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet* 14:231-3.
- Matthews D, Fry L, Powles A, Weissenbach J, Williamson R (1995) Confirmation of genetic heterogeneity in familial psoriasis. *J Med Genet* 32:546-8.
- McGraw DW, Forbes SL, Kramer LA, Liggett SB (1998) Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *J Clin Invest* 102:1927-32.
- McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH (2001) Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2:1109-16.
- Meerschaert J, Busse WW, Bertics PJ, Mosher DF (2000) CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:780-7.
- Mennie M, Gilfillan A, Brock DJ, Liston WA (1995) Heterozygotes for the delta F508 cystic fibrosis allele are not protected against bronchial asthma. *Nat Med* 1:978-9.
- Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the

- first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 173:209-19.
- Meyers DA, Beaty TH, Freidhoff LR, Marsh DG (1987) Inheritance of total serum IgE (basal levels) in man. *Am J Hum Genet* 41:51-62.
- Meyers DA, Bias WB, Marsh DG (1982) A genetic study of total IgE levels in the Amish. *Hum Hered* 32:15-23
- Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER (1994) Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 23:464-70.
- Miller PW, Hamosh A, Macek M, Jr., Greenberger PA, MacLean J, Walden SM, Slavina RG, Cutting GR (1996) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet* 59:45-51.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM (1998) Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 19:119-20.
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K (1999) Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 162:1227-31.
- Moffatt MF, Cookson WO (1997) Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 6:551-4.
- Moffatt MF, Cookson WO (1998) The genetics of asthma. Maternal effects in atopic disease. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 1:56-61; discussion 65-6.
- Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, Schou C, Faux JA, Young RP, James AL, Ryan G, le Souef P, Musk AW, et al. (1994) Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses. *Lancet* 343:1597-600.
- Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO (1999) Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. *Thorax* 54:757-61.
- Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Cookson WO (1997) Germline TCR-A restriction of immunoglobulin E responses to allergen. *Immunogenetics* 46:226-30
- Moffatt MF, Sharp PA, Faux JA, Young RP, Cookson WO, Hopkin JM (1992) Factors confounding genetic linkage between atopy and chromosome 11q. *Clin Exp Allergy* 22:1046-51.
- Mohede IC, Van Ark I, Brons FM, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP (1996) Salmeterol inhibits interferon-gamma and interleukin-4 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 18:193-201.
- Morison IM, Paton CJ, Cleverley SD (2001) The imprinted gene and parent-of-origin effect database. *Nucleic Acids Res* 29:275-6.
- Morrall N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Jr., Kalaydjieva L, et al. (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7:169-75.
- Morton NE (1992) Major loci for atopy? *Clin Exp Allergy* 22:1041-3.
- Morton NE (1995) LODs past and present. *Genetics* 140:7-12.
- Morton NE (1998) Significance levels in complex inheritance. *Am J Hum Genet* 62:690-7.
- Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N (1997) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *Apmis* 105:838-42.
- Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N (2000) The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *Apmis* 108:329-35.
- Moss RB, Hsu YP, Olds L (2000) Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 120:518-25.
- Murray AB, Morrison BJ (1988) Passive smoking and the seasonal difference of severity of asthma in children. *Chest* 94:701-8.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164:5998-6004.
- Nair R, Chia NV, Jenisch S, Stuart P, Epperson T, Henseler T, Westphal E, Arndt JL, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT (1999) Investigation of TCF19 as a candidate gene for psoriasis susceptibility. Paper presented at The American Journal of Human Genetics
- Nair RP, Guo SW, Jenisch S, Henseler T, Lange EM, Terhune M, Westphal E, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT (1995) Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility: lack of evidence for a distal 17q locus. *Hum Hered* 45:219-30.
- Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 6:1349-56.

- Nair RP, Stuart P, Henseler T, Jenisch S, Chia NV, Westphal E, Schork NJ, Kim J, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT (2000) Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 66:1833-44.
- Naren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, Benos DJ, Quick MW, Kirk KL (1997) Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* 390:302-5.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 13:6361-73.
- NHLBI (1995) Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention NHLB/WHO workshop report. National Heart, Lung and Blood Institute- NIH
- NHLBI (1999) National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung and Blood Institute -NIH
- Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG (1997) Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics* 46:159-62.
- Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, Eleff SM, Kiser MB, Dragwa CR, Sullivan CD, Grasso L, Zhang LY, Messler CJ, Zhou T, Kleeberger SR, Buetow KH, Levitt RC (1997) Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13175-80.
- Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M (1991) A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* 100:70-5.
- Nijkamp FP, Engels F, Henricks PA, Van Oosterhout AJ (1992) Mechanisms of beta-adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses. *Physiol Rev* 72:323-67.
- Ninan TK, Russell G (1992) Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *Bmj* 304:873-5.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H (1998a) Evidence for linkage between the development of asthma in childhood and the T-cell receptor beta chain gene in Japanese. *Genomics* 47:121-4.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, Kawashima T, Kobayashi K, Hamaguchi H (1997) Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1390-3.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T, Yanagi H, Matsui A, Hamaguchi H (1998b) Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 28:449-53.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H (1999) Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor alpha gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 29:228-33.
- Noone PG, Pue CA, Zhou Z, Friedman KJ, Wakeling EL, Ganeshanathan M, Simon RH, Silverman LM, Knowles MR (2000) Lung disease associated with the IVS8 5T allele of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1919-24.
- Norris DA, Travers JB, Leung DY (1997) Lymphocyte activation in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 109:1-4.
- Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R (1998) Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Mol Genet* 7:1393-8.
- Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, King RA, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER, Cox NJ (2000a) Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 66:517-26.
- Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ (2000b) A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 67:1154-62.
- O'Brien KP, Holm SJ, Nilsson S, Carlen L, Rosenmuller T, Enerback C, Inerot A, Stahle-Backdahl M (2001) The HCR gene on 6p21 is unlikely to be a psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol* 116:750-4.
- O'Connor GT, Weiss ST (1994) Clinical and symptom measures. *Am J Respir Crit Care Med* 149:S21-8; discussion S29-30.
- Oka A, Tamiya G, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Makino S, Shiina T, Yoshitome M, Iizuka M, Sasao Y, Iwashita K, Kawakubo Y, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H (1999) Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 8:2165-70.

- Onay T, Zielenski J, Topaloglu O, Gokgoz N, Kayserili H, Apak MY, Camcioglu Y, Cokugras H, Akcakaya N, Tsui LC, Kirdar B (2001) Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Biol* 73:191-203.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl:S121-31.
- O'Shea JJ, Visconti R, Cheng TP, Gadina M (2000) Jaks and stats as therapeutic targets. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1:i115-8.
- Ott J (1999) *Analysis of Human Linkage*. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Palmer LJ, Daniels SE, Rye PJ, Gibson NA, Tay GK, Cookson WO, Goldblatt J, Burton PR, LeSouef PN (1998) Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1825-30.
- Panhuysen CI, Bleecker ER, Koeter GH, Meyers DA, Postma DS (1995) Dutch approach to the study of the genetics of asthma. *Clin Exp Allergy* 25 Suppl 2:35-8.
- Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder SW, Ponath PD, Andrew DP, Targan SR (2000) The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol* 165:5069-76.
- Penido C, Castro-Faria-Neto HC, Larangeira AP, Rosas EC, Ribeiro-dos-Santos R, Bozza PT, Henriques MG (1997) The role of gammadelta T lymphocytes in lipopolysaccharide-induced eosinophil accumulation into the mouse pleural cavity. *J Immunol* 159:853-60.
- Pereira E, Goldblatt J, Rye P, Sanderson C, Le Souef P (1998) Mutation analysis of interleukin-5 in an asthmatic cohort. *Hum Mutat* 11:51-4.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Jr., Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48:1034-50.
- Pier GB (2000) Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8822-8.
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82.
- Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M (1995) Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet* 4:635-9.
- Pilewski JM, Frizzell RA (1999) Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79:S215-55.
- Poller W, Faber JP, Scholz S, Olek K, Muller KM (1991) Sequence analysis of the cystic fibrosis gene in patients with disseminated bronchiectatic lung disease. Application in the identification of a cystic fibrosis patient with atypical clinical course. *Klin Wochenschr* 69:657-63.
- Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC (1995) Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 333:894-900.
- Ramsay CE, Hayden CM, Tiller KJ, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN (1999a) Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 29:1195-203.
- Ramsay CE, Hayden CM, Tiller KJ, Burton PR, Hagel I, Palenque M, Lynch NR, Goldblatt J, LeSouef PN (1999b) Association of polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene with higher levels of parasitic infection. *Hum Genet* 104:269-74.
- Rao DC, Gu C (2001) False positives and false negatives in genome scans. In: Rao DC, Province MA (eds) *Genetic dissection of complex traits*. Academic Press, St, Louis, pp 487-497
- Rao DC, Province MA (2001) *Genetic dissection of complex diseases*. Academic Press, San Louis
- Ravault C, Kauffmann F (2001) Validity of the IUATLD (1986) questionnaire in the EGEA study. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 5:191-6.
- Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB (1993) Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:334-9.
- Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labelouse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102:565-75.
- Rich SS, Roitman-Johnson B, Greenberg B, Roberts S, Blumenthal MN (1992) Genetic analysis of atopy in three large kindreds: no evidence of linkage to D11S97. *Clin Exp Allergy* 22:1070-6.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73.
- Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA (2000) Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel

- disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 66:1863-70.
- Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-7.
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405:847-56.
- Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, Chakraborty R, Hershey GK (2002) V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* 169:1604-10.
- Rivas MV, Jarvis ED, Morisaki S, Carbonaro H, Gottlieb AB, Krueger JG (1997) Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique. *J Invest Dermatol* 108:188-94.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326:298-304.
- Romagnani S (1991) Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12:256-7.
- Romagnani S (2001) T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:73-8.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-65.
- Rosbotham JL, Trembath RC, Glover M, Leigh I, Barker JN (1994) An association between psoriasis and hereditary multiple exostoses. A clue for the mapping of a psoriasis susceptibility gene? *Br J Dermatol* 130:671-4.
- Rosenstein BJ, Cutting GR (1998) The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 132:589-95.
- Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ (1972) Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med* 287:738-40.
- Sabria J, Anto JM, Sunyer J, Roca J, Morell F, Rodriguez-Roisin R, Rodrigo MJ, Codina R (1994) Clinical and functional characteristics of patients two years after being affected by the soybean asthma epidemic in Barcelona. *Thorax* 49:906-9.
- Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A, Yhr M, Inerot A, Enerback C, Wahlstrom J, Swanbeck G, Martinsson T (1999) A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 105:523-9.
- Sandford A, Weir T, Pare P (1996) The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1749-65.
- Sandford AJ, Weir TD, Pare PD (1997) Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 10:1380-91.
- Savage DB, Agostini M, Barroso I, Gurnell M, Luan J, Meirhaeghe A, Harding AH, Ihrke G, Rajanayagam O, Soos MA, George S, Berger D, Thomas EL, Bell JD, Meeran K, Ross RJ, Vidal-Puig A, Wareham NJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Schafer AJ (2002) Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. *Nat Genet* 31:379-84.
- Schmitt-Egenolf M, Boehncke WH, Stander M, Eiermann TH, Sterry W (1993) Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, -DQA1*0201, -DQB1*0303 extended haplotype. *J Invest Dermatol* 100:749-52.
- Schmitt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W (1996) Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303: a population- and family-based study. *J Invest Dermatol* 106:711-4.
- Schon MP, Detmar M, Parker CM (1997) Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4+ T cells. *Nat Med* 3:183-8.
- Schroeder SA, Gaughan DM, Swift M (1995) Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat Med* 1:703-5.
- Scott MG, Swan C, Jobson TM, Rees S, Hall IP (1999a) Effects of a range of beta2 adrenoceptor agonists on changes in intracellular cyclic AMP and on cyclic AMP driven gene expression in cultured human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 128:721-9.
- Scott MG, Swan C, Wheatley AP, Hall IP (1999b) Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene. *Br J Pharmacol* 126:841-4.
- Sears M (1992) Epidemiology. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC (eds) *Asthma: Basic mechanism and clinical management*. Academic Press, San Diego, pp 1-19
- Sears MR (1997) Epidemiology of childhood asthma. *Lancet* 350:1015-20.
- Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA (1989) The relative risks of sensitivity to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 19:419-24.
- Semprini S, Capon F, Bovolenta S, Bruscia E, Pizzuti A, Fabrizi G, Schietroma C, Zambruno G, Dallapiccola B, Novelli G (1999) Genomic structure, promoter characterisation and mutational analysis of the S100A7 gene: exclusion of a candidate for familial psoriasis susceptibility. *Hum Genet* 104:130-4.
- Serre G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Reano A, Ouhayoun JP, Bettinger S, Soleilhavoup JP (1991) Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed

- in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol* 97:1061-72.
- Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J (1998) Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 339:645-52.
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79:S23-45.
- Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K (1994a) Linkage between severe atopy and chromosome 11q13 in Japanese families. *Clin Genet* 46:228-32.
- Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM (1994b) Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 7:125-9.
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, Hopkin J (1996a) Association between atopic asthma and a coding variant of Fc epsilon RI beta in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 5:1129-30.
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Kawai M, Morimoto K, Hopkin JM (1996b) Association between Fc epsilon RI beta and atopic disorder in a Japanese population. *Lancet* 347:394-5.
- Sibbald B, Turner-Warwick M (1979) Factors influencing the prevalence of asthma among first degree relatives of extrinsic and intrinsic asthmatics. *Thorax* 34:332-7.
- Siegenthaler G, Tomatis I, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Eriksson U, Saurat JH (1992) Expression of CRABP-I and -II in human epidermal cells. Alteration of relative protein amounts is linked to the state of differentiation. *Biochem J* 287:383-9.
- Simon M, Montezin M, Guerrin M, Durieux JJ, Serre G (1997) Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J Biol Chem* 272:31770-6.
- Sluiter HJ, Koeter GH, de Monchy JG, Postma DS, de Vries K, Orie NG (1991) The Dutch hypothesis (chronic non-specific lung disease) revisited. *Eur Respir J* 4:479-89.
- Soriano JB, de Cid R, Estivill X, Anto JM, Sunyer J, Otero D, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Morell F, Rodrigo MJ, Ercilla G, Beaty TH, Lazaro C (2000) Association study of proposed candidate genes/regions in a population of Spanish asthmatics. *Eur J Epidemiol* 16:745-50
- Soriano JB, Ercilla G, Sunyer J, Real FX, Lazaro C, Rodrigo MJ, Estivill X, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Morell F, Anto JM (1997) HLA class II genes in soybean epidemic asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1394-8.
- Soriano JB, Tobias A, Kogevinas M, Sunyer J, Saez M, Martinez-Moratalla J, Ramos J, Maldonado JA, Payo F, Anto JM (1996) Atopy and nonspecific bronchial responsiveness. A population-based assessment. Spanish Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1636-40.
- Spielman RS, Ewens WJ (1996) The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 59:983-9.
- Steinle A, Groh V, Spies T (1998) Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12510-5.
- Stief A, Texido G, Sansig G, Eibel H, Le Gros G, van der Putten H (1994) Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. *J Immunol* 152:3378-90.
- Sturrock RF, Kimani R, Cottrell BJ, Butterworth AE, Seitz HM, Siongok TK, Houba V (1983) Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:363-71
- Summerhill E, Leavitt SA, Gidley H, Parry R, Solway J, Ober C (2000) beta(2)-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites. *Am J Respir Crit Care Med* 162:599-602.
- Sundberg JP, France M, Boggess D, Sundberg BA, Jenson AB, Beamer WG, Shultz LD (1997) Development and progression of psoriasiform dermatitis and systemic lesions in the flaky skin (fsn) mouse mutant. *Pathobiology* 65:271-86
- Sunyer J, Anto JM, Castellsague J, Soriano JB, Roca J (1996) Total serum IgE is associated with asthma independently of specific IgE levels. The Spanish Group of the European Study of Asthma. *Eur Respir J* 9:1880-4.
- Sunyer J, Spix C, Quenel P, Ponce-de-Leon A, Ponka A, Barumandzadeh T, Touloumi G, Bacharova L, Wojtyniak B, Vonk J, Bisanti L, Schwartz J, Katsouyanni K (1997) Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA Project. *Thorax* 52:760-5.
- Super M, Hambleton G, Corbett D (1998) DeltaF508 heterozygosity and asthma. *Lancet* 352:986.
- Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlstrom J (1994) A population genetic study of psoriasis. *Br J Dermatol* 131:32-9.
- Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlstrom J, Enerback C, Enlund F, Yhr M (1995) Age at onset and different types of psoriasis. *Br J Dermatol* 133:768-73.
- Swift M, Su Y (1998) DeltaF508 heterozygosity and asthma. *Lancet* 352:984; discussion 986-7.
- Symula DJ, Frazer KA, Ueda Y, Deneffe P, Stevens ME, Wang ZE, Locksley R, Rubin EM (1999)

- Functional screening of an asthma QTL in YAC transgenic mice. *Nat Genet* 23:241-4.
- Szeffler SJ, Ando R, Cicutto LC, Surs W, Hill MR, Martin RJ (1991) Plasma histamine, epinephrine, cortisol, and leukocyte beta-adrenergic receptors in nocturnal asthma. *Clin Pharmacol Ther* 49:59-68.
- Tagami H (1997) Triggering factors. *Clin Dermatol* 15:677-85.
- Takeda J, Seino S, Bell GI (1992) Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* 20:4613-20.
- Takeda K, Akira S (2000) STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:199-207.
- Takeda K, Kishimoto T, Akira S (1997) STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J Mol Med* 75:317-26.
- Tatari Z, Fortier C, Bobryna V, Loiseau P, Charron D, Raffoux C (1995) HLA-Cw allele analysis by PCR-restriction fragment length polymorphism: study of known and additional alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8803-7.
- Tay GK, Hui J, Gaudieri S, Schmitt-Egenolf M, Martinez OP, Leelayuwat C, Williamson JF, Eiermann TH, Dawkins RL (2000) PERB11 (MIC): a polymorphic MHC gene is expressed in skin and single nucleotide polymorphisms are associated with psoriasis. *Clin Exp Immunol* 119:553-8.
- Tazi Ahnini R, Camp NJ, Cork MJ, Mee JB, Keohane SG, Duff GW, di Giovine FS (1999) Novel genetic association between the corneodesmosin (MHC S) gene and susceptibility to psoriasis. *Hum Mol Genet* 8:1135-40.
- Teraoka Y, Naruse TK, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H (2000) Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association of psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 55:206-11.
- Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA (1998) Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 188:1307-20.
- Thomas NS, Wilkinson J, Holgate ST (1997) The candidate region approach to the genetics of asthma and allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 156:S144-51.
- Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M (1980) Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102:179-84.
- Tipps RL (1954) A study of the inheritance of atopic hypersensitivity in man. *American Journal of Human Genetics* 6:3-8.
- Tiwari JL, Lowe NJ, Abramovits W, Hawkins BR, Park MS (1982) Association of psoriasis with HLA-DR7. *Br J Dermatol* 106:227-30.
- Toelle BG, Peat JK, Salome CM, Mellis CM, Woolcock AJ (1992) Toward a definition of asthma for epidemiology. *Am Rev Respir Dis* 146:633-7.
- Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez-Vina MA, Young M, Lory D, Morris L, Wuepper KD, Stastny P, Menter A, et al. (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264:1141-5.
- Torres-Galvan MJ, Quiralte J, Pestano JJ, Ortega N, Blanco C, Castillo R, Carrillo T, Perez-Aciego P, Sanchez-Garcia F (2001) IL4-R1 (5q31-q33) and FcepsilonRI-beta (11q13) markers and atopy: a case/control study in a spanish population. *Allergy* 56:159-63.
- Townley RG, Bewtra AK, Nair NM, Brodkey FD, Watt GD, Burke KM (1979) Methacholine inhalation challenge studies. *J Allergy Clin Immunol* 64:569-74.
- Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF (1999) Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet* 36:323-5.
- Traupe H, van Gurp PJ, Happle R, Boezeman J, van de Kerkhof PC (1992) Psoriasis vulgaris, fetal growth, and genomic imprinting. *Am J Med Genet* 42:649-54.
- Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwilliger J, Lathrop GM, Barker JN (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6:813-20.
- Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD (2000) Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:604-12.
- Turki J, Pak J, Green SA, Martin RJ, Liggett SB (1995) Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest* 95:1635-41.
- Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, Doudounakis S, Kanavakis E (2001) CFTR gene mutations--including three novel nucleotide substitutions--and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet* 108:216-21.
- Tzetis M, Kanavakis E, Antoniadi T, Doudounakis S, Adam G, Kattamis C (1997) Characterization of more than 85% of cystic fibrosis alleles in the Greek population, including five novel mutations. *Hum Genet* 99:121-5.

- Ulbrecht M, Hergeth MT, Wjst M, Heinrich J, Bickeboller H, Wichmann HE, Weiss EH (2000) Association of beta(2)-adrenoreceptor variants with bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 161:469-74.
- Van Hage-Hamsten M, Johansson E, Kronqvist M, Loughry A, Cookson WO, Moffatt MF (2002) Associations of FcepsilonR1-bbeta polymorphisms with immunoglobulin E antibody responses to common inhalant allergens in a rural population. *Clin Exp Allergy* 32:838-42.
- van Herwerden L, Harrap SB, Wong ZY, Abramson MJ, Kutin JJ, Forbes AB, Raven J, Lanigan A, Walters EH (1995) Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. *Lancet* 346:1262-5.
- Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H (1998) Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet* 7:1761-9.
- Varin-Blank N, Metzger H (1990) Surface expression of mutated subunits of the high affinity mast cell receptor for IgE. *J Biol Chem* 265:15685-94.
- Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, Patel S, Burden D, Tillman D, Barker JN, Trembath RC (2002) Family-Based Analysis Using a Dense Single-Nucleotide Polymorphism-Based Map Defines Genetic Variation at PSORS1, the Major Psoriasis- Susceptibility Locus. *Am J Hum Genet* 71:3
- Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B, Jones AB, Ameen M, Balendran N, Powis SH, Burden AD, Barker JN, Trembath RC (2001) Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* 38:7-13.
- Vercelli D, Baldini M, Stern D, Lohman I, Halonen M, Martinez F (2001) CD14: a bridge between innate immunity and adaptive IgE responses. *J Endotoxin Res* 7:45-8
- Vermeesch JR, Petit P, Kermouni A, Renauld JC, Van Den Berghe H, Marynen P (1997) The IL-9 receptor gene, located in the Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Hum Mol Genet* 6:1-8.
- Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A (1997) TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7:291-301.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166:249-55.
- von Mutius E, Martinez FD, Fritzschn C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 149:358-64.
- von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Bjorksten B, Weiland S (2000) International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax* 55:449-53.
- von Mutius E, Weiland SK, Fritzschn C, Duhme H, Keil U (1998) Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 351:862-6.
- Wang X, Moylan B, Leopold DA, Kim J, Rubenstein RC, Togias A, Proud D, Zeitlin PL, Cutting GR (2000) Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. *Jama* 284:1814-9.
- Ward J, Stephens F (1961) Inheritance of psoriasis in a Utah kindred. *Arch Dermatol* 84:589-592
- Warner JO (1998) DeltaF508 heterozygosity and asthma. *Lancet* 352:984-5; discussion 986-7.
- Warner JO, Naspitz CK (1998) Third International Pediatric Consensus statement on the management of childhood asthma. International Pediatric Asthma Consensus Group. *Pediatr Pulmonol* 25:1-17.
- Warner JO NC, Cropp GJA (1992) Asthma: a follow up statement from an international paediatric asthma consensus group. *Arch Dis Child* 67:240-8.
- Watson W, Cann HM, Farber EM, Nall ML (1972) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 105:197-207.
- Webb DC, McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS (2000) Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol* 165:108-13.
- Wei L, Vankeerberghen A, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H (2000) Suppressive interactions between mutations located in the two nucleotide binding domains of CFTR. *FEBS Lett* 473:149-53.
- Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, Cockcroft D, James A, Liggett SB, Pare PD (1998) beta2-Adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158:787-91.
- Weiss A, Littman DR (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-74.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 5121-5188
- Wiener A, Zieve I, Fries J (1936) The inheritance of allergic disease. *Ann Eugen* 7:141-162
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD (1998) Interleukin-

- 13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258-61.
- Wilmott RW, Tyson SL, Matthew DJ (1985) Cystic fibrosis survival rates. The influences of allergy and *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Dis Child* 139:669-71.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 177:557-60.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3195-9.
- Winchester (1993) Psoriatic arthritis. In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen A, Freeman GJ (eds) *Dermatology in General Medicine*. Vol II
- Winchester EC, Millwood IY, Rand L, Penny MA, Kessler AM (2000) Association of the TNF-alpha-308 (G->A) polymorphism with self-reported history of childhood asthma. *Hum Genet* 107:591-6.
- Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM (2002) Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 10:82-5.
- Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, et al. (1999) A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 58:1-8.
- Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB, Jasty R, Castle VP, Nickoloff BJ (1997) Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol* 151:1321-9.
- Wrone-Smith T, Nickoloff BJ (1996) Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98:1878-87.
- Xu J, Meyers D, Pericak-Vance M (1998) Lod score analysis. In: Haines JL, Pericak-Vance MA (eds) *Approaches to Gene Mapping in Complex Diseases*. Wiley-Liss, Inc, New York, pp 253-272
- Xu J, Meyers DA, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, King RA, Lester LA, Howard TD, Solway J, Langefeld CD, Beaty TH, Rich SS, Bleecker ER, Cox NJ (2001) Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three u.s. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet* 68:1437-46.
- Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J (1997) Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet* 350:85-90.
- Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi K, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T (2000) 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* 66:152-60.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG (1991) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res* 19:5417-23.
- Zhao XP, Elder JT (1997) Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex. *Genomics* 45:250-8.
- Zheng GJ, Thomson G, Pen YN (1994) Allelic instability in mitosis can explain "genome imprinting" and other genetic phenomena in psoriasis. *Am J Med Genet* 51:163-4.
- Zhou Y, Chaplin DD (1993) Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9470-4.
- Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Pare PD, Sandford AJ (2000) Polymorphisms of the IL-4, TNF-alpha, and Fcepsilon R1beta genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1655-9.
- Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA (1999) Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103:779-88.

