



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias



Ismael Cosío Villegas

Nombre del proyecto específico: Evaluación de variantes genéticas en genes de receptores tipo Toll (*TLR2* y *TLR4*) en enfermedad pulmonar obstructiva crónica secundaria a humo de la quema de biomasa

Lugar de realización: INER
Departamento de investigación en inmunogenética y
alergia
❖ Laboratorio de HLA
❖

Periodo: del 4 de marzo de 2019 a 4 de septiembre de 2019

Proyecto genérico correspondiente: Evaluación de productos relacionados con la salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Alumno: Islas López Mario Alberto

Tutor interno: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Tutor externo: Dra. Gloria Pérez Rubio

❖ Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes y limitación del flujo aéreo. Es ocasionada por exposición significativa a partículas o gases nocivos (GOLD, 2018). Los datos epidemiológicos actuales hacen referencia, en su mayoría, a EPOC secundaria a exposición al humo de cigarro, sin embargo, la exposición al humo proveniente de la quema de biomasa es otro factor de riesgo importante para el desarrollo de dicha patología (Pérez-Padilla et al., 2012). Se considera biomasa, a la quema del conjunto de recursos naturales, en su mayoría leña, aunque puede emplearse: carbón vegetal, desechos de agricultura e incluso estiércol. La quema de biomasa se utiliza, como fuente de energía, al interior de las habitaciones, es un medio para calentar el hogar o para preparar los alimentos (International Finance Corporation, 2017), sobre todo en zonas de bajos recursos (Zhou et al., 2009). En México, en 2002, el 12% de la población utilizaba combustibles sólidos como fuente de energía, a pesar de que en ese mismo año se reportaron 1,510 muertes secundarias a dicha exposición (OMS/OPS, 2007). En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, cerca de un 30% de los pacientes con EPOC que acuden al hospital, es secundaria a la exposición al humo proveniente de la quema de biomasa, aproximadamente el 88% son mujeres mayores de 40 años que, durante el transcurso de su vida, se han expuesto de forma directa al humo de biomasa (Ramírez-Venegas et al., 2006).

La fisiopatología en EPOC por exposición al humo de biomasa no está del todo clara, sin embargo, existen diversas teorías que explican los mecanismos involucrados (McCarthy et al., 2016), (He et al., 2017), (Hu et al., 2013). En un modelo animal, después de 7 meses de exposición al humo procedente de la combustión de biomasa se reportó que, en fluido de lavado broncoalveolar (BALF), estaba aumentada, hasta dos veces, la concentración de TNF α , INF γ , IL-6, IL-17, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , MIP-3 α y RANTES en comparación con el grupo no expuesto (He et al., 2017). En ratones *knockout*, se comprobó que el material particulado es capaz de activar TLR4 por medio de lipopolisacáridos y posteriormente promover inflamación pulmonar al liberar TNF- α (Fonceca et al., 2018). En humanos se ha observado que, especialmente TLR2 y TLR4, reconocen bacterias grampositivas y gramnegativas que contribuyen a la progresión de la enfermedad o a la presencia de exacerbaciones (Budulac et al., 2012). La respuesta inmune innata se considera un detonante en la patogénesis de la EPOC puesto que promueve la inflamación. (Apostolou et al., 2017). Previamente, en pacientes con EPOC secundaria a tabaquismo, identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en *TLR2* y *TLR4* asociados con una disminución de la función pulmonar y cambios en el número de células inflamatorias de esputo inducido (Budulac et al., 2012). Actualmente, aún no se ha evaluado la asociación de estos SNP en *TLR2* y *TLR4* en EPOC secundaria a humo proveniente de la quema de biomasa.

❖ Objetivo

Evaluar la asociación de polimorfismos tipo SNP en el gen *TLR4* (rs4986791, rs4986790) y *TLR2* (rs5743708, rs5743704, rs3804099, rs3804100) en pacientes expuestas a quema de biomasa con diagnóstico de EPOC.

❖ Metodología

Población de estudio

Criterios de inclusión

Mujeres mexicanas (al menos dos generaciones).

Mayores de 35 años.

Exposición continua al humo proveniente de la quema de biomasa de al menos 10 años y con un índice de exposición a biomasa (IEHB) ≥ 10 horas al año.

Aceptación de forma voluntaria a participar en el estudio.

Casos: Diagnóstico de EPOC realizado por un médico neumólogo y FEV1/FVC posbroncodilatador $< 70\%$.

Controles: Diagnóstico negativo de EPOC realizado por un médico neumólogo y FEV1/FVC posbroncodilatador $\geq 70\%$.

Criterios de exclusión

Exposición al humo procedente de la quema de biomasa < 10 horas al año.

Pacientes exacerbadas.

Que padezcan asma, bronquiectasias, cáncer pulmonar, etc.

Criterios de eliminación

Cuestionario incompleto.

DNA de baja concentración o con impurezas.

Prueba de espirometría de mala calidad.

Toma y transporte de muestras sanguíneas a pacientes

- Se invitó a los pacientes del departamento de Investigación de Tabaquismo y EPOC (DITABE) del INER a participar, de forma voluntaria, en el estudio, para ello, firmaron un consentimiento informado correspondiente al protocolo de dicho estudio.
- De cada participante, se tomó una muestra de sangre periférica y se le aplicó un cuestionario sobre antecedentes hereditarios y de historia de exposición a polvos o gases nocivos.

- Las muestras se recolectaron en tubos de EDTA de 5 mL (2 tubos EDTA por paciente).

Extracción de DNA

- Se extrajo DNA con reactivos del estuche comercial “BDtract Genomic DNA Isolation”.
- Previamente, las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4500 rpm.
- La capa de leucocitos fue tomada con una pipeta pasteur y se transfirió a un tubo cónico de 50 mL, se adicionaron 4 mL del reactivo BD1 del estuche comercial (“BDtract Genomic DNA Isolation), se agito en vórtex y se centrifugo 10 minutos a 4500 rpm.
- El sobrenadante fue desechado, se verificó la presencia del precipitado, se adicionaron 4mL de reactivo BD2 y se agito en vórtex, se llevó a cabo centrifugación por 10 minutos a 4500 rpm.
- El sobrenadante fue desechado, se verificó la presencia del precipitado, se adicono 1 mL de reactivo BD3 y se agito en vortex, se centrifugo por 10 minutos a 4500 rpm
- El tubo, perfectamente cerrado, se incubo a 65°C toda la noche.
- Después de la incubación, del tubo cónico se tomarán 500 µL de la mezcla y se transfirió a un tubo eppendorff, los 500 µL restantes se colocaron en otro tubo eppendorff.
- Se adicionó 200 µL de reactivo BD4 a cada tubo eppendorff, fueron agitados en vórtex y centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante fue decantado en otro tubo eppendorff y el precipitado fue desechado. Al tubo con el sobrenadante se le adicono 400 µL de isopropanol, se agitó cuidadosamente y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante fue desechado y se verifico la presencia del DNA precipitado, se dejó secar y finalmente, se almaceno en solución amortiguadora tris-EDTA (350 µL a -80 ° C) hasta su uso.

Cuantificación y determinación de la pureza del DNA obtenido

- En el equipo de microespectrofotometría se realizó la cuantificación del DNA a 260 nm.
- Se determinó la pureza del DNA obtenido mediante el cociente 260/280, este debía encontrarse entre 1.8 y 2.

Selección de las variantes genéticas evaluadas

Las variantes genéticas se seleccionaron, principalmente, por estar descritas en alguna otra patología pulmonar, estas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Variantes genéticas evaluadas en el estudio

Gen	Cromosoma	SNP	Posición (pb)
TL2	4q31.3	rs5743708	153705165
		rs5743704	153704799
		rs3804099	153703504
		rs3804100	153704257
TLR4	9q33.1	rs4986791	117713324
		rs4986790	117713024

Reacción en cadena de la polimerasa en su modalidad discriminación alélica

- Se realizó el ajuste de concentración del DNA a 15 ng/μl de aquellas muestras que cumplieron con los criterios de pureza.
- Las muestras fueron genotificadas mediante discriminación alélica usando sondas Taqman, para ello se utilizó el termociclador para PCR en tiempo real (7300 Real Time PCR Systems, Applied Biosystems).
- Los fluoróforos empleados fueron VIC y FAM para los respectivos alelos de cada polimorfismo evaluado.
- La reacción de PCR se llevó a cabo empleando 3μl del DNA previamente ajustado.
- Fueron incluidos cuatro controles negativos (controles de contaminación) para cada placa de genotificación.
- La mezcla de PCR estuvo compuesta, para una placa de: 250 μl de mezcla maestra, la cual contiene el fluoróforo Rox, enzima polimerasa Mg²⁺ en solución amortiguadora; 300 μl de agua libre de DNasa y RNasa y 7μl de sonda TaqMan (40X) las cuales contenían los fluoróforos VIC y FAM para cada polimorfismo a evaluar.
- Cada placa fue sellada con mica óptica, se agitaron y se centrifugaron a 2000 rpm por 30 segundos.
- Cada placa fue analizada bajo las siguientes condiciones de ciclaje: Pre-lectura 50°C, 1 minuto; cuantificación absoluta: 50°C, 2 minutos, 1 ciclo; 95°C, 10 minutos, 1 ciclo; 95°C, 15 segundos, 60°C 1 minuto, 40 ciclos; post-lectura 50°C, 1 minuto.
- La asignación de genotipos se realizó tomando en consideración la discriminación alélica y fue confirmada por medio de la cuantificación absoluta.
- La interpretación fue realizada a través del programa informático *Sequence Detection Software (SDS v. 1.4)*.

Métodos estadísticos

Para describir la población de estudio fue empleado el programa estadístico SPSS v. 20.0 para Windows con el cual se determinó la mediana y los valores mínimo y máximo de cada variable. Las frecuencias genotípicas y alélicas de los grupos estudiados fueron comparadas mediante tablas de contingencia empleando prueba exacta de Fisher, para esto se emplearon los programas EpiInfo versión 7.0 y Epidat

3.1. El análisis de haplotipos se realizó mediante el uso del programa Haploview versión 4.2.

❖ **Recursos Necesarios**

- Acceso al departamento de investigación en tabaquismo y EPOC del INER.
- Material para la toma y transporte adecuado de muestras sanguínea de los pacientes
- Reactivos del estuche comercial “BDtract Genomic DNA Isolation”.
- Equipo de microespectrofotometría para cuantificar y determinar la pureza del DNA obtenido.
- Reactivos para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su modalidad de discriminación alélica.
- Equipo de PCR en tiempo real.
- Computadora de escritorio para llevar a cabo el análisis de los resultados empleando los programas estadísticos SPSS v.20, EpiInfo v.7.0, Epidat v.3.1 y Haploview v4.2.

• **Actividades realizadas,**

- ✓ Presentación de artículos científicos en el laboratorio HLA.
 - ✓ Asistencia a seminarios de discusión de artículos.
 - ✓ Reporte de avances semanales de actividades relacionadas al trabajo de laboratorio.
 - ✓ Toma de muestras sanguíneas y recolección de datos.
 - ✓ Extracción de DNA y almacenamiento de la muestra
 - ✓ Realización de las placas empleadas para el ensayo de PCR en tiempo real.
 - ✓ Realización del ensayo de PCR en tiempo real.
 - ✓ Obtención y análisis de los resultados empleando los programas estadísticos SPSS v.20, EpiInfo v.7.0 y Epidat v.3.1.
 - ✓ Elaboración del reporte final del servicio social.
 - ✓ Presentación de los resultados finales, obtenidos durante el servicio social, ante integrantes del laboratorio HLA (investigadores y alumnos de pregrado y posgrado.
 - ✓ Preparación y presentación de resultados en las 51 Jornadas Médico Quirúrgicas y 1er. Congreso Nacional de Influenza. INER 4, 5 y 6 de septiembre.
- **Objetivo**
- ✓ Evaluar la asociación de polimorfismos tipo SNP en el gen *TLR4* (rs4986791, rs4986790) y *TLR2* (rs5743708, rs5743704, rs3804099, rs3804100) en pacientes expuestas a quema de biomasa con diagnóstico de EPOC
- **Metas alcanzadas**
- ✓ Asociación de polimorfismo, rs498679 del gen *TLR4* en 206 pacientes expuestas a humo de la quema de biomasa

- ✓ Presentación de los resultados finales, obtenidos durante el servicio social, ante integrantes del laboratorio HLA (investigadores y alumnos de pregrado y posgrado).
- ✓ Preparación y presentación de resultados en las 51 Jornadas Médico Quirúrgicas y 1er. Congreso Nacional de Influenza. INER 4, 5 y 6 de septiembre.

❖ Resultados

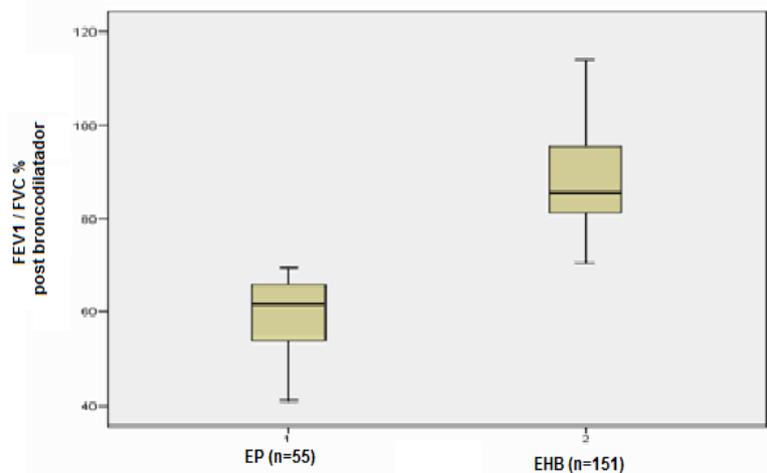
Se recolectaron 206 participantes, todas ellas fueron mujeres que se clasificaron en 2 grupos según los criterios diagnósticos de los médicos neumólogos y las pruebas de función pulmonar; el primer grupo estuvo compuesto de pacientes con EPOC secundaria a quema de biomasa, (EP, n=55) y el segundo de mujeres expuestas a humo de biomasa sin presencia de EPOC (EHB, n= 151). En la tabla 2 se muestran las variables demográficas de la población de estudio, en esta se puede observar que, el peso y tiempo de exposición al humo de la quema de biomasa no presentan diferencias estadísticamente significativas en la población de estudio, sin embargo, edad, talla, índice de masa corporal, horas de uso de biomasa, índice de exposición al humo de la quema de biomasa (IEHB), así como los valores de las pruebas de función pulmonar pre y post broncodilatador, se encontraron con diferencia estadísticamente significativa; estas últimas variables eran de esperarse debido a la naturaleza de la enfermedad.

Tabla 2. Variables demográficas y clínicas de la población de estudio.

Variable	EP (n=55)	EHB (n=151)	p*
Edad (años)	74 (48-88)	57 (38-89)	0.000
Peso (kg)	61 (40-88)	62 (34-96)	0.105
Talla (m)	1.48 (1.36-1.70)	1.45 (1.31-1.57)	0.044
IMC (kg/m ²)	27.93 (18.26-39.72)	29.34 (14.89-43.24)	0.005
Uso de biomasa (h)	8 (1-15)	5 (1-16)	0.000
Tiempo de exposición (años)	40 (7-80)	42(6-75)	0.056
IEHB (h/año)	320 (10-840)	195 (12-924)	0.000
FVC % (pre)	81 (43-122)	95 (51-153)	0.000
FEV1 % (pre)	61 (27-89)	101 (44-157)	0.000
FEV1/FVC % (pre)	58.02 (34-83)	83.7 (51-120)	0.000
FVC % (post)	86 (57-120)	97 (56-152)	0.000
FEV1 % (post)	69 (13-98)	104 (49-155)	0.000
FEV1/FVC % (post)	61.6 (41-69)	85.6 (70-114)	0.000

En la tabla se muestran medianas (valor mínimo-valor máximo). El valor de p fue obtenido mediante la prueba U de Mann-Whitney. p<0.05 fue considerada como diferencia estadísticamente significativa.

IMC, Índice de masa corporal; IEHB, índice de exposición al humo de la quema de biomasa; FVC, Capacidad Vital Forzada, FEV1, Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo; pre, pre broncodilatador; post, post broncodilatador.



Grafica 1. Grupos EP y EHB vs el Cociente FEV1/FVC (%) post broncodilatador
 En la gráfica 1, se presenta la distribución del cociente de FEV1/FVC post broncodilatador ya que, esta fue la principal variable empleada para la clasificación de los grupos de estudio.

Determinación de equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de estudio

De los 6 SNP analizados, todos ellos cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla 3), por lo tanto, todos fueron analizados en cuanto a la asociación con la enfermedad.

Tabla 3. Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de estudio de los SNP estudiados.

Gen	SNP	HW p
<i>TLR4</i>	rs4986790	0.53
	rs4986791	1.00
<i>TLR2</i>	rs3804099	0.29
	rs3804100	0.98
	rs5743704	1.00
	rs5743708	1.00

HW, Hardy-Weinberg

Análisis de asociación genotípica y alélica de los polimorfismos en *TLR2* y *TLR4*

Los SNP de los genes *TLR4* (rs4986790, rs4986791) y *TLR2* (rs5743708, rs5743704, rs3804099, rs3804100), evaluados presentaron frecuencias genotípicas y alélicas similares en ambos grupos de estudio (tabla 4), excepto para el rs4986790

ubicado en el gen *TLR4*, en este se observa que, el genotipo heterocigoto es un factor de riesgo (OR=4.08, IC 95% 1.03-7.71)AG tiene una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0456$), siendo mayor en el grupo de casos vs. controles (14.81% vs. 4.13%). Para las frecuencias alélicas, se observa que, el alelo G se encuentra asociado a riesgo ($p=0.0456$, OR=2.82) en la EPOC secundaria a quema de biomasa. En la tabla 5. se describe el modelo dominante, el cual indica que, existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0384$ y OR=3.42) en portadores del genotipo AG y GG con respecto a los portadores AA cuando son comparados los grupos de estudio. Este resultado indica que, los individuos que porten una copia o dos del alelo G, presentan el mismo riesgo de desarrollar la enfermedad.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNP en *TLR4* y *TLR2* evaluados

SNP/Gen	Casos (EP=55)	Controles (EHB=151)	p	OR	IC, 95%
<i>rs5743708/TLR2</i>	n (%)	n (%)			
GG	55 (100%)	146 (100%)	NS		
AG	0	0			
AA	0	0			
G	110 (100%)	316 (100%)			
A	0	0			
<i>rs3804099/TLR2</i>					
TT	29 (52.77%)	76 (51.70%)	NS		
CT	22 (40.00%)	63 (42.85%)			
CC	4 (7.27%)	8 (5.44%)			
T	80 (72.72%)	215 (73.12%)			
C	30 (27.27%)	79 (26.87%)			
<i>rs3804100/TLR2</i>					
TT	47 (87.03%)	122 (82.43%)	NS		
CT	7 (12.96%)	24 (16.21%)			
CC	0	2 (1.35%)			
T	101 (93.51%)	276 (90.54%)			
C	7 (6.48%)	28 (9.45%)			
<i>rs5743704/TLR2</i>					
CC	54 (98.18%)	144 (100%)	NS		
AC	1 (1.81%)	0			
AA	0	0			
C	109 (99.09%)	288 (100%)			
A	1 (0.90%)	0			
<i>rs4986791/TLR4</i>					
CC	50 (94.33%)	138 (96.50%)	NA		
CT	3 (5.66%)	5 (3.49%)			
TT	0	0			
C	103 (97.16%)	281 (98.25%)			

T	3 (2.83%)	5 (1.74%)			
rs4986790/TLR4					
AA	46 (85.15%)	138 (95.17%)		1	
AG	8 (14.81%)	6 (4.13%)	0.0402	4.08	1.34-12.39
GG	0	1 (0.68%)		0	0
A	100 (92.59%)	282 (99.29%)			
G	8 (7.40%)	8 (2.81%)	0.0456	2.82	1.03-7.71

Tabla 5. Análisis de genotipos por modelo dominante

rs4986790	Casos (EP=55)	Controles (EHB=151)	p	OR	IC, 95%
AA	46 (85.15%)	138 (95.17%)	0.0384	3.42	1.22-9.62
AG+GG	8 (14.81%)	7 (4.83%)			

Análisis de haplotipos en la población de estudio

El análisis de haplotipos (figura 1) indica que, los SNP de *TLR4* (rs4986790 y rs4986791) no se encontraron en desequilibrio de ligamiento en la población estudiada mientras que, aquellos ubicados en *TLR2* (rs3804099, rs3804100, rs5743704 y rs5743708) forman un bloque de 1 kb en donde el desequilibrio de ligamiento más alto se presentó entre los rs3804099 y rs3804100 ($r^2=0.7$), sin embargo, este valor no es suficiente para proceder con el análisis de asociación por haplotipos.

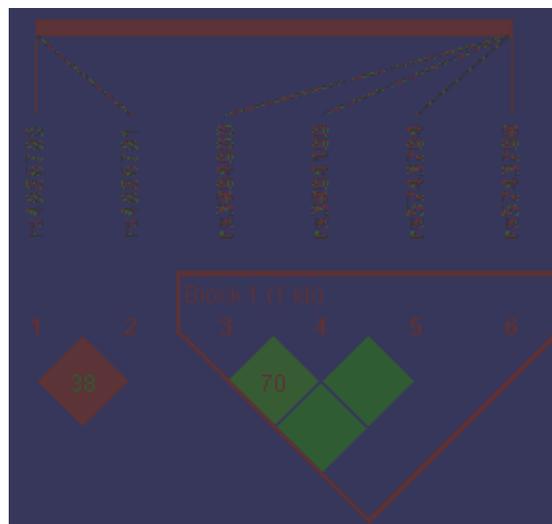


Figura 1. Haplotipos en la población de estudio obtenidos a través de Haploview

Formación de bloque donde el desequilibrio de ligamiento más alto se presenta entre los rs3804099 y rs3804100 ($r^2=0.7$)

❖ Discusión

En la gráfica 1, se presenta el valor del cociente FEV1/FVC posbroncodilatador de la población de estudio, esta variable es de gran importancia, para los estudios de asociación genética, porque es una forma simplificada de que, además del diagnóstico por el médico, se puedan clasificar a los participantes en el grupo de caso o control. De los polimorfismos analizados en la población de estudio, todos ellos cumplieron con equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla 3) por ello, para estas variables, se puede continuar con el análisis de asociación genética en la EPOC secundaria a biomasa.

De los 6 SNP analizados, el rs5743708 (*TLR2*) se encontró el genotipo GG en el 100% de la población de estudio en ambos grupos, al comparar esta frecuencia con poblaciones de América, del proyecto de mil genomas, la frecuencia del alelo menor (MAF) para esta variante es de 1%, sin embargo, este polimorfismo había sido de interés para nosotros porque, es una variante sin sentido, en donde el cambio de G por A, a nivel de proteína, origina un cambio de arginina por glutamina. Adicionalmente, existen reportes de que, la presencia del alelo A en una o dos copias (AA o AG) son factores de riesgo significativos (incremento de riesgo 6.04 y 1.60 veces respectivamente) para el desarrollo de tuberculosis, nueve años más tarde, mediante metaanálisis, este hallazgo se mantuvo (Ogus, et al., 2004 y Guo, et al., 2015). El rs3804099, en nuestro estudio, no se encontró asociado; se trata de un cambio sinónimo ubicado en el tercer exón del gen *TLR2*, este polimorfismo afecta el mecanismo de corte y empalme alternativo y ocasiona cambio en la expresión de la proteína, su conformación tridimensional o bien en su función (Semlali et al., 2018). Existen reportes que indican que, la presencia del alelo C se asocia con riesgo para desarrollo de sepsis porque en los sujetos portadores de dicho alelo existe un incremento de IL-10, IL-8 y TNF en comparación con aquellos individuos portadores del alelo T, sin embargo, aún no se tiene claro el mecanismo de regulación de este polimorfismo y los niveles de las citocinas inflamatorias halladas en el estudio que se encontraron afectadas (Mirkamandar et al., 2018). El rs3804099 y el rs3804100 en población asiática presentan alto desequilibrio de ligamiento, sin embargo, en nuestra población, esto no se presenta (Xue et al., 2017). El rs3804100 previamente se ha asociado con riesgo de cáncer (Zeng et al., 2011) e infección de tuberculosis (Wu, et al., 2015), sin embargo, en nuestro estudio no hubo asociación significativa. El rs5743704 (C>A), ubicado en el exón 3, codifica para un cambio de prolina por histidina, actualmente no se encuentra asociado a enfermedades, sin embargo, por tratarse de un cambio que origina una alteración a nivel de secuencia de aminoácidos, decidimos incluirla en el estudio, nuestros resultados no mostraron asociación significativa.

Para los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 ubicados en *TLR4*, han sido estudiados previamente en cáncer pulmonar, en este caso, el rs4986791 se encontró asociado con la enfermedad (Kurt et al., 2016). Nuestros datos muestran que, el rs4986790, se encuentra asociado ($p=0.0402$) cuando está presente el genotipo heterocigoto (AG) a riesgo (OR=4.08, IC 95%: 1.34-12.39) de presentar EPOC secundaria a la exposición a quema de biomasa. El análisis por modelo dominante en nuestra población mantiene esta asociación de riesgo.

Los polimorfismos evaluados en nuestra población no presentan alto desequilibrio de ligamiento.

❖ **Conclusión**

El SNP rs4986790 (genotipo AG) se encuentra asociado a riesgo de padecer EPOC secundaria a la exposición al humo proveniente de la quema de biomasa.

❖ **Recomendaciones**

Nuestro estudio presenta limitantes, entre las principales se encuentra el tamaño de muestra, por lo tanto, se recomienda ampliar el número de participantes incluidos en el estudio, sin embargo, entre las fortalezas tenemos los datos de frecuencias alélicas y genotípicas de SNP en genes de *TLR2* y *TLR4* que en población mestiza mexicana previamente no se conocían.

❖ **Bibliografía**

Apostolou A, Kerenidi T, Michopoulos A, Gourgoulianis KI, Noutsias M, Germeis AE, Speletas M. Association between TLR2/TLR4 gene polymorphisms and COPD phenotype in a Greek cohort. *Herz*. 2017;42(8):752-757.

Budulac SE, Boezen HM, Hiemstra PS, Lapperre TS, Vonk JM, Timens W, Postma DS; GLUCOLD study group. Toll-like receptor (TLR2 and TLR4) polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e43124.

Epidat 3.1. Análisis epidemiológico de datos tabulados (EPIDAT). Dirección Xeral de Saúde Pública de la Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia). Área de Análisis de Salud y Sistemas de Información de Salud de la Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS).

Epi Info version.7.0.Epi Info™.Division of Health Informatics & Surveillance (DHIS), Center for Surveillance, Epidemiology & Laboratory Services (CSELS).Visto en https://www.cdc.gov/epiinfo/esp/es_index.html

Fonceca AM, Zosky GR, Bozanich EM, Sutanto EN, Kicic A, McNamara PS, Knight DA, Sly PD, Turner DJ, Stick SM. Accumulation mode particles and LPS exposure induce TLR-4 dependent and independent inflammatory responses in the lung. *Respir Res*. 2018;19(1):15

Gao Y, Xiao H, Wang Y, Xu F. Association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 2 gene with asthma susceptibility: A meta-analysis. *Medicina (Baltimore)*. 2017; 96 (20).

GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive. *Glob Obstr Lung Dis*. 2015;<http://www.goldcopd.org>. doi:10.1097/00008483-200207000-00004

Guo XG, Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the TLR2 gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8 (9): 11921-11928.

Haploview. Broad Institute of MIT and Harvard Copyright. (c) 2003-2006. Visto en: <https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>

He F, Liao B, Pu J, Li C, Zheng M, Huang L, Zhou Y, Zhao D, Li B, Ran P. Exposure to Ambient Particulate Matter Induced COPD in a Rat Model and a Description of the Underlying Mechanism. *Sci Rep*. 2017;7:45666.

Hu G, Zhou Y, Hong W, Tian J, Hu J, Peng G, Cui J, Li B, Ran P. Development and systematic oxidative stress of a rat model of chronic bronchitis and emphysema induced by biomass smoke. *Exp Lung Res*. 2013;39(6):229-40.

International Finance Corporation. *Converting Biomass to Energy With Downdraft Gasification.*; 2017. https://www.ifc.org/wps/wcm/connect/7a1813bc-b6e8-4139-a7fc-cee8c5c61f64/BioMass_report_06+2017.pdf?MOD=AJPERES

Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol*. 2011; 72 (11): 1095-1116

Kurt H, Ozbayer C, Bayramoglu A, Gunes HV, Degirmenci, Oner KS, Metintas M. Determination of the Relationship Between rs4986790 and rs4986791 Variants of TLR4 Gene and Lung Cancer. 2016; 39 (1): 166-171.

McCarthy CE, Duffney PF, Gelein R, Thatcher TH, Elder A, Phipps RP, Sime PJ. Dung biomass smoke activates inflammatory signaling pathways in human small airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(6):L1222-L1233.

Mirkamandar E, Nemati M, Hayatbakhsh MM, Bassagh A, Khosravimashizi A, Jafarzadeh A. Association of a single nucleotide polymorphism in the TLR2 gene (rs3804099), but not in the TLR4 gene (rs4986790), with *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer. *Turk J Gastroenterol*. 2018;29(3):283-291.

Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*. 2004;23(2):219-23.

OMS/OPS. *Combustibles Para Una Vida Mejor.*; 2007. http://www.who.int/airpollution/publications/fuelforallife_es.pdf?ua=1.

Perez-Padilla R, Fernandez R, Lopez Varela MV, Montes de Oca M, Muiño A, Tálamo C, Brito Jardim JR, Valdivia G, Baptista Menezes AM. Airflow obstruction in never smokers in five Latin American cities: the PLATINO study. *Arch Med Res*.

2012;43(2):159-65.

Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, Regalado J, Velázquez A, Sánchez C, Mayar ME. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(4):393-7.

Semlali A, Parine NR, Al-Numair NS, Almutairi M, Hawsawi YM, Amri AA, Aljebreen AM, Arafah M, Almadi MA, Azzam NA, Alharbi O, Alanazi MS. Potential role of Toll-like receptor 2 expression and polymorphisms in colon cancer susceptibility in the Saudi Arabian population. *Onco Targets Ther*. 2018;11:8127-8141.

Wang X, Li J, Xie W, Zhang W, Chang Y. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms and cancer susceptibility: a meta-analysis. 2013;60 (4) :459-467.

Wu L, Hu Y, Li D, Jiang W, Xu B. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Med Genet*. 2015;16:19.

Xue X, Qiu Y, Jiang D, Jin T, Yan M, Zhu X, Chu Y. The association analysis of TLR2 and TLR4 gene with tuberculosis in the Tibetan Chinese population. *Oncotarget*. 2017;8(68):113082-113089

Zeng HM, Pan KF, Zhang Y, et al. The correlation between polymorphisms of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 9 and susceptibility to gastric cancer. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi*. 2011;45(7):588–592.

Zhao Y, Bu H, Hong K, Yin H, Zou YL, Geng SJ, Zheng MM, He JY. Genetic polymorphisms of CCL1 rs2072069 G/A and TLR2 rs3804099 T/C in pulmonary or meningeal tuberculosis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8 (10): 12608–12620.

Zhou Y, Wang C, Yao W, Chen P, Kang J, Huang S, Chen B, Wang C, Ni D, Wang X, Wang D, Liu S, Lu J, Zheng J, Zhong N, Ran P. COPD in Chinese nonsmokers. *Eur Respir J*. 2009;33(3):509-18.