



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS MOLECULAR DEL POLIMORFISMO DEL GEN DE LA PROTEÍNA
DE CHOQUE TÉRMICO 70-1 EN PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR
IDIOPÁTICA.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

INOCENCIO PIÑA RAMÍREZ.



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Dr. FELIPE CRUZ GARCIA

SECRETARIO: Dr. ARNOLDO AQUINO GALVEZ

1er. SUPLENTE: Dra. MARIA ELENA IBARRA RUBIO

2° SUPLENTE: Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

Este trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Oncología Biomédica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas.

ASESOR:

Arnoldo Aquino Gálvez

SUSTENTANTE:

Inocencio Piña Ramírez.

Índice

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades intersticiales de pulmón.....	1
1.2. Fibrosis pulmonar idiopática.....	1
1.3. Mortalidad e incidencia.....	3
1.4. Signos y síntomas.....	3
1.5. Patogénesis.....	4
1.6. Factores genéticos	8
1.7. Polimorfismos genéticos en FPI.....	10
1.8. Complejo principal de histocompatibilidad	12
1.9. Sistema HLA.....	13
1.10. Proteínas de choque térmico (HSP).....	17
1.10.1 Proteínas de choque térmico 70 (HSP70).....	18
Localización.....	18
Función.....	20
Regulación.....	21
1.11. Polimorfismo de los genes de la proteína HSP70 y enfermedad..	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	26

4. OBJETIVO.....	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
5.1. Pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.....	28
5.2. Grupo control	29
5.3. Obtención de muestras de sangre.....	29
5.4. Protocolo de extracción de DNA con perclorato de sodio.....	30
5.5. Integridad del DNA genómico	31
5.6. Generalidades de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)...	32
5.7. Condiciones para la PCR.....	33
5.8. Productos de PCR.....	34
5.9. RFLP.....	34
5.10. Condiciones para la digestión enzimática.....	35
5.11. Productos de la digestión enzimática	35
5.12. Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIÓN.....	44
9. ANEXO 1. SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	45
10. BIBLIOGRAFÍA.....	46

DEDICATORIA

A DIOS

Pues gracias a Él he podido elegir mi camino.

A MI ESPOSA

IRAIS. Por el apoyo invaluable, la comprensión, el impulso, la paciencia y por todo el amor. Por ser mi razón para seguir adelante, para luchar y compartir todos mis éxitos y ayudarme a levantar en mis tropiezos.

A MIS PADRES

AMPARO Y GUSTAVO. Por la educación, los principios, los valores. Por siempre estar, para apoyar, escuchar y corregir. Por enseñarme el valor de las cosas y como obtenerlas.

A MIS HERMANOS

MARTHA ISABEL, MARIA DE LA LUZ, LUIS FERNANDO, MARIA EUGENIA Y JOSE ALFREDO. Por el apoyo, impulso y ánimo para continuar.

A MIS SOBRINOS Y CUÑADOS (AS)

MONTSERRAT, DANIEL, ZAYRA M, LUIS G, JOSÉ E, BRENDA J, LESLIE A, VANESSA A, A. MICHELLE, IVÁN, JONATHAN, J. PAOLA Y A. DAVID. Por su alegría, ternura, sonrisas y travesuras que me alegran la vida y a veces me sacan canas verdes. **FROYLÁN,....., MARIO, FABIOLA Y ALEJANDRA.** Por el regalo de sus hijos, apoyo y motivación.

A JESUS DAVID

Por sacar de mi los sentimientos de amor y ternura y por motivarme a buscar ser para él un buen ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

La carpintería “**San José**” por ser el sostén de este sueño.

A todos las personas que ocuparon mis servicios y confiaron en mí. Gracias porque sin ellos esta tarea hubiera sido un tanto más complicada, en especial a la Sra. Carmen y familia, a la Sra. Cuahu y familia y a la Sra. Gaitán y familia.

Mis amigos:

Aldo, Edwin, Humberto, Israel, Iván, Karina, Marcela, Mariana, Nicolas, Paty, Renato, Sabdy y a sus familias por siempre recibirme en su casa y hacerme parte, además, por las buenas y malas influencias de cada uno de ellos.

Mis compañeros de la Facultad:

Que se convirtieron en amigos (Magda y Juve, Pablo, Laura Cynthia, Fabi, Chabe, Edgar, Luz, Carmen, liz) y hasta en compadres y ahijados (Zitlalli y Jair, y Tetzin).

A mi nueva familia:

Sra. Imelda Luna, Leda y Osiris, Hugo y Ardal, Sofi, David y Amelie. Por los buenos ratos, la convivencia, el apoyo, el ánimo y las cortas noches de karaoke.

El magnífico equipo del Laboratorio de Oncología Biomédica:

Dra. Georgina González, Dr. Arnoldo Aquino (Tutor), QFB. Rosa A. González, Técnico Cuauhtémoc Sandoval y QFB. Carla Jiménez, agregada cultural. En especial al Biólogo Javier Delgado, por su invaluable ayuda durante mi estancia en el laboratorio, en la corrección del texto escrito, por facilitarme el equipo y a todos por su amistad.

A mi “Tío Luis” y a mi tía Ana, por sembrar la semilla de la preparación, por guiarme y apoyarme tanto.

Agradezco por la facilidad del equipo a:

Dr. Víctor Ruiz.

Dr. Marco Checa.

Agradezco por su participación en el proyecto a:

Dra. Georgina González.

Dr. Oswaldo Partida.

A la Escuela de Enfermería “Aurelia Saldierna Rodríguez”

Miembros del H. Jurado: Dr. Jesús Fernando Montiel, Dr. Felipe Cruz, Dr. Arnoldo Aquino. Dra. María Elena Ibarra y a la Dra. Tzvetanka Dimitrova.

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es una enfermedad de etiología desconocida progresiva y letal. Se considera el resultado de una compleja interrelación entre factores ambientales y del huésped, los factores genéticos involucrados se desconocen. Debido a que previamente encontramos que algunos polimorfismos de genes dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) confieren susceptibilidad al desarrollo de la FPI, se propuso este estudio en el que decidimos evaluar el posible papel del polimorfismo del gen *HSPA1A*. Se incluyeron un total de 152 sujetos, los cuales se agruparon de la siguiente manera: 73 pacientes con FPI y 79 sujetos controles sanos. A los dos grupos se le tipificó el polimorfismo 190 G/C (dbSNP rs1043618) del gen *HSPA1A* utilizando la técnica de PCR-RFLP. Los resultados mostraron que tanto el alelo G como el genotipo GG se encuentran incrementados en el grupo de pacientes con FPI, al hacer la comparación entre los controles y los pacientes con FPI se observan diferencias estadísticamente significativas (OR = 1.92, IC de 1.15 a 3.2 para el alelo G y un OR de 2.09, e IC de 1.04 a 4.22 para el genotipo GG), por lo que consideramos que el alelo G puede estar confiriendo susceptibilidad al desarrollo de la FPI, esto se potencia cuando se hace el análisis por genotipo y se observó GG con un OR mayor (OR = 2.09) que cuando se analizó por alelo (OR = 1.92).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades Intersticiales de Pulmón

Las enfermedades intersticiales de pulmón (EIP), comprenden un amplio grupo de entidades clínico-patológicas que tienen en común la afectación del intersticio pulmonar, pero que difieren en los mecanismos celulares y moleculares en su patogenia. Hay EIP en las que la alteración predominante es inflamatoria, como la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad, mientras que en el otro extremo existen enfermedades en las que predomina la fibrogenia, cuyo principal ejemplo es la fibrosis pulmonar idiopática (1).

1.2 Fibrosis Pulmonar Idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la más común de las neumonías intersticiales idiopáticas, se caracteriza histológicamente por un patrón de neumonía intersticial usual (NIU) y su diagnóstico requiere la exclusión precisa de otras enfermedades intersticiales de pulmón (2).

La FPI está determinada como el punto final de un numeroso y heterogéneo grupo de desórdenes conocidos como EIP (3). Es una enfermedad fibroproliferativa crónica que se manifiesta con una restricción pulmonar generalmente progresiva y que presenta alteraciones en el intercambio gaseoso (4,5). Está definida como un proceso anómalo de la remodelación epitelio-mesénquima caracterizado por: reparación epitelial anómala, aumento del depósito de matriz extracelular, proliferación fibroblástica excesiva, aparición de miofibroblastos e infiltración celular inflamatoria (1,4). Lo que conduce a la progresiva disfunción orgánica y usualmente a una disfunción terminal. Entre las neumonías intersticiales idiopáticas, la fibrosis pulmonar, además de ser la más común presenta elevada mortalidad, con una media de supervivencia de 3 a 5 años posteriores al diagnóstico (6,7).

A pesar de la extensiva investigación de que algunos factores de riesgo se han identificado, la etiología de la FPI permanece desconocida. Un ejemplo de estos es el hábito de fumar cigarrillos, asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar este padecimiento, al igual que ciertas infecciones virales latentes, incluyendo el virus de Epstein-Barr y el virus del herpes (7). Aunque el proceso fibrótico que caracteriza a esta enfermedad se considera dissociado de los procesos inflamatorios, los estudios en algunos pacientes indican que la respuesta inmune adaptativa es anormal en la FPI (6).

1.3 Mortalidad e incidencia

La FPI afecta alrededor de 500,000 personas en Estados Unidos de América (EUA) y Europa, se presenta regularmente en personas de entre 50 y 70 años de edad, con un estimado en la incidencia de 7 mujeres y 10 hombres por cada 100,000 personas. La incidencia, prevalencia y muerte aumentan con la edad (8), las estimaciones actuales indican que la incidencia de la FPI en Reino Unido (RU) y en EUA son 4.6 y 6.8 por 100,000 personas por año, respectivamente, pero entre 1991 y 2003 se incrementó en un 11% anual. Alrededor de 4,000 nuevos casos se diagnostican cada año en la RU, lo que sugiere que la enfermedad es más común de lo que se pensaba. En contraste con los diagnósticos de cáncer, no existe un registro obligatorio del diagnóstico de la FPI en el mundo (2,7).

1.4 Signos y síntomas

Los pacientes presentan típicamente disnea progresiva, pero la mayoría desarrolla una tos irritante, con afectación sistémica no específica durante el curso de la enfermedad, esta tos es típicamente seca y resistente a las terapias convencionales de medicamentos para la tos (4,7).

La mayoría de las enfermedades respiratorias asociadas con tos, tales como bronquitis crónica, asma e infecciones virales agudas, afectan principalmente a las vías respiratorias del tracto superior, donde la inervación sensorial es densa. Por el contrario los cambios patológicos en la FPI afectan principalmente al parénquima pulmonar y al alvéolo, donde la inervación es escasa, por lo que es sorprendente la tos en este trastorno (4).

1.5 Patogénesis

Durante muchos años se consideró que la patogénesis de la FPI estaba asociada a una inflamación crónica y persistente que no se resolvía apropiadamente lo que provocaba la respuesta fibrótica. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que este padecimiento es el resultado de múltiples microagresiones al epitelio alveolar lo que provoca su activación aberrante y sostenida. De hecho, uno de los rasgos histológicos evidentes en la FPI es un notable aumento en el número de células epiteliales así como la presencia de varios fenotipos anormales. Entre estos destacan la hiperplasia e hipertrofia de neumocitos tipo 2, los cuales presentan estructura cúbica en el epitelio especialmente en las áreas donde se encuentran septos alveolares fibróticos. Además, es posible observar células epiteliales grandes y alargadas, además de otras más tenues y delgadas que se encuentran generalmente cubriendo los focos fibroblásticos. Las células del epitelio alveolar

anormalmente activadas, secretan cantidades excesivas de diferentes mediadores biológicos que inducen la migración, proliferación y activación de células mesenquimatosas con la formación de focos de fibroblastos/miofibroblastos y finalmente la acumulación exagerada de matriz extracelular (fibrosis) con la consecuente destrucción del parénquima pulmonar (9).

La forma patológica de la FPI, subclasificada como una neumonía intersticial usual (UIP), es temporalmente heterogénea. En regiones de pulmón con apariencia histológica normal se entremezclan zonas maduras de fibrosis y pequeños focos de matriz inmadura. Dentro de la matriz inmadura hay focos de fibroblastos con agregados de miofibroblastos en proliferación productores de colágena (10). Los focos de fibroblastos aparecen en la zona de transición entre el pulmón normal y la fibrosis pulmonar. Se ha encontrado una correlación directa entre el número de focos de fibroblastos de una biopsia pulmonar con un deterioro fisiológico progresivo y la supervivencia (11). Inicialmente se pensaba que los focos de fibroblastos representaban lesiones discretas causadas por una lesión pulmonar aguda recurrente. Un análisis de clonalidad muestra una proliferación de fibroblastos policlonales, lo que apoya la idea de que la lesión patológica principal es un tipo de neoplasia que, en lugar de una lesión maligna, se compone de múltiples fuentes de fibroblastos proliferantes en un proceso reactivo (12).

Origen de los fibroblastos

La acumulación de fibroblastos y matriz extracelular es fundamental para la formación de lesiones fibróticas. El origen de los fibroblastos en la FPI ha sido objeto de numerosos estudios. La evidencia actual sugiere varias fuentes que pueden variar según el tipo de lesión, incluyendo: la proliferación de fibroblastos residentes de pulmón, la diferenciación de las células madre de la médula ósea, y la transición de las células epiteliales a un fenotipo de fibroblastos, denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) (13).

Los precursores de fibroblastos derivados de médula ósea circulantes se llaman fibrocitos (14). Los fibrocitos han demostrado ser un componente de cicatrices hipertróficas y queloides (15), en la esclerodermia, en lesiones renales (16), en el engrosamiento de vías aéreas causado por asma (17) y en fibrosis pulmonar (18) en algunos modelos experimentales. Los fibrocitos se identificaron en el tejido pulmonar en 8 de cada 9 pacientes con fibrosis pulmonar (19) lo que apoya el probable papel de los fibrocitos en el desarrollo de la enfermedad. Se muestra una correlación positiva de los focos fibroblásticos y fibrocitos pulmonares, pero la magnitud del reclutamiento de fibrocitos en las múltiples formas de fibrosis pulmonar no se conoce. El papel exacto de los fibrocitos sigue siendo controvertido porque a pesar de que cultivos celulares de fibrocitos pueden ser

inducidos a diferenciarse en miofibroblastos in vitro, no está claro que puedan contribuir a la fibrosis patológica in vivo (20, 21, 22). En el contexto de una lesión fibrogénica, las células madre mesenquimales -derivadas de la médula ósea- pueden ser en realidad para la promoción de la reparación y aminorar la fibrosis que provoca lesiones fibróticas más persistentes (23). Resultados contradictorios con diferentes grupos de células madre y en diferentes modelos animales indican que el papel de los fibrocitos no está resuelto (13).

Otra posible fuente patológica de fibroblastos de pulmón es la transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM se sabe que ocurre durante la embriogénesis y la organogénesis y en algunas formas de metástasis de tumores epiteliales (13). Tras la lesión del epitelio alveolar las células tipo II se activan y se producen células epiteliales tipo I que revisten de nuevo el alvéolo. Durante este proceso intervienen diversas células y mediadores que mantienen la homeostasis del proceso reparativo, fagocitándose las células lesionadas y los productos de cicatrización como la fibrina, con lo que se recupera de nuevo el fenotipo inicial del alvéolo. En la FPI, aunque sigue sin conocerse la causa de la lesión inicial, se ha demostrado como factor determinante la reepitelización anómala del epitelio alveolar, con aumento de la apoptosis epitelial y de la síntesis de mediadores profibróticos, y rotura de la membrana basal (8). Asimismo, los fibroblastos proliferan, cambian su fenotipo a miofibroblasto y se depositan excesivas proteínas de la matriz extracelular. Se ha postulado que la célula epitelial alterada

tiene además capacidad para transformarse en miofibroblasto, lo que se denomina TEM (24). El papel exacto de la TEM sigue siendo controvertido, ya que otros estudios no han logrado detectar la expresión de los marcadores epiteliales y mesenquimales in vivo en cualquiera de las muestras clínicas o en el modelo fibrosis pulmonar inducida con bleomicina (25).

Considerados en conjunto, los fibrocitos, la TEM y la activación de fibroblastos residentes de pulmón pueden contribuir a la fibrosis pulmonar, pero el papel exacto de cada proceso en la enfermedad sigue sin resolverse. La comprensión de la contribución relativa de cada uno de estos procesos y la forma específica en que cada uno contribuye a la fibrosis es importante, ya que puede haber distintas vías que regulan estos procesos lo que sugiere diferentes objetivos para un potencial tratamiento (13).

1.6 Factores genéticos

La relevancia de los factores genéticos en la etiología de la FPI está fundamentada en la existencia de formas familiares de la enfermedad. Se ha estimado que entre el 2.2 y el 3.7% de las FPI son familiares, donde el polimorfismo del gen del factor de necrosis tumoral (TNF- α), además del factor de

crecimiento transformante (TGF- β), así como las mutaciones en la proteína C del surfactante, parecen conferir un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (1). Sin embargo, ya que solo un pequeño número de los individuos expuestos a factores de riesgo conocidos desarrollan la enfermedad, la etiología se considera probablemente multifactorial (7).

Se ha reportado que dentro de una misma familia se pueden llegar a presentar diferentes neumonías intersticiales idiopáticas. Steele y colaboradores (2009) reportaron que de los 309 pacientes afectados en 111 familias, el 80 % tenía FPI, el 6 % neumonía intersticial no específica y con menos frecuencia, neumonía organizada y bronquiolitis respiratoria asociada a enfermedad intersticial (26).

En otro estudio en 45 familias se asociaron dos o más tipos de neumonía intersticial idiopática, lo cual estaría indicando que posiblemente las mismas mutaciones genéticas podrían predisponer al desarrollo de diferentes enfermedades intersticiales (1).

El análisis de muestras de biopsias pulmonares ha demostrado que el perfil de expresión génica puede distinguir los pulmones normales de los fibróticos y que la

mayoría de los genes que están sobreexpresados en los pulmones fibróticos son los que codifican para las proteínas de la matriz extracelular (27).

Se ha observado que la expresión genética en tejido pulmonar de neumonías intersticiales idiopáticas esporádicas y familiares, es diferente y que existen pocas diferencias en la expresión génica entre la FPI y la neumonía intersticial no específica (28).

El análisis del perfil génico en las células parenquimatosas pulmonares, ha permitido identificar, en las células epiteliales alveolares y neumocitos tipo II hiperplásicos, la sobre-expresión de las metaloproteinasas 7, 9 y la osteopontina; así como la sobre-expresión de las metaloproteinasas 1 y 2, en focos fibroblásticos (29). Esto indicaría que la estrategia terapéutica más adecuada en la FPI consistiría en revertir la inhibición de la degradación de la colágena, más que prevenir su síntesis (1).

1.7 Polimorfismos genéticos en FPI

La complejidad en la patogénesis de la FPI y el hecho de que se hayan identificado múltiples mutaciones y alteraciones polimórficas de los mediadores

involucrados en su patogenia indican que es una enfermedad poligénica, lo que dificulta la identificación de los genes diana para futuros tratamientos génicos (1).

Diversos estudios han investigado el papel que podrían desempeñar en la predisposición y evolución de la FPI los polimorfismos genéticos de los mediadores implicados en su patogenia. Se han investigado los polimorfismos de varios genes, aunque la mayoría de estudios no se han reproducido en diferentes poblaciones. Por ejemplo, los polimorfismos genéticos de las proteínas A y B del surfactante, del factor de necrosis tumoral (TNF) y del receptor 1 del complemento se han asociado con la predisposición a presentar la enfermedad en diferentes poblaciones. Los polimorfismos del TGF- β , de la interleucina-6 y del receptor tipo II del TNF se han asociado con la progresión de la enfermedad en población inglesa y española (30, 31, 32).

También se han evaluado varios polimorfismos del MHC, el locus HLA-B,-DRB1, y DQB1. Tres haplotipos se encontraron incrementados en la FPI: (1) HLA-B * 15-DRB1 * 0101-DQB1 * 0501, (2) HLA-B * 52-DRB1 * 1402-DQB1 * 0301 y (3) HLA-B * 35 -DRB1 * 0407-DQB1 * 0302. Estos hallazgos sugieren que algunos polimorfismos MHC confieren susceptibilidad a la FPI, lo que podría estar relacionado con la inducción de la apoptosis de las células epiteliales, un proceso crítico en el desarrollo de la enfermedad. (33)

En otro estudio, al explorar el polimorfismo del gen MICA se encontró un aumento significativo del alelo MICA * 001 en los pacientes con FPI y la frecuencia del genotipo MICA * 001 / * 00201 fue significativamente mayor en pacientes con FPI en comparación con los controles sanos. Los resultados indican que los polimorfismos de MICA y la expresión anormal de los receptores NKG2D podrían contribuir a la susceptibilidad a desarrollar FPI. (34)

1.8. Complejo principal de histocompatibilidad

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de genes estrechamente relacionados que regulan el reconocimiento intercelular y la discriminación entre lo propio y lo ajeno con un papel importante en la respuesta inmune humoral y celular (35). Los genes del MHC juegan un papel fundamental en la respuesta inmune de los vertebrados, mediante la modulación de la resistencia a los parásitos y patógenos. Los genes MHC de clase I y II codifican a las glicoproteínas de superficie celular que después de reconocer a los antígenos extraños los presentan a los linfocitos T, iniciando así una respuesta inmune en el huésped (36).

El MHC es conocido por ser la región más polimórfica en los vertebrados y, en humanos, muestra los niveles de diversidad de nucleótidos que son dos veces

más altos que la media genómica. La evidencia de estudios de las poblaciones naturales sugiere que la diversidad genética elevada es impulsada y mantenida por la exposición a agentes patógenos y parásitos en el ambiente (36). Dado que las moléculas MHC actúan como presentadoras de antígenos, el conjunto de las moléculas MHC que un individuo posee, determina la variedad de antígenos a los linfocitos T que pueden responder. Como tal, el MHC ha sido un factor ampliamente sugerido en la susceptibilidad a la enfermedad (35).

El MHC conocido en el humano como HLA (human leucocyte antigen), regula la respuesta inmune (37) en defensa del hospedero, evitando desarrollar enfermedades autoinmunes y cáncer; además de jugar un rol crítico en el trasplante de órganos y células (38).

El HLA, es una región en el cromosoma 6 (39), que es esencial para el sistema inmune. Aunque muchos de los 224 loci identificados siguen siendo de función desconocida, se estima que alrededor del 40% de los genes expresados tienen la función del sistema inmunológico. Mas del 50% del HLA ha sido secuenciado en dos ocasiones, en diferentes haplotipos, dando idea del polimorfismo y la evolución extraordinaria de esta región. Varios genes de regiones de HLA clase II y III, pueden ser rastreados por la similitud de secuencias y sintenia, a más de 700

millones de años atrás, claramente anterior a la aparición de la adaptación del sistema inmunológico hace unos 400 millones de años (40).

El HLA ubicado en el cromosoma 6p21.31 es una de las primeras regiones del genoma humano que se ha secuenciado completamente. Con más de 200 loci identificados, es la región más densa de nuestro genoma. También codifica para las proteínas más polimórficas en humanos, las moléculas de clase I y clase II, algunas de las cuales tienen más de 200 variantes alélicas. Se cree que este gran polimorfismo es utilizado y se ha mantenido debido a una larga batalla por la supremacía entre nuestro sistema inmunológico y los agentes patógenos infecciosos. Subrayando su importancia biomédica, el HLA se asocia con más enfermedades que en cualquier otra región del genoma humano (41). Fenotipos con diferentes etiologías se han vinculado a la región del HLA, que van desde cáncer hasta trastornos del sueño entre otros. En la actualidad, el HLA es la segunda secuencia contigua más larga en el genoma humano. Noventa y tres de los 224 loci (41,5%) fueron descubiertos o ubicados en el HLA como resultado directo de la secuenciación genómica. Históricamente, el HLA se ha dividido en tres regiones: clase II (centromérica), clase I y clase III (telomérica) (42). Los análisis de las regiones que flanquean inmediatamente, revelan que las regiones clásicas de clase I y clase II se extienden mucho más de lo que se pensaba (43). Un conjunto de más de siete genes implicados en la inflamación, incluyendo a tres miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), se ubican

dentro de la región de clase III, además de los genes que codifican a las proteínas de choque térmico (HSPA1A, HSPA1B y HSPA1L), que a veces se especifican dentro de la región de clase IV (44).

Existen algunos otros genes asociados con el sistema inmunológico que se encuentran distribuidos en todo el HLA. El componente total del sistema inmunológico del HLA es del 39,8% de los loci, incluyendo al menos 10 nuevos genes identificados. La agrupación de los genes relacionados con la inmunidad en la región del HLA es tan sorprendente que parece poco probable que sea coincidencia. Este agrupamiento de genes de inmunidad en el HLA puede reflejar funciones de coevolución o coexpresión de las transcripciones relacionadas. Sin embargo, la proporción de genes del sistema inmunológico en el genoma humano no se conoce en la actualidad y puede ser igualmente alto. La densidad de genes promedio (incluyendo pseudogenes) a lo largo de las 3,6 Mb del HLA es un gen por cada 16 kilobases (kb), con distintas variaciones regionales. Particularmente interesante, es la proporción de genes que se expresan en relación con pseudogenes. Por el contrario, las regiones de clase I y clase II están llenas de pseudogenes. Ambas regiones, clase I y clase II, parecen haber duplicado muchas veces, la generación de nuevos miembros de la familia de genes que luego han divergido en nuevas funciones. Una posible explicación para el mantenimiento de tales niveles altos de pseudogenes podría ser que ellos están involucrados en la

generación de nuevos alelos por la conversión de genes, un fenómeno que se ha observado en otros loci inmunológicos humanos (45).

La primera secuencia completa del HLA ofreció una importante herramienta para el estudio de la genética, la biología y la evolución de la especie humana y de las múltiples familias de genes, las poblaciones y las enfermedades. A largo plazo, la importancia biológica de las moléculas del HLA es probable que sean útiles para justificar el análisis epigenético de varios haplotipos comunes, que difieren notablemente en la secuencia y el contenido de genes. Los esfuerzos para alcanzar este objetivo ya están en marcha, ya que facilitará la identificación precisa de los loci de varias enfermedades (40).

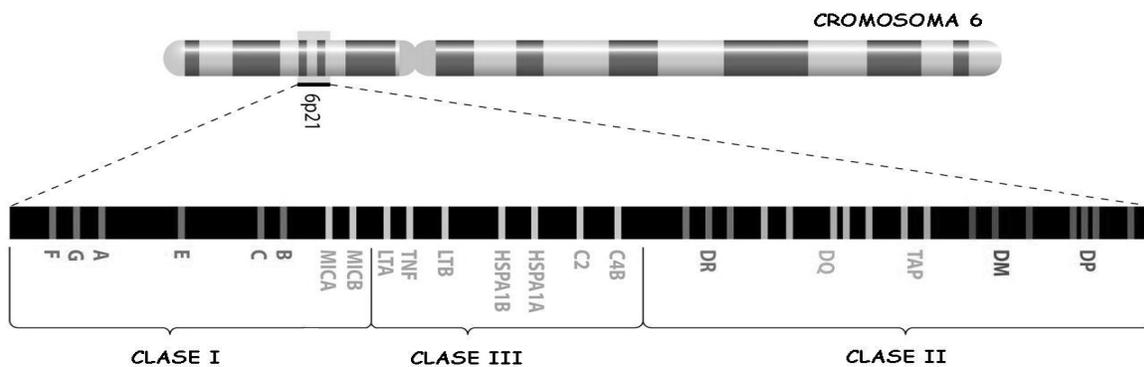


Figura 1. Representación esquemática del Complejo principal de histocompatibilidad o MHC (86).

1.9. Proteínas de choque térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp) son proteínas inducibles altamente conservadas, que se expresan cuando los organismos están expuestos a calor extremo, isquemia, hipoxia, estrés oxidativo, luz ultravioleta, daño al tejido, virus, bacterias, toxinas, metales pesados, venenos químicos y carcinógenos (46).

Las HSP's son usualmente agrupadas en varias familias generales (HSP110, HSP 90, HSP/HSC70, HSP58, HSP47 y las pequeñas HSP's [HSP10-30]), la principal actividad de las HSP's es la de cumplir la actividad de chaperona (47, 48).

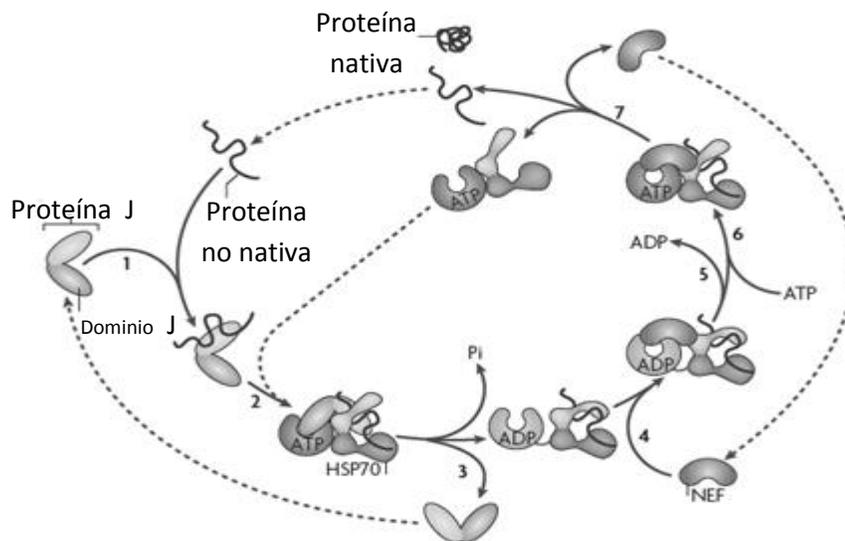


Figura 2. Representación esquemática de la función de una proteína de choque térmico como chaperona en el plegamiento y transporte de proteínas (87).

Debido a esto y a su localización dentro del HLA, su polimorfismo y función biológica, los genes de la proteína de choque térmico 70 son candidatos importantes para evaluar la susceptibilidad genética a la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

1.10. Proteínas de choque térmico 70

El genoma humano contiene más de 40 secuencias del gen *HSP70*, muchas de ellas son pseudogenes, pero al menos hasta 11 distintos genes localizados en varios cromosomas son traducidos en proteína (50). Estas isoformas de Hsp70 difieren entre si en la secuencia de aminoácidos, nivel de expresión, localización subcelular, y en la repuesta inducida por diferentes señales (50). La familia de las Hsp70, es una de las más conservadas y mejor conocidas Hsp's (46). Comprenden una familia de proteínas constitutivas e inducidas por estrés (51).

Localización

Hay tres genes principales de la familia de las *HSP70* humanas, estos son *HSPA1A (HSP70-1)*, *HSPA1B (HSP70-2)* y *HSPA1L (HSP70-hom)*; en los dos primeros genes sus productos solo difieren en dos aminoácidos y se cree que son

proteínas totalmente intercambiables, (46,47, 50). Están localizados en la región del complejo principal de histocompatibilidad clase III y están presentes en tándem en el cromosoma 6p21.3 (51). Los genes de *HSPA1A* y *HSPA1B*, codifican una proteína similar, la proteína HSP70 inducible por calor, *HSPA1A* es expresada constitutivamente en un nivel bajo. El gen de *HSPA1L* codifica a una proteína no inducible por calor que comparte un 90% de la secuencia con la proteína Hsp70 (46, 51). Las variaciones de DNA en estos genes han sido caracterizadas por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los cuales pueden afectar la expresión o la función de esta chaperona y posteriormente contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad y tolerancia al estrés (46,47). Los genes de HSP70 son polimórficos, ellos presentan SNPs localizados en posiciones + 190 de *HSPA1A* (G→C), +1267 de *HSPA1B* (A→G) y 2437 de *HSPA1L* (T→C), que se han relacionado con enfermedades inflamatorias y tumorales (52).

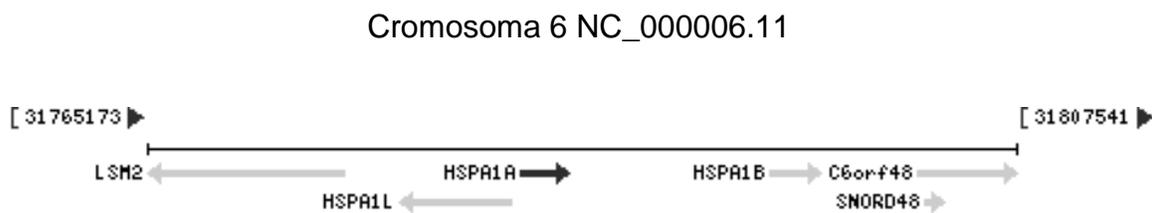


Figura 3. Localización del gen *HSPA1A* en el cromosoma 6. Se ubica entre los genes *HSPA1L* y *HSPA1B* (88).

Función

Como una chaperona dominante, las proteínas de choque térmico 70 están involucradas en funciones celulares regulando un amplio rango de actividades asociadas a proteínas (47, 50, 53). Juegan un rol importante en la unión y estabilización para el correcto plegamiento de péptidos nacientes, ayudan a dar las conformaciones competentes para la translocación de las proteínas entre los diferentes compartimentos celulares, participan en la remoción y desnaturalización de proteínas mal plegadas, previenen la acumulación de proteínas desnaturalizadas, etiquetándolas para la degradación lisosomal y regulan el ensamble y desensamble de complejos proteicos (50, 51, 54, 55). El aumento de los niveles de esta proteína confiere a las células termotolerancia, protegiendo a la célula de muerte por apoptosis inducida por TNF- α y TNF- β y puede proteger al corazón, cerebro, riñón y pulmón de una lesión por estrés. (47, 53).

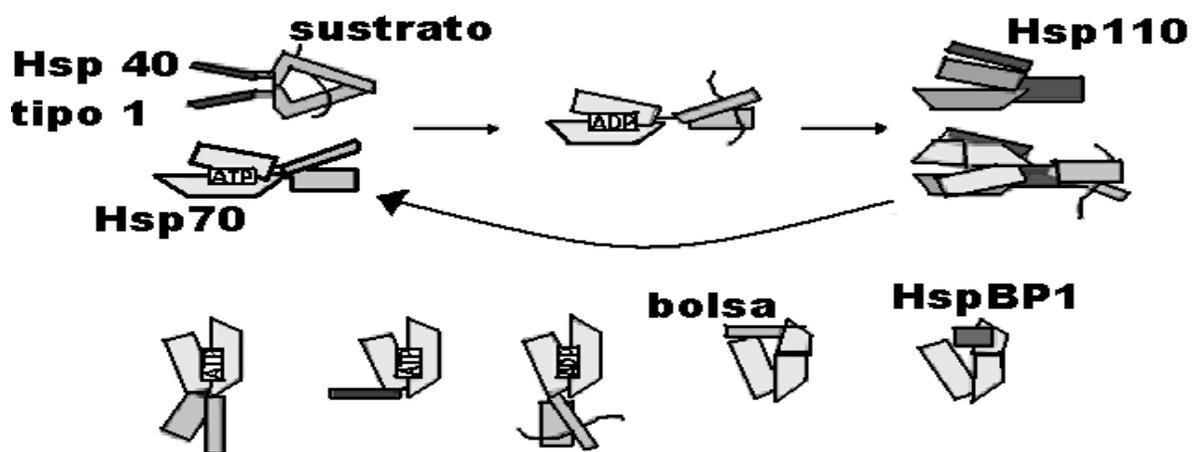


Figura 4. Representación de la función de las HSP70 (89).

Regulación

Los miembros de la familia de las HSP70 pueden ser inducidas por diferentes tipos de estrés celular, tales como el calor, metales pesados, radiación, isquemia, radicales de óxido nítrico, entre otros, que estimulan la activación de factores de transcripción de estrés. Estas proteínas se unen y liberan polipéptidos en un ciclo que está acoplado a una actividad ATPasa (50). Estas funciones requieren del reconocimiento y unión de las proteínas de choque térmico con las regiones de los péptidos expuestos en las proteínas blanco. Sin embargo, poco se sabe acerca de la especificidad del sustrato de HspA1A y HspA1B. De igual forma, se desconoce acerca de la función o sustrato específico de HSPA1L (51).

El total de los dominios en la estructura de las Hsp70 están conservados: el extremo N-terminal, dominio de unión a nucleótidos (NBD) con actividad ATPasa está unido por una región flexible con el extremo C-terminal, que es el dominio de unión al sustrato (SBD). La comunicación alostérica con el SBD y las interacciones con las cochaperonas y los factores de cambios de nucleótidos depende críticamente de la conformación de NBD. Por lo tanto, la comprensión de los cambios conformacionales en NBDs de las proteínas Hsp70 es clave para la comprensión de la forma en que el motor ATPasa conduce el ciclo de unión y liberación de la máquina de Hsp70 (50).

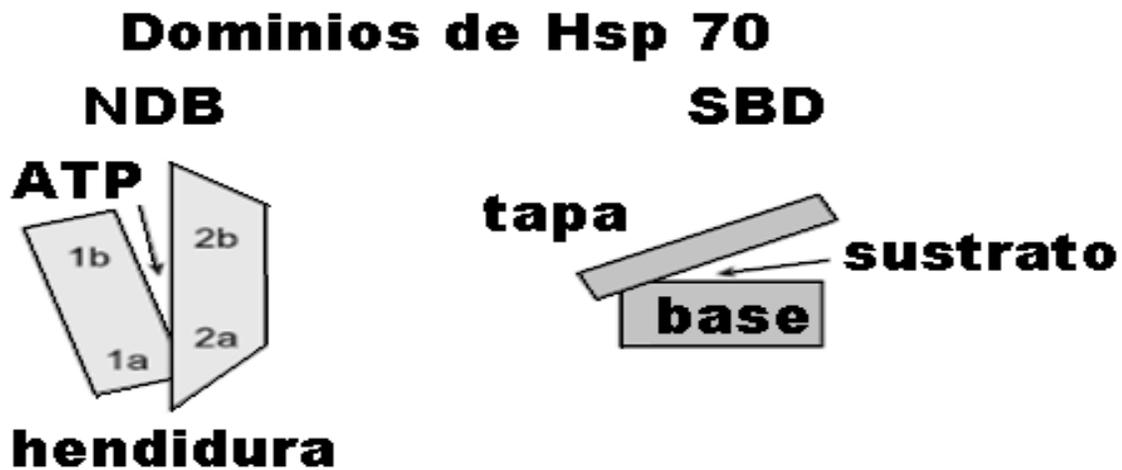


Figura 5. Dominios de las Hsp70 (89).

1.11. Polimorfismo de los genes de la proteína Hsp 70 y enfermedad

Como se muestra en la tabla 1 varios estudios reportan posibles asociaciones entre los SNPs en los genes de *HSP70* y diferentes padecimientos (46). Además la proteína Hsp70 y su anticuerpo han sido identificados como implicados en la patogénesis de la hipertensión, aterosclerosis, enfermedad coronaria del corazón, enfermedad aguda inducida por calor y ataque fulminante. Por lo tanto, no es inesperado que los polimorfismos de los genes de Hsp puedan contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad diferencial debido a que estas proteínas están involucradas en la tolerancia al estrés. Hsp70 se ha considerado como un factor de predicción de la resistencia a la quimioterapia en el cáncer de mama (47). Además, altos niveles de hsp70 predicen baja respuesta del cáncer de mama para

la radiación y la hipertermia (55). En la tabla 2 podemos observar algunas enfermedades pulmonares en las que se describen ciertas asociaciones con algunos polimorfismos de los genes de esta proteínas.

Enfermedades estudiadas con relación al polimorfismo de los genes de HSP70 como posibles marcadores de susceptibilidad genética.	
Población	Padecimiento
Aparato digestivo	
Japonesa	Cáncer gástrico (56)
Japonesa	Cáncer gástrico(57)
Mexicana	Cáncer gástrico y úlcera duodenal(52)
Húngara	Pancreatitis aguda grave(5)
Metabolismo de carbohidatos	
Polonesa	Nefropatía diabética(58)
Pakistaní	Glaucoma(59)
Japonesa	Glaucoma de ángulo abierto(60)
Hindú	Úlcera de pie diabético(61)
Enfermedades autoinmunes	
Coreana	Colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn(62)
Caucásica	Enfermedad tiroidea autoinmune(63)
Tabla 1. Enfermedades asociadas al polimorfismo de los genes de las proteínas de choque térmico 70.	

Sistema urinario	
Húngara	Malformaciones del tracto urinario(64)
Húngara	Infección del tracto urinario(65)
Húngara	Insuficiencia renal aguda(66)
Sistema nervioso.	
Taiwanés	Parkinson(67)
Coreana	Esquizofrenia(68)
Taiwanés	Demencia (69)
China	Accidente cerebrovascular isquémico(70)
Sistema circulatorio	
Alemana	Sepsis grave(71)
Italiana	Enfermedad arterial coronaria(72)
China	Enfermedad arterial coronaria(73)
Otros	
Húngara	Preclamsia(74)
Norteamericana	Ruptura prematura de membranas fetales(75)
China	Sordera(77)
China	Sordera(78)
Australiana	Choque séptico(79)

Tabla 1. Continuación. Enfermedades asociadas al polimorfismo de los genes de las proteínas de choque térmico 70.

Susceptibilidad genética relacionada con el polimorfismo de los genes <i>HSP70</i> en enfermedades de pulmón			
Población	Enfermedad	Alelo, genotipo o haplotipo	OR
China	Cáncer de pulmón(47)	CC, GAC y CGT	2.06, 1.48 y 1.2
China	Edema pulmonar(61)	Dip5 HAP1-HAP7	3.39
China	Neumoconiosis (80)	GAT Y GGT	
Polaca	Sarcoidosis (81)	G	2.00

Tabla 2. Enfermedades pulmonares asociadas al polimorfismo de los genes de las proteínas de choque térmico 70.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la localización dentro del MHC, los polimorfismos y la función biológica ante situaciones de estrés celular, fenómeno que se observa en los tejidos de pacientes con FPI, el *HSPA1A* es un gen candidato importante para evaluar la susceptibilidad genética en este padecimiento.

3. HIPÓTESIS

El polimorfismo del gen de la proteína de choque térmico 70-1 (*HSPA1A*) está estrechamente relacionado con la susceptibilidad a la fibrosis pulmonar idiopática.

4. OBJETIVO GENERAL

- 1) Evaluar la existencia de una susceptibilidad genética asociada con el polimorfismo del gen de la proteína de choque térmico 70-1(*HSPA1A*) en pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1) Estandarizar la técnica PCR-RFLP para la determinación de los alelos del polimorfismo +190 G/C del gen *HSPA1A*
- 2) Determinar los alelos del polimorfismo +190 G/C de *HSPA1A* en pacientes y controles.
- 3) Definir si algún alelo podría ser usado como marcador genético de susceptibilidad al desarrollo de la FPI.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Pacientes con fibrosis pulmonar idiopática

Se estudiaron 73 sujetos mestizos mexicanos no relacionados, con el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática. El diagnóstico se realizó de acuerdo a los parámetros sugeridos por la Sociedad Americana del Tórax y se confirmó mediante el análisis histológico de la biopsia pulmonar. Los criterios de inclusión fueron:

- a) Ser mestizo mexicano (por lo menos 2 generaciones nacidas en México).
- b) Diagnóstico confirmado de fibrosis pulmonar idiopática.
- c) No padecer o haber padecido enfermedades autoinmunes o infecciosas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad.
- d) Estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación y firmar carta de consentimiento.

Se estudiaron setenta y tres pacientes, 44 del sexo masculino (58.27 %) y 29 del sexo femenino (39.72 %) y la edad media fue de 64.77 ± 11.02 años. El estudio se realizó de acuerdo a la Declaración de Helsinki, fue aprobado por el comité de ética institucional y se obtuvo el consentimiento de cada paciente.

5.2. Grupo Control

Se analizaron 79 individuos mestizos mexicanos, voluntarios, no relacionados con los pacientes con FPI, y clínicamente sanos, a los cuales se les realizaron los mismos análisis que al grupo problema. Cincuenta y cinco (69.62%) del sexo femenino y veinticuatro (30.37 %) del sexo masculino, la edad media fue de 58.19 ± 12.01 años

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

5.3. Obtención de muestras de sangre

Con la participación de los alumnos del octavo semestre de la Escuela de Enfermería “Aurelia Saldierna Rodríguez” del INER, y el personal del laboratorio de Oncología Biomédica del mismo Instituto, se realizaron dos campañas de salud en donde se ofreció a los asistentes: medición de glucosa en sangre, oximetría, medidas antropométricas y espirometría. A los asistentes se les invitó a participar de manera voluntaria en el protocolo de investigación. Se les aplicó un cuestionario para conocer sus actividades y su historia médica así como la de sus padres y abuelos.

5.4. Protocolo de extracción de DNA con perclorato de sodio. (BD track GENOMIC DNA ISOLATION KIT, CA. USA)

Después de la toma de muestra de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante. La muestra se homogeneizó durante 10 minutos, fue centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm, posteriormente se separó el suero y se almacenó a -20°C. Al paquete celular se le agregó la solución BD1* para lisar los eritrocitos, se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 10 minutos y eliminó el sobrenadante, al pellet se le agregó la solución BD2* para eliminar los residuos de eritrocitos presentes, después de una agitación en el vortex, se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregó la solución BD3* y se desintegró el pellet, esta mezcla se incubó por 15 minutos a 65 ° C para permitir el lisado de los leucocitos, se adicionó la solución BD4*, la cual precipitó a las proteínas presentes, nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm y se recuperó el sobrenadante en donde se encontraba presente el DNA en solución. Se adicionó isopropanol a -20 °C, para precipitar el DNA, se mezcló, suavemente para evitar la ruptura de las cadenas de DNA, una vez precipitado el DNA, se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregó etanol al 70 % y a -20 °C para eliminar las proteínas presentes. Después de mezclar suavemente, se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar alrededor de una hora a temperatura ambiente. Finalmente se le adicionaron 300 µL de agua destilada-

desionizada y se almacenó a -70°C . (* Los componentes de las soluciones se encuentran descritos en el anexo 1)

5.5. Integridad del DNA genómico.

Para verificar la integridad del DNA obtenido, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TBE (108 g Tris-HCl, 55 g HBO_3 , 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8), y 5 μL de bromuro de etidio, se revelaron en un transiluminador donde se observó que no estuviera degradado, como se observa en la imagen 2. Una vez extraído el DNA y habiendo observado su integridad, se cuantificó en un NANODROP (Thermo Scientific). Una vez conocida su concentración se preparó una dilución con una concentración de 50 ng/ μL .

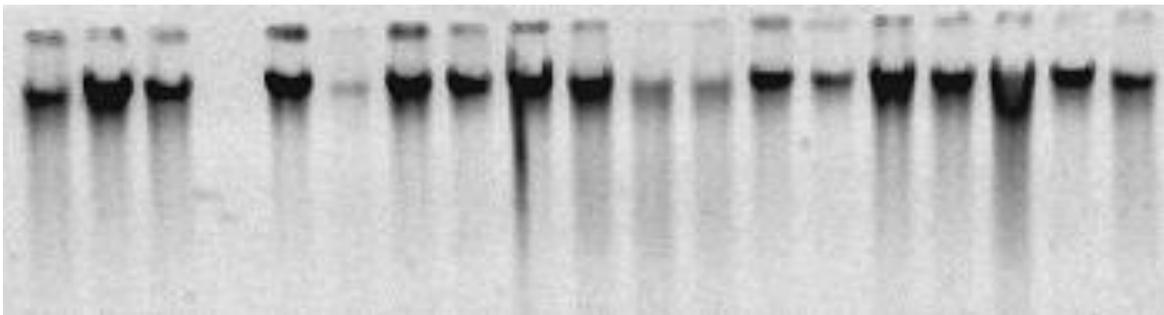


Figura 6. Integridad del DNA extraído de muestras sanguíneas.

5.6. Generalidades de la reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés), fue utilizada por primera vez por Kary Mullis en 1983. El ADN amplificado puede ser clonado directamente o usado en una gran variedad de procedimientos analíticos.

En la PCR dos oligonucleotidos son sintetizados cada uno como secuencia complementaria de una hebra opuesta (secuencia de un segmento en cada una de las hebras) del ADN blanco en posiciones que estén más allá de aquellas donde termina el segmento a ser amplificado. Los oligonucleotidos sirven como cebadores con sus extremos 3' orientados en direcciones opuestas.

El ADN aislado que contiene el segmento a ser amplificado es calentado levemente para ser desnaturalizado (separado en hebras sencillas), después se enfría en presencia de grandes cantidades de los oligonucleotidos sintéticos, lo que permite que por hibridización, se encuentren las secuencias complementarias. En este momento se agregan los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfato y el segmento hibridizado sirve como cebador para iniciar la amplificación. El proceso de calentamiento y enfriamiento se lleva a cabo unas 25-30 veces en algunas horas en un aparato que lo hace automáticamente, hasta que el fragmento puede ser analizado o clonado.

Los segmentos son amplificados utilizando una ADN polimerasa resistente a los cambios de temperatura como la *TaqI* polimerasa (aislada de una bacteria Termófila). Si se diseñan con cuidado los cebadores de tal forma que contengan sitios de corte para endonucleasas, se puede facilitar mucho la clonación del ADN amplificado (82).

5.7. Condiciones para el PCR.

Para la reacción en cadena de la polimerasa de los fragmentos de los genes HSPA1A, , se utilizaron primer's, 25 pM (5'TCC GGC GTC CGG AAG GAC C 3' y 3'TGC GGC CAA TCA GGC GCT T 5'), previamente reportados por Alarcón y colaboradores, amortiguador PCR 10 X, deoxinucleotidos trifosfato (dNTP's) 2 mM, cloruro de magnesio (MgCl) 50 mM, Taq polimerasa (Platinum® *Taq* DNA Polymerase) y 200 ng de DNA genómico y se llevó a un volumen de 25 µL con agua destilada y desionizada. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, el cual se programó de la siguiente manera: una temperatura inicial de 94 °C por 4 minutos, 30 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto, y 72 °C por 3 minutos (2, 3, 4), una temperatura final de 72 °C por 10 minutos.

5.8. Productos de PCR.

Para determinar si la PCR se llevó a cabo de manera correcta y corroborar si se obtuvieron los productos deseados (325 pb), estos se corrieron en geles de agarosa al 2.5 % en amortiguador TBE con 5 μ L de bromuro de etidio. Una vez verificada la presencia de los productos de la reacción, se sometieron a digestión enzimática para observar los patrones de bandeo correspondientes a cada uno de los alelos reportados.

5.9. Análisis de los fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphisms).

Existen dos tipos de enzimas de restricción. Las enzimas de tipo I que están conformadas por tres subunidades: Hsd S que reconoce una secuencia, por lo general a miles de pares de bases del sitio de reconocimiento, Hsd M, que metila el sitio de reconocimiento, y Hsd R corta la secuencia identificada. Este tipo de enzimas se desactivan después de haber sido utilizadas. Las enzimas de tipo II, que cortan un lugar definido en la secuencia de nucleótidos. Reconociendo secuencias palindrómicas en ambas cadenas, que al cortarlas generan extremos romos o cohesivos.

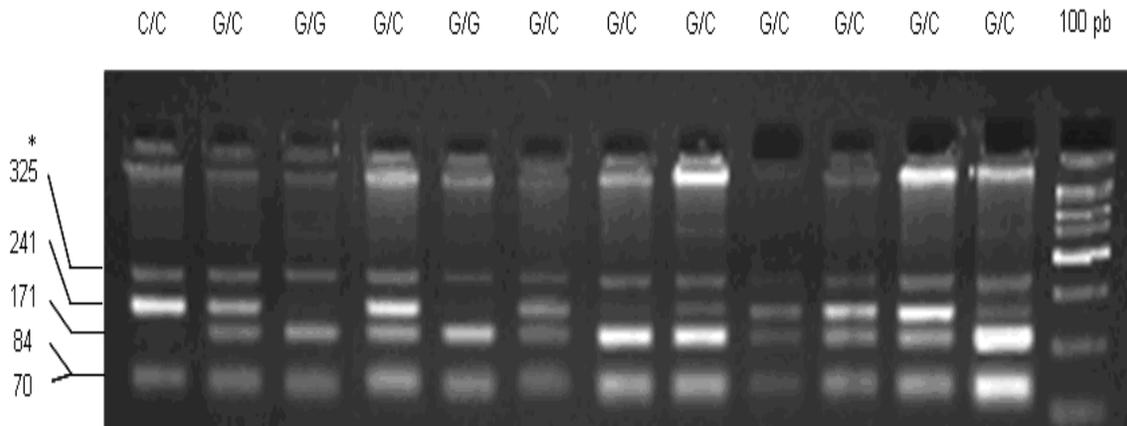
Si dos moléculas de ADN relacionadas son cortadas con la misma enzima de restricción y ambas difieren en un nucleótido reconocido o no por esta enzima, la molécula resulta en fragmentos de diferente tamaño para cada caso, esta diferencia en los tamaños de los fragmentos es a lo que se le llama RFLP. Para poder determinar el fragmento de restricción, las muestras digeridas se corren en geles de agarosa o bien de acrilamida. (83)

5.10. Condiciones para la digestión enzimática.

A un tubo para PCR de 200 μ L se agregaron 5 μ L del producto de PCR, 1 μ L de amortiguador para digestión y 0,5 μ L de la enzima de restricción BsrB1, la cual reconoce y corta en las secuencias 5'CCG-CTC 3' y 3'GGC-GAG 5' (113). Se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 24 horas

5.11. Productos de la digestión enzimática.

Los productos de la digestión enzimática se corrieron en gel de agarosa al 2.5 % con 5 μ L de bromuro de etidio. Los fragmentos obtenidos en la digestión de *HSPA1A* 190 G/C (rs1043618), fueron de 171, 84 y 70 pb para el alelo G y 241 y 84 pb para el alelo C.



* En este caso no se digiere completamente el producto de PCR de *HSP70-1 +190*, por lo que en todos las muestras se presenta una banda de 325pb.

Figura 7. Patrón de bandeo para los productos de la digestión enzimática

5.12. Análisis estadístico.

El método estadístico empleado para el análisis de resultados incluyó: cálculo de frecuencias génicas, y genotípicas, además, para conocer la significancia estadística de una posible asociación, calcular la razón de momios (OR), la cual es útil para cuantificar la asociación entre la exposición y la presencia de enfermedad, y el intervalo de confianza del 95% se utilizó el paquete estadístico Epi Info versión 6.04b (Epi Info v6.04b; Stone Mountain, GA).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se incluyeron en este estudio un total de 152 sujetos, los cuales se agruparon de la siguiente manera: 73 pacientes con FPI y 79 sujetos controles sanos. A los dos grupos se les tipificó el polimorfismo 190 G/C (dbSNP 1043618) del gen *HSPA1A*.

La distribución de las frecuencias génicas se muestran en la tabla 3, en la que podemos observar que en el grupo de pacientes con FPI la frecuencia del alelo G es de 73% (fg = 0.73) y el alelo C es de 27% (fg = 0.27), mientras que en el grupo de sujetos controles sanos el alelo G representa el 59% (fg = 0.59) y el alelo C 41% (fg = 0.41). Al comparar las frecuencias entre ambos grupos, el análisis nos mostró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del alelo G entre el grupo de pacientes y el grupo de controles (f.g. = 0.73 en pacientes con FPI y f.g. = 0.59 en sujetos controles sanos, $p = 0.01$, OR = 1.92, el 95% CI = 1.15 -- 3.2) como se observa en la tabla 3.

HSP70-1	n = 73	n = 79		OR	p	IC (95%)	
190 G/C (rs1043618)	(146 alelos)	(158 alelos)					
	FPI	fg	C	Fg			
G	107	0.73	93	0.59	1.92	0.01	1.15 -- 3.21
C	39	0.27	65	0.41	0.52	0.01	0.31 -- 0.87

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; fg frecuencia génica; OR odds ratio; p nivel de significancia. FPI; pacientes con fibrosis pulmonar idiopática; C controles sanos.

Tabla 3. Frecuencia alélica del gen *HSPA1A*

En la tabla 4 podemos observar las frecuencias genotípicas y tenemos que en el grupo de pacientes con FPI la frecuencia del 55% (fg = 0.40) es para el genotipo homocigoto GG, del 8% (FG = 0.08) para el heterocigoto GC y del 38% (fg = 0.38) para el homocigoto CC. Por otro lado en el grupo de sujetos controles sanos el genotipo GG representa el 37% (fg = 0.37), el genotipo GC el 19 % (fg = 0.19) y del genotipo CC el 44% (fg = 0.44).

Al comparar las frecuencias genotípicas entre ambos grupos, el análisis estadístico mostró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del genotipo GG entre el grupo de pacientes y el grupo de controles (f.g. = 0.55 en pacientes con FPI y f.g. = 0.37 en sujetos controles sanos, p = 0.03, OR = 2.09, el 95% CI = 1.04 -- 4.22), como se observa en la tabla 4.

Se puede observar que tanto el alelo G como el genotipo GG se encuentran incrementados en el grupo de pacientes con FPI, al hacer la comparación entre los controles y los pacientes con FPI se observan diferencias estadísticamente significativas con un OR = 1.92, una p=0.01 y un IC de 1.15 a 3.2 para el alelo G y un OR de 2.09, una p=0.03 y un IC de 1.04 a 4.22 para el genotipo GG, por lo que consideramos que el alelo G puede estar confiriendo cierto grado de susceptibilidad al desarrollo de la FPI, esto se potencia cuando se hace el análisis por genotipo y se observa GG con un OR mayor (OR = 2.09) que cuando se analiza por alelo (OR = 1.92), con esto se apoya que el alelo G es un alelo de riesgo. Por otro lado podemos observar que el alelo C pudiera ser un alelo de protección (f.g. = 0.27 en pacientes con FPI y f.g. = 0.41 en sujetos controles sanos, p = 0.01, OR = 0.52, el 95% CI = 0.31 a 0.87) pero esto no se observa cuando se realiza el análisis por genotipo ya que el genotipo CC no tiene ninguna significancia estadística como genotipo de protección (F.g. = 0.38 en pacientes con FPI y f.g. = 0.44 en sujetos controles sanos, p = 0.57, OR = 0.74, el 95% CI = 0.37 – 1.49), por lo que no consideramos como posible alelo de protección a C.

HSP70-1 190 G/C	n= 73		n = 79		OR	p	IC (95%)
	FPI	Fg	C	fg			
GG	40	0.55	29	0.37	2.09	0.03	1.04 -- 4.22
GC	6	0.08	15	0.19	0.38	0.09	0.11 -- 1.13
CC	27	0.38	35	0.44	0.74	0.57	0.37 – 1.49

Abreviaturas: IC intervalo de confianza; fg frecuencia génica; OR odds ratio; p nivel de significancia. FPI; pacientes con fibrosis pulmonar idiopática; C controles sanos.

Tabla 4. Frecuencia genotípica del gen *HSPA1A*

7. DISCUSIÓN

Un SNP es un polimorfismo en una secuencia de DNA causado por la variación de un nucleótido a nivel genómico y es un marcador genético muy común en el genoma. Un SNP puede alterar la expresión de un gen y determinar diferencias estructurales en una proteína (46), lo que puede contribuir a la susceptibilidad de algunas enfermedades, entre ellas la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

HSPA1A es un gen constitutivo que se presenta en niveles bajos; sin embargo, al presentarse condiciones de estrés la expresión del gen aumenta considerablemente (52). *HspA1A* es una de las moléculas chaperonas mas conservadas y es esencial para el correcto plegamiento y ensamble de las proteínas (49), está involucrada en la regulación del ciclo celular, en la reparación de daños al DNA y apoptosis (47). Por lo tanto, una modificación en la secuencia de los nucleótidos podría alterar la expresión de la proteína o bien llevar a la perdida de la función de la misma lo que puede brindar cierta susceptibilidad o aumentar el riesgo de padecer alguna enfermedad.

El polimorfismo que se presenta en *HSPA1A* +190 G/C, presenta un cambio en la región 5'UTR, es decir, no existe un cambio en la cadena de aminoácidos, por lo tanto la proteína no presenta modificaciones en su estructura primaria, de tal

manera que sus estructuras superiores permanecerán sin cambio alguno. Sin embargo, y a pesar de que no altera la secuencia de aminoácidos, esta región desempeña un papel en el control de la localización celular, la estabilidad y la eficiencia en la traducción del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) en eucariotas, por lo tanto, podría tener un importante papel regulador en la expresión y función de la proteína Hsp70 (52). En un ensayo *in vivo en células endoteliales HUVEC y no endoteliales HeLa*, el SNP HSPA1A +190 G/C (rs1043618), lleva a una reducción en la actividad promotora y probablemente disminuye el nivel de síntesis de la proteína Hsp70 del alelo +190 G (73).

Nosotros investigamos el polimorfismo +190 G/C de *HSPA1A* y su posible asociación con Fibrosis Pulmonar Idiopática en pacientes con la enfermedad y en un grupo de sujetos sanos en la población mestiza mexicana.

En nuestro estudio se observó que el alelo G y el genotipo GG de *HSPA1A* presentan un factor de riesgo potencial para la fibrosis pulmonar idiopática, utilizando la tipificación de los alelos y confirmando la asociación en un estudio de casos y controles. Este es el primer estudio que encuentra una asociación significativa entre el polimorfismo 190 G/C (rs1043618) de *HSPA1A* y la FPI. Sin embargo, estudios previos han mostrado ciertas asociaciones entre el alelo C de este gen y otras enfermedades como glaucoma en población pakistaní (60),

nefropatía en pacientes con diabetes tipo 2 en polacos (85), cáncer gástrico y ulcera duodenal en mestizos mexicanos (52), y cáncer de pulmón en la población china (46).

La asociación que describimos en este trabajo para el SNP +190 *HSPA1A* con la FPI puede ser debida a que este polimorfismo induce modificaciones en la expresión y la ubicación de *HSPA1A*, lo que lleva a aumentar el riesgo de daño a los tejidos y el progreso de enfermedades como lo es el caso de FPI.

Dado que la FPI es una enfermedad multifactorial y que los factores genéticos y ambientales aun no han sido completamente identificados, se han realizado diversos estudios para su determinación. Tal es el caso de la exposición a polvos de metales o madera, o el consumo de cigarrillos. En este último caso el humo producido por la combustión del cigarro somete a las células del epitelio alveolar a estrés.

Por otro lado y siendo el tema de nuestro interés los factores genéticos, se han observado múltiples polimorfismos en diversos genes que están involucrados en FPI. De tal manera, los polimorfismos presentes en *HSPA1A*, deben ser también considerados en la patogénesis de la enfermedad ya que podrían ayudar a la

célula al correcto plegamiento y translocación de las proteínas a los distintos compartimentos celulares.

Puesto que TGF- β 1 juega un papel primordial en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina a través de varios mecanismos como la activación de los fibroblastos y la estimulación de la transición epitelio mesenquima de células epiteliales, el efecto inhibitorio de HSP70 en la producción de TGF- β 1 puede ser responsable del efecto protector de esta proteína de choque térmico contra la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (90).

Por lo tanto, se puede especular que HSP70 puede proteger contra enfermedades del pulmón tales como la fibrosis pulmonar idiopática (90). Ayudando así a prevenir la diferenciación de los neumocitos tipo 1 a tipo 2 y manteniendo la homeostasis en el tejido. Por otro lado, y apoyando estos resultados, en estudios recientes se han demostrado los efectos antifibróticos de la hipertermia relacionados con la inducción de HSP70 (91).

8. CONCLUSIÓN

Aunque la fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad de causa desconocida, se han considerado en su génesis diversos factores genéticos. En el presente estudio demostramos que el alelo G y el genotipo GG de *HSPA1A* están asociados con la susceptibilidad de la FPI en pacientes mestizos mexicanos.

El siguiente paso sería ampliar el estudio a un mayor número de controles y pacientes para confirmar las tendencias y posteriormente realizar estudios funcionales de la proteína en tejidos de pacientes con la enfermedad. Además, realizar los mismos experimentos para *HSPA1B* y *HSPA1L* y poder evaluar los haplotipos y su posible asociación con la FPI.

9. ANEXO 1. SOLUCIONES Y REACTIVOS

A) Amortiguador de lisis BD1 y BD2.

102 g de sacarosa,
5 mL de Tris-HCl 2M, pH 7.5,
1 g de MgCl₂
10 mL de Tritón 100X
Mezclar en un matraz aforado de 1 L y aforar con H₂O destilada y desionizada. Se almacena a temperatura ambiente.

B) Amortiguador de lisis BD3.

2.19g de NaCl,
4.46 g de Na-EDTA
400 mL de H₂O dd.
Ajustar a pH 8 con NaOH 4M con un potenciómetro y llevar al aforo. Almacenar a temperatura ambiente.

C) BD4.

Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%

Perclorato de sodio (NaClO₄) 5M
Cloruro de sodio (NaCl) 5M.

D) Etanol 70%

70 mL de etanol absoluto grado Biología Molecular.

Aforar a 100 mL con H₂O destilada y desionizada.

E) Gel de agarosa 2%

2g de agarosa

5 µL de Bromuro de etidio

Aforar a 100 mL con amortiguador TBE

F) Amortiguador TBE

108 g Tris-HCl

55 g Ácido Bórico (HBO₃)

40 mL de EDTA 0,5 M pH 8.

Aforar a 1 L con H₂O destilada.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Xaubet A, Molina M, Sánchez M. Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. Arch Bronconeumol 2007; 43(2): 24-30.
2. Navaratnam V, Fleming K, West J, Smith C, Jenkins R, et al. The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the UK. Thorax 2011; 66: 462-467.
3. Pardo A, Selman M. Molecular Mechanism of Pulmonary Fibrosis. Frontiers in Bioscience 2002; 7: 1743-1761.
4. Jones R, Hilldrup S, Hope B, Eccles R, Harrison N. Molecular Mechanism of Pulmonary Fibrosis s. Cough 2001; 7: 2.
5. Balog A, Gyulai Z, Boros LG, Farkas G, Takács T, et al. Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. Pancreas 2005; 30(2): 46-50.
6. Xue J, Gochuico B, Samer A, Feghali C, Noth I, et al. The HLA Class II Allele DRB1*1501 Is Over-Represented in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 2011
7. Datta A, Scotton C, Chambers R. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. British journal Pharmacology 2011; 163: 141-172.
8. Selman M, King T, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. Ann Intern Med 2001; 134: 136-151.
9. Selman M, Mejia M, Pardo A. Fibrosis Pulmonar Idiopática. Revista de Investigación Clínica 2009; 61:233-242.
10. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. Am J Med, 1981; 70: 542-68.
11. King TE Jr, Tooze JA, Schwartz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 164: 1171-81.
12. Cook DN, Brass DM, Schwartz DA. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis. AM J Respir Cell Mol Biol 2002; 27:122-4.
13. Hardie W, Hagood J, Dave V, Perl A, Whitsett J, et al. Signaling pathways in the epithelial origins of pulmonary fibrosis. Cell Cycle 2010; 9(14): 2769-2776.

14. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994; 1:71-81
15. Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, et al. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair Regen* 2005; 13:398-404.
16. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:14098-103.
17. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol* 2003; 171:380-9.
18. Wang CH, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, et al. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:583-91.
19. Andersson-Sjoland A, de Alba CG, Nihlberg K, Becerril C, Ramirez R, et al. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:2129-40.
20. Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 2005; 166:675-84.
21. Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 113:243-52.
22. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33:145-52.
23. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:8407-11.
24. Willis BC, Du Bois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblast during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3: 377-82.

25. Yamada M, Kuwano K, Maeyama T, Hamada N, Yoshimi M, et al. Dualimmunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:453-62.
26. Steele M, Speer M, Loyd J, Brown K, Herron A, et al, Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 2034-41.
27. Zou F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6292-7.
28. Yang I, Burch L, Steele M, Savov J, Hollingsworth J, et al. Gene expression profiling of familial and sporadic cases of interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007.
29. Nelly M, Leigh R, Gilpin S, Martin G, Radford K, et al. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 557-65.
30. Gutters J, Du Bois R. Genetic of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J*. 2005; 25: 915-27.
31. Pantelidis P, Fanning G, Wells A, Welsh K, Du Bois R. Analysis of tumor necrosis factor alfa, lymphotoxin alfa, tumor necrosis factor receptor II and interleukin-6 polymorphism in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1432-6.
32. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, et al. Transforming growth factor beta-1 gene polymorphism are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 431-5.
33. Falfán-Valencia R, Camarena A, Juárez A, Becerril C, Montaña M. Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet*. 2005 Nov;118 (2):235-44.
34. Aquino-Galvez A, Pérez-Rodríguez M, Camarena A, Falfan-Valencia R, Ruiz V, et al. MICA polymorphisms and decreased expression of the MICA receptor NKG2D contribute to idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility. *Hum Genet*. 2009 Jun; 125 (5-6):639-48.
35. McCarty S, Syed F y Bayat A. Role of the HLA System in the Pathogenesis of Dupuytren's Disease. *HAND* 2010; 5:241–250

36. Pauline L Kamath and Wayne M Getz. Adaptive molecular evolution of the Major Histocompatibility Complex genes, DRA and DQA, in the genus *Equus*. *BMC Evolutionary Biology* 2011, 11:128
37. G.L. Shi, X.L. Hu, L. Yang, C.L. Rong, Y.L. Guo and C.X. Song Association of HLA-DRB alleles and pulmonary tuberculosis in North Chinese patients *Genetics and Molecular Research*. 2011;10 (3): 1331-1336
38. Xinyi Cindy Zhang, Shuying Sue Li, Hongwei Wang, John A Hansen and Lue Ping Zhao. Empirical evaluations of analytical issues arising from predicting HLA alleles using multiple SNPs. *BMC Genetics* 2011, 12:39
- 39- Klein, J. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex* (Wiley, New York, 1986).
- 40- NATURE. VOL 401. 1999. www.nature.com
- 41- Tiwari, J. L. & Terasaki, P. I. *HLA and Disease Associations* (Springer, Berlin, 1985).
- 42- Trowsdale, J. & Campbell, R. D. Map of the human major histocompatibility complex. *Immunol.* (1997).
- 43- Ruddy, D. A. et al. A 1.1-Mb transcript map of the hereditary hemochromatosis locus. *Genome Res.* 7, 441–456 (1997).
- 44- Gruen, J. R. & Weissman, S. M. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 90, 4252–4256 (1997)
- 45- Haino, M. et al. Comparison and evolution of human immunoglobulin VH segments located in the 390.8-megabase region: Evidence for unidirectional transfer of segmental gene sequences. *J. Biol. Chem.* 269, 2619–2626 (1994).
46. Wang Y, Zhou F, Wu Y, Xu D, Li W, et al. The relationship between three heat shock protein 70 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(11):1657-63.
47. Zhou F, Wang F, Li F, Yuan J, Zeng H, Wei Q, et al. association of hsp70-2 and hsp70-hom gene polymorphism with risk of acute high-altitude illness in a Chinese population. *Cell Stress and Chaperones* 2005; 10 (4):349-356.
48. Kampinga H, Hageman J, Vos M, Kubota H, Tanguay R, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 2009; 14:105–111
49. Wisniewska M, Karlberg T, Letiö L, Johansson I, Kotenyova T, et al. Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms:

HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B',HSPA5/BiP/GRP78. 2009

50. Kampinga H, Hageman J, Vos M, Kubota H, Tanguay R, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones* 2009; 14: 105-111.

51. Fourie A, Peterson P, Yang Y. Characterization and regulation of the major histocompatibility complex-encoded proteins Hsp70-Hom and Hsp70-1/2. *Cell Stress and Chaperones* 2001; 6(3): 282-295.

52. Partida O, Torres J, Flores L, Camorlinga M, Nieves M, et al. Polymorphism in TNF and HSP70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 1861-1868.

53. Cornford P, Dodson A, Parsons K, Desmond A, Woolfenden A, et al. Heat Shock Protein expression Independently Predicts Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Cancer Research* 2000; 58: 7099-7105.

54. Vargas G, Granados J, Martinez J, Gómez E, Zuñiga J, Salgado N, et al. Lack of association between the polymorphism at the heat shock protein (HSP70-2) gene and systemic lupus erythematosus (SLE) in the Mexican Mestizo population. *Genes and Immunity* 2000; 1: 367-370.

55. Ciocca D, Calderwood S. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress and Chaperones* 2005; 10(2): 86-103.

56. Aoki M, Yamamoto K, Ohyama S, Yamamura Y, Takenoshita S, et al. A genetic variant in the gene encoding the stress70 protein chaperone family member STCH is associated with gastric cancer in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335(2):566-74.

57. Tahara T, Shibata T, Arisawa T, Nakamura M, Yoshioka D, et al. The BB genotype of heat-shock protein (HSP) 70-2 gene is associated with gastric pre-malignant condition in H. pylori-infected older patients. *Anticancer Res*; 29(8):3453-8. 2009.

58. Buraczynska M, Swatowski A, Buraczynska K, Dragan M, Ksiazek A. Heat-shock protein gene polymorphisms and the risk of nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(1):81-6. 2009.

59. Ayub H, Imran M, Micheal S, Akhtar F, Ajmal M, et al. Association of eNOS and HSP70 gene polymorphisms with glaucoma in Pakistani cohorts. *Molecular Vision* 2010; 16:18-25

60. Tosaka K, Mashima Y, Funayama T, Ohtake Y, Kimura I. Association between open-angle glaucoma and gene polymorphism for heat-shock protein 70-1. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51(6):417-23. 2007
61. Mir KA, Pugazhendhi S, Paul MJ, Nair A, Ramakrishna BS. Heat-shock protein 70 gene polymorphism is associated with the severity of diabetic foot ulcer and the outcome of surgical treatment. *Br J Surg* 2009; 96(10):1205-9.
62. Nam SY, Kim N, Kim JS, Lim SH, Jung HC, et al. Heat shock protein gene 70-2 polymorphism is differentially associated with the clinical phenotypes of ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(7):1032-8.
63. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bunce M, Bell JI, et al. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55(4):491-9.
64. Rusai K, Banki NF, Prokai A, Podracka L, Szebeni B, et al. Heat shock protein polymorphism predisposes to urinary tract malformations and renal transplantation in children. *Transplant Proc* 2010. 42(6):2309-11.
65. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, et al. Heat shock protein 70 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res* 2007; 61(3):371-4.
66. Fekete A, Treszl A, Tóth-Heyn P, Vannay A, Tordai A, et al. Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res.* 54(4):452-5.2003.
67. Wu YR, Wang CK, Chen CM, Hsu Y, Lin SJ, et al. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Hum Genet* 2004; 114(3):236-41.
68. Pae C, Drago A, Kim J, Mandelli L, De Ronchi D, et al. The Impact of Heat Shock Protein 70 Gene Variations on Clinical Presentation and Outcome in Schizophrenic Inpatients. *Neuropsychobiology* 2009;59:135–141
69. Fung HC, Chen CM, Wu YR, Hsu WC, Ro LS, et al. Heat shock protein 70 and tumor necrosis factor alpha in Taiwanese patients with dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 20(1):1-7.
72. Liu J, Cheng J, Peng J, Han S, Yu L, et al. Effects of polymorphisms of heat shock protein 70 gene on ischemic stroke, and interaction with smoking in China. *Clin Chim Acta* 2007; 384(1-2):64-8.

71. Schroeder S, Reck M, Hoeft A, Stüber F. Analysis of two human leukocyte antigen-linked polymorphic heat shock protein 70 genes in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27(7):1265-70.
72. Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Costarelli L, Malavolta M, et al. Involvement of –308 TNF- α and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology* 2006; 7:347–356
73. He M, Guo H, Yang X, Zhang X, Zhou L, et al. SNPs in HSPA1A Gene Predict Risk of Coronary Heart Disease. 2009
74. Fekete A, Vér A, Bögi K, Treszl A, Rigó J Jr. Is preeclampsia associated with higher frequency of HSP70 gene polymorphisms?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 126(2):197-200.
75. Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Perni SC, Chasen ST, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor- α gene at position -308 and the inducible 70 kd heat shock protein gene at position +1267 in multifetal pregnancies and preterm premature rupture of fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4):1368-74.
76. Yang M, Tan H, Yang Q, Wang F, Yao H, et al. Association of hsp70 polymorphism with risk of noise-induced hearing loss in Chinese automobile workers. *Cell Stress and Chaperones* 2006; 11(3): 233-239.
77. Konings A, Van L, Michel S, Pawelczyk M, Carlsson P, et al. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. *European Journal of Human Genetics* 2009; 17: 329 – 335.
78. Temple SE, Cheong KY, Ardlie KG, Sayer D, Waterer GW. The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B. setemple@cyllene.uwa.edu.au. 2004; 30(9):1761-7.
79. Qi Y, Niu WQ, Zhu TC, Liu JL, Dong WY, et al. Genetic interaction of Hsp70 family genes polymorphisms with high-altitude pulmonary edema among Chinese railway constructors at altitudes exceeding 4000 meters. *Clin Chim Acta* 2009; 405(1-2):17-22.
80. Zhang H, Jin T, Zhang G, Chen L, Zou W, et al. Polymorphisms in Heat-shock Protein 70 Genes Are Associated with Coal Workers' Pneumoconiosis in Southwestern China. *In vivo* 2011; 25: 251-258.
81. Bogunia-Kubik K, Koscińska K, Suchnicki K, Lange A. HSP70-hom gene single nucleotide (+2763 G/A and +2437 C/T) polymorphisms in sarcoidosis. *Int J Immunogenet* 2006; 33(2):135-40.

82. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/pcr.html> (25-01-12, 14:38)
83. Morena Rojas Juan Pablo. "Estandarización de una PCR-RFLP para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima paraoxonasa 1 (PON1) en niños costarricenses con leucemia linfocítica aguda". 2009
84. Xu J, Wang K, Zhang X, Qiu Y, Huang D et al. HSP70: a promising target for laryngeal carcinoma radiotherapy by inhibiting cleavage and degradation of nucleolin. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 29:106. (2010).
85. Buraczynska M, swatowski A, Buraczynska K, Dragan M and Ksiazek A. Heat-shock protein gene polymorphisms and the risk of nephropaty in patients whit Type 2 diabetes. *Clinical Science*. 116:81-86 (2009).
86. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens*; 64:631(2004)
87. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*.11(8):579-92. (2010).
88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3303>
89. Jason C. Young *Biochem. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system* *Cell Biol*. 88: 291–300 (2010)
90. Tanaka K, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-infuced pulmonary fibrosis in mice. *Biochemical Pharmacology* 80:920-931. (2010).
91. Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T y Yoshioka. Association between heat stress protein 70 induction and decreased pulmonary fibrosis in an model of acute lung injury. *Lung* 185: 287-293. (2007)