



Original

Relación entre la expresión de IL-2 e IL-4 y sus polimorfismos y los riesgos de padecer infección por *Mycoplasma pneumoniae* y asma en niños



Rong-Shan Wang^a, Hong-Xing Jin^a, Shi-Qiang Shang^{b,*}, Xi-Yong Liu^a, Shu-Jun Chen^a y Zhi-Biao Jin^a

^a Department of Pediatrics, Yiwu Maternity and Child Care Hospital, Zhejiang, China

^b Department of Pediatrics, Laboratory of the Children's Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang, China

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 28 de mayo de 2014

Aceptado el 1 de noviembre de 2014

On-line el 5 de marzo de 2015

Palabras clave:

Asma

Niños

Interleucina-2

Interleucina-4

Mycoplasma pneumoniae

R E S U M E N

Introducción: El asma es una afección inflamatoria de las vías respiratorias. Las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* pueden exacerbar los síntomas del asma. Se ha demostrado que la interleucina 2 y la interleucina 4 participan en las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Hemos estudiado la relación entre los polimorfismos de la *IL2* y la *IL4* y su expresión y el riesgo de padecer asma e infección por *M. pneumoniae* en niños.

Métodos: Se reclutó a 392 niños asmáticos y 849 controles para el estudio. Se genotiparon 8 polimorfismos en *IL2* e *IL4* con la plataforma MassARRAY de Sequenom. La infección por *M. pneumoniae* y el número de copias se establecieron mediante PCR fluorescente. Los niveles séricos de expresión de IL-2 e IL-4 se midieron con ELISA.

Resultados: Hallamos una relación significativa entre el polimorfismo rs6534349 de *IL2* y el aumento de riesgo de sufrir asma (heterocigóticos, $p=0,029$; variantes homocigóticas, $p=0,013$), así como entre el polimorfismo rs2227284 de *IL4* y una reducción del riesgo de padecer asma (heterocigóticos, $p=0,026$; variantes homocigóticas, $p=0,001$). Además, la relación con otros polimorfismos, excepto el rs2070874, se hizo evidente al agrupar a los niños asmáticos según la clasificación GINA de control y gravedad del asma. Asimismo, los niveles séricos de expresión de IL-2 e IL-4 fueron significativamente mayores en los sujetos no infectados ($p=0,038$) e infectados ($p=0,011$) por *M. pneumoniae*, respectivamente. Esta observación también se cumple entre los pacientes asmáticos ($p=0,016$ para IL-2 y $p=0,042$ para IL-4), pero en los controles no asmáticos solo se cumple en el caso de la IL-4 ($p=0,032$). Del mismo modo, observamos que el genotipo GG rs6534349 estaba claramente relacionado con un aumento de las posibilidades de tener una infección con alta carga de *M. pneumoniae* ($p=0,0376$).

Conclusiones: La *IL2* y la *IL4* podrían ser biomarcadores importantes para calcular el riesgo de padecer asma, así como infección por *M. pneumoniae*, en niños.

© 2014 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Associations of IL-2 and IL-4 Expression and Polymorphisms With the Risks of *Mycoplasma pneumoniae* Infection and Asthma in Children

A B S T R A C T

Introduction: Asthma is an inflammatory disorder of the airways and the symptoms of asthma could be exacerbated by *Mycoplasma pneumoniae* infection. Interleukin-2 and interleukin-4 have been implicated in immune and inflammatory reactions. We examined the associations of *IL2* and *IL4* polymorphisms and expression with the risks of asthma and *M. pneumoniae* infection in children.

Methods: 392 asthmatic children and 849 controls were recruited into the study. Eight polymorphisms in *IL2* and *IL4* were genotyped with Sequenom MassARRAY platform. *M. pneumoniae* infection and copy number was determined with fluorescence PCR. IL-2 and IL-4 serum expression levels were determined by using ELISA.

Keywords:

Asthma

Children

Interleukin-2

Interleukin-4

Mycoplasma pneumoniae

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: shiqiangshang945@gmail.com (S.-Q. Shang).

Results: We found a significant association of *IL2* rs6534349 polymorphism with increased asthma risk (heterozygotes, $P=.029$; homozygous variants; $P=.013$) and of *IL4* rs2227284 polymorphism with reduced asthma risk (heterozygotes, $P=.026$; homozygous variants; $P=.001$). Besides, the association of other polymorphisms, except rs2070874 polymorphism, became apparent when the asthmatic children were grouped according to GINA classification of asthma control and severity. In addition, IL-2 and IL-4 serum expression levels were significantly higher in *M. pneumoniae* negative ($P=.038$) and positive ($P=.011$) subjects respectively. This observation holds true among asthmatic patients ($P=.016$ for IL-2 and $P=.042$ for IL-4), but only the IL-4 observation remained correct among non-asthmatic controls ($P=.032$). We also observed that the rs6534349 GG genotype was significantly associated with increased odds of getting high load *M. pneumoniae* infection ($P=.0376$).

Conclusions: *IL2* and *IL4* could be important biomarkers for estimating the risks of asthma and *M. pneumoniae* infection in children.

© 2014 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El asma es una afección inflamatoria crónica compleja de las vías respiratorias caracterizada por obstrucción respiratoria e hiperreactividad. En los niños, el asma suele aparecer por inflamaciones alérgicas y puede causar distintos grados de obstrucción respiratoria, como disnea, tos, tensión torácica y episodios recurrentes de sibilancia, entre otros. En China, al igual que en el resto del mundo, el asma infantil es una preocupación importante de salud pública dentro de la neumología pediátrica. La prevalencia del asma infantil ha aumentado anualmente^{1,2}.

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno importante, conocido principalmente como agente causante de la neumonía extrahospitalaria, en especial entre los niños³. La sospecha de la relación entre la infección por *M. pneumoniae* y el asma existe desde hace décadas⁴. Más recientemente han surgido varias líneas de evidencia que implican a la infección por *M. pneumoniae* en la aparición y la exacerbación del asma^{5,6}. La infección por *M. pneumoniae* causa lesiones en las células epiteliales respiratorias, lo que aumenta la reactividad de las vías respiratorias y activa un gran número de linfocitos T⁷. Los linfocitos T fomentan la activación de los linfocitos B que producen anticuerpos y liberan citoquinas inflamatorias, lo que, a su vez, contribuye a la aparición de síntomas asmáticos.

A pesar de la complejidad de los mecanismos subyacentes a la manifestación del asma, se sabe que las interleucinas (IL), en especial IL-2 e IL-4, desempeñan un papel central en este proceso⁸. La IL-2 favorece la maduración de los linfocitos T primitivos, mientras que la IL-4, mediante su compleja interacción con la IL-12, ayuda a tomar la importante decisión de si los linfocitos T deben diferenciarse en Th1 o Th2 que producen distintos tipos de citoquinas⁹. Estos eventos causan cambios fisiopatológicos importantes durante el asma y, por lo tanto, son un paso clave en su evolución. Además, el papel destacado de la IL-2 y la IL-4 en el sistema inmunitario adaptativo sugiere que las citoquinas podrían influir en la eficiencia de las células inmunitarias a la hora de rechazar las infecciones por *M. pneumoniae*. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la variación del nivel de IL-2 e IL-4 y su actividad podría relacionarse con el riesgo de padecer asma e infección por *M. pneumoniae*^{10,11}. Un factor potencial que podría influir en la variación interindividual del nivel y actividad de IL-2 e IL-4, y por lo tanto en el riesgo de padecer asma, son los polimorfismos de nucleótido simple (SNP por sus siglas en inglés) dentro de los genes que codifican las citoquinas^{12,13}. En este estudio intentamos establecer la relación entre los SNP en los genes de *IL2* e *IL4* y el riesgo de padecer asma en niños. En concreto, nos planteamos estudiar los polimorfismos rs6822844, rs6534349, rs2069762 y rs3136534 de *IL2* y rs2243250, rs2070874, rs2227284 y rs2243290 de *IL4*. También deseamos investigar la presencia de niveles séricos diferenciales de expresión de IL-2 e IL-4 en pacientes infectados y no infectados

por *M. pneumoniae* y estudiar la relación entre los mismos SNP y el riesgo de infecciones con alta carga de *M. pneumoniae*.

Métodos

Sujetos

El estudio contó con la aprobación del Comité Ético del Hospital Materno-infantil Yiwu en Zhejiang (Ref. 2009/PED/0215.045). Se seleccionaron a un total de 392 niños con asma y 849 controles no asmáticos con edades comprendidas entre los 4 y los 15 años del Hospital Materno-infantil Yiwu y el Hospital Pediátrico de la provincia de Zhejiang entre marzo de 2009 y octubre de 2013. Se identificó a los niños con asma mediante diagnóstico rutinario basado en las directrices de Iniciativa Global contra el Asma (GINA). Los controles fueron niños sin asma ni síntomas de alergia que habían acudido a estos mismos hospitales por otras cuestiones médicas no relativas al asma. En total, entre los controles, 83 presentaban estridor; 89, aspiración de cuerpo extraño; 80, tos persistente; 66 fueron diagnosticados con infección pulmonar, y 531 eran niños sanos que acudieron al hospital para un seguimiento tras ser diagnosticados con una infección respiratoria transitoria. Se ajustaron los controles y casos por frecuencia en cuanto a género y edad. Todos los sujetos eran chinos de etnia han. Los padres firmaron el consentimiento informado antes de la inclusión de los sujetos en el estudio.

Detección de infección por *Mycoplasma pneumoniae*

Se extrajo ADN de las muestras respiratorias (extensión faríngea, $n=528$; lavado broncoalveolar, $n=432$; muestras de esputo, $n=204$; aspiración bronquial, $n=77$) de los sujetos. Se realizó lavado broncoalveolar en 318 controles (es decir, los que presentaban estridor, aspiración de cuerpos extraños, tos persistente o con diagnóstico de infección pulmonar) como parte de su tratamiento terapéutico/diagnóstico, así como en 114 niños asmáticos para identificar los agentes infecciosos y los perfiles celulares y de citoquinas (por motivos diagnósticos o como parte de otra investigación en curso). Se realizó un único lavado broncoalveolar por paciente. Para detectar la infección por *M. pneumoniae* en los sujetos se utilizó el Fluorescence PCR Mycoplasma pneumoniae Detection Kit (Acon Biotech, Hangzhou, China), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de IL-2 e IL-4 por ELISA

Se aisló el suero de las muestras de sangre recogidas y se diluyó 1:4 en el diluyente de la muestra antes de emplearlo para cuantificar los niveles de IL-2 e IL-4 por ELISA. Las concentraciones séricas

de IL-2 e IL-4 se establecieron con los kits ELISA Human Interleukin 2/IL-2 y ELISA Human Interleukin 4/IL-4 (Xinqidi Biological Technology Co. Ltd., Wuhan, China) con una sensibilidad de <0,40 pg/ml y <0,20 pg/ml, respectivamente, siguiendo los protocolos del fabricante.

Genotipado de los polimorfismos de nucleótido simple

Se aisló el ADN de las muestras de sangre de los sujetos con el kit genético TIANamp (Tiangen Biotech, Beijing, China). Se genotiparon los polimorfismos en el ADN aislado usando la plataforma MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se repitió el genotipado en el 10% de las muestras por motivos de confirmación. La tasa de reproducibilidad de los genotipos fue del 100%.

Análisis estadístico

La distribución de los genotipos en los niños asmáticos y los controles no asmáticos se comparó mediante la prueba de χ^2 , y la asociación entre los polimorfismos y el riesgo de padecer asma se evaluó mediante análisis de regresión logística. Para estudiar la relación entre los polimorfismos y el riesgo de predisposición a infecciones con alta carga de *M. pneumoniae*, se comparó la distribución genotípica mediante la prueba de χ^2 seguida de análisis de regresión logística. Las expresiones de IL-2 e IL-4 en pacientes infectados por *M. pneumoniae* y no infectados por *M. pneumoniae* se compararon mediante la prueba t para determinar si existe diferencia significativa en la expresión entre ambos grupos. En todos los análisis se consideró que los resultados eran significativos cuando $p < 0,05$.

Resultados

Características de los sujetos e infección por *Mycoplasma pneumoniae*

Se ajustaron los controles y casos por frecuencia en cuanto a género y edad. No hubo diferencias significativas entre casos y controles en cuanto a género ($p = 0,99$) y edad promedio ($p = 0,98$). Conforme a la clasificación GINA, 177 casos correspondían a asma controlada; 118, a asma parcialmente controlada, y 97, a asma no controlada. Además, 102 se clasificaron como grave; 80, como moderada, y 210, como leve.

Detección de infección por *Mycoplasma pneumoniae*

Un total de 344 dieron positivo para infección por *M. pneumoniae*, de los que 130 eran niños asmáticos y 214, controles no asmáticos. Por otro lado, de los 897 sujetos restantes no infectados por *M. pneumoniae*, 262 eran niños asmáticos y 635, controles no asmáticos. En la [tabla 1](#) se muestra la prevalencia de *M. pneumoniae* detectada en los distintos tipos de muestras. La muestra empleada no afectaba de forma significativa a la detección de *M. pneumoniae* ($p = 0,70$).

Tabla 1

Detección de la infección por *Mycoplasma pneumoniae* empleando distintas muestras

Muestra	Infectada por <i>M. pneumoniae</i>	No infectada por <i>M. pneumoniae</i>	p
Extensión faríngea (n = 528)	154 (29,17%)	374 (70,83%)	0,70
Lavado broncoalveolar (n = 432)	113 (26,16%)	319 (73,84%)	
Muestras de esputo (n = 204)	54 (26,47%)	150 (73,53%)	
Broncoaspirado (n = 77)	23 (29,87%)	54 (70,13%)	
Total	344 (27,72%)	897 (72,28%)	

El número de copias bacterianas en los sujetos infectados por *M. pneumoniae* osciló entre $6,43 \times 10^3$ y $6,48 \times 10^7$ organismos ml^{-1} , con una mediana y un promedio de $3,96 \times 10^5$ y $1,67 \times 10^7$ organismos ml^{-1} , respectivamente; 206 y 138 sujetos tenían una carga bacteriana inferior o superior a la media, respectivamente.

Distribución genotípica en niños asmáticos y controles sanos

Entre los 8 polimorfismos estudiados, solo se observó una diferencia significativa entre casos y controles en 2 polimorfismos: el polimorfismo rs6534349 de *IL2* ($p = 0,006$) y el polimorfismo rs2227284 de *IL4* ($p = 0,001$) ([tabla 2](#)). No se encontró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los 8 polimorfismos ($p > 0,05$).

Relación entre los polimorfismos y el riesgo de padecer asma

Se observó una asociación de riesgo significativa solo para los polimorfismos rs6534349 de *IL2* y rs2227284 de *IL4* ([tabla 2](#)). Para el polimorfismo rs6534349 de *IL2*, en el genotipo heterocigótico AG y la variante homocigótica GG, el riesgo se multiplicó por 1,374 (IC 95% = 1,033-1,828, $p = 0,029$) y 2,54 (IC 95% = 1,216-5,361, $p = 0,013$), respectivamente. Por otro lado, el genotipo heterocigótico TG del polimorfismo rs2227284 de *IL4* presentó una odds ratio de 0,750 (IC 95% = 0,583-0,965, $p = 0,026$), mientras que el genotipo homocigótico GG tuvo una odds ratio de 0,433 (IC 95% = 0,262-0,716, $p = 0,001$).

Asociación de riesgo asmático según la clasificación GINA de control del asma

La distribución genotípica y la asociación de riesgo de los polimorfismos según la clasificación GINA de control del asma se muestran en la [tabla 3](#). En el asma controlada solo halló relación entre el riesgo de padecer la enfermedad y el polimorfismo rs2069762 de *IL2* ($p = 0,047$). No se vio que ninguno de los polimorfismos del gen de *IL4* aumentara el riesgo ni protegiera a los portadores frente al asma. Por otro lado, en el grupo con asma parcialmente controlada se halló asociación entre el riesgo de sufrir asma y 3 polimorfismos de *IL2* (rs6822822, rs2069762, rs6534349) y un polimorfismo de *IL4* (rs2227284) ($p = 0,040$, $0,001$, $0,020$ y $0,032$, respectivamente). En el grupo de asma no controlada, 5 polimorfismos mostraron una asociación significativa con el riesgo de padecer asma: rs6534349 ($p = 0,001$), rs2069762 ($p = 0,038$) y rs3136543 ($p = 0,038$) de *IL2*, así como rs2243250 ($p = 0,031$) y rs2227284 ($p = 0,004$) de *IL4*.

Asociación de riesgo asmático según la clasificación GINA de gravedad del asma

La distribución de los genotipos de los polimorfismos en pacientes con distintos niveles de gravedad del asma se muestra en la [tabla 4](#), junto con la asociación de riesgo correspondiente. En los sujetos con asma grave se observaron asociaciones significativas con el rs2243290 ($p = 0,002$). En el caso del asma moderada,

Tabla 2
Distribución genotípica y asociación de riesgo en niños asmáticos y controles sanos

SNP	Genotipo	Casos (n)	%	Controles (n)	%	p	Odds ratio	p
rs6822844	GG	277	70,66	562	66,20	0,595	Referencia	–
	GT	104	26,53	249	29,33		0,847 (0,647-1,110)	0,230
	TT	11	2,81	38	4,48		0,587 (0,296-1,167)	0,129
rs6534349	AA	279	71,17	665	78,33	0,006	Referencia	–
	AG	98	25,00	170	20,02		1,374 (1,033-1,828)	0,029
	GG	15	3,83	14	1,65		2,554 (1,216-5,361)	0,013
rs2069762	GG	41	10,46	78	9,19	0,545	Referencia	–
	GT	153	39,03	357	42,05		0,815 (0,534-1,245)	0,344
	TT	198	50,51	414	48,76		0,910 (0,601-1,377)	0,655
rs3136534	AA	176	44,90	346	40,75	0,223	Referencia	–
	AC	180	45,92	402	47,35		0,880 (0,684-1,133)	0,322
	CC	36	9,18	101	11,90		0,701 (0,460-1,068)	0,098
rs2243250	TT	165	42,09	333	39,22	0,536	Referencia	–
	TC	177	45,15	412	48,53		0,867 (0,671-1,121)	0,276
	CC	50	12,76	104	12,25		0,970 (0,660-1,427)	0,878
rs2070874	TT	167	42,60	337	39,69	0,531	Referencia	–
	TC	176	44,90	410	48,29		0,866 (0,671-1,119)	0,272
	CC	49	12,50	102	12,02		0,969 (0,658-1,429)	0,875
rs2227284	TT	225	57,40	408	48,06	0,001	Referencia	–
	TG	146	37,24	353	41,58		0,750 (0,583-0,965)	0,026
	GG	21	5,36	88	10,37		0,433 (0,262-0,716)	0,001
rs2243290	AA	174	44,39	331	38,99	0,190	Referencia	–
	AC	173	44,13	416	49,00		0,791 (0,613-1,021)	0,072
	CC	45	11,48	102	12,01		0,839 (0,565-1,247)	0,386

solo el rs6534349 fue significativo ($p=0,007$). Además, en el asma leve la asociación de riesgo estaba presente en los polimorfismos rs2069762 y rs2227284 ($p=0,007$ y $p=0,008$, respectivamente).

Expresión de IL-2 e IL-4 en sujetos infectados y no infectados por *Mycoplasma pneumoniae*

La tabla 5 muestra los niveles séricos de expresión (en cuanto a concentración) de IL-2 e IL-4 en sujetos no infectados e infectados por *M. pneumoniae*. La concentración promedio de IL-2 en sujetos no infectados por *M. pneumoniae* fue significativamente mayor que en los sujetos infectados por *M. pneumoniae* ($p=0,038$). En el caso de la IL-4 se observó lo contrario ($p=0,011$).

Cuando se clasificaron los sujetos en función de la presencia de asma, se halló una tendencia similar en los pacientes asmáticos ($p=0,016$ para IL-2; $p=0,042$ para IL-4). Sin embargo, en los controles no asmáticos, los niveles de IL-2 entre los sujetos infectados y no infectados por *M. pneumoniae* no difirieron significativamente ($p=0,492$). No obstante, al igual que los sujetos asmáticos, se detectó un promedio de concentración de IL-4 significativamente menor entre los pacientes no infectados por *M. pneumoniae* en comparación con los infectados por *M. pneumoniae* ($p=0,032$).

Distribución genotípica en pacientes infectados por *Mycoplasma pneumoniae* con infecciones de carga baja y alta

La tabla 6 resume la distribución genotípica de los 8 polimorfismos en los sujetos infectados por *M. pneumoniae* con cargas bacterianas bajas y altas. No se observó una diferencia significativa entre los 2 grupos de sujetos del estudio en cuanto a distribución genotípica de los 8 polimorfismos ($p>0,05$). Ninguna de las distribuciones genotípicas se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$).

Relación de los polimorfismos con el riesgo de predisposición a infecciones con alta carga de *Mycoplasma pneumoniae*

La relación entre los 8 polimorfismos y el riesgo de predisposición a infecciones con alta carga de *M. pneumoniae* también se muestra en la tabla 6. Solo se observó una relación significativa en el polimorfismo rs2227284 de IL4 ($p=0,0376$). No se halló ninguna

relación estadísticamente significativa en el resto de polimorfismos ($p>0,05$).

Discusión

El asma es una enfermedad de las vías respiratorias que se debe principalmente a la inflamación crónica del sistema respiratorio. Se considera que la infección por *M. pneumoniae* fomenta la exacerbación de los síntomas asmáticos^{5,6}. Las citoquinas son mediadores clave en las reacciones inmunitarias e inflamatorias, por lo que podrían desempeñar un papel importante en la aparición del asma y la erradicación de la infección por *M. pneumoniae*. La IL-2 y la IL-4 son 2 citoquinas importantes que se han vinculado al desarrollo de asma. Partimos de la hipótesis de que los polimorfismos en los genes de IL2 e IL4 podrían estar relacionados con el riesgo de padecer asma e infección por *M. pneumoniae* en niños.

Hemos investigado la relación entre 4 polimorfismos de IL2 y 4 polimorfismos de IL4 y el riesgo de padecer asma en niños. Nuestros resultados demostraron que el polimorfismo rs6534349 de IL2 y el polimorfismo rs2227284 de IL4 podían aumentar y reducir, respectivamente, el riesgo de padecer asma de forma significativa. Esta relación dependía de la dosis. En otras palabras, el riesgo y los efectos protectores de los polimorfismos fueron mayores cuando los alelos variantes estaban presentes en 2 copias (variante homocigótica) que cuando estaban solo en una copia (heterocigótica). Además, también hemos analizado la relación entre los polimorfismos con distintos niveles de control y gravedad del asma, conforme a la clasificación GINA. Hemos descubierto que entre los pacientes del grupo «controlada», solo un polimorfismo (rs2069762) se asociaba al riesgo de padecer asma, mientras que en el grupo «parcialmente controlada» fueron 4 polimorfismos (rs6822844, rs6534349, rs2069762 y rs2227284) y en el grupo «no controlada» fueron 5 polimorfismos (rs6534349, rs2069762, rs3136534, rs2243250 y rs2227284). El aumento del número de polimorfismos asociados al riesgo de padecer asma y el incremento de la pérdida de control sugieren la implicación de una amplia red de interacciones genéticas, lo que resalta la complejidad de la afección.

De todos modos, el número de polimorfismos significativamente relacionados con el riesgo de padecer asma fue similar en pacientes de distintos niveles de gravedad. Los pacientes con

Tabla 3
Distribución genotípica y asociación de riesgo en niños asmáticos y controles sanos, según la clasificación GINA de control del asma

Clasificación GINA de control	SNP	Genotipo	Casos (n)	Controles (n)	Odds ratio	p	
Controlada	rs6822844	GG	64	562	Referencia	–	
		GT	30	249	1,058 (0,668-1,673)	0,809	
		TT	3	38	0,693 (0,208-2,309)	0,550	
	rs6534349	AA	73	665	Referencia	–	
		AG	20	170	1,071 (0,635-1,807)	0,795	
		GG	4	14	2,602 (0,834-8,115)	0,099	
	rs2069762	GG	4	78	Referencia	–	
		GT	32	357	1,747 (0,600-5,085)	0,305	
		TT	61	414	2,873 (1,101-8,130)	0,047	
	rs3136534	AA	42	346	Referencia	–	
		AC	46	402	0,945 (0,607-1,470)	0,802	
		CC	9	101	0,734 (0,345-1,559)	0,421	
	rs2243250	TT	40	333	Referencia	–	
		TC	42	412	0,848 (0,537-1,339)	0,481	
		CC	15	104	1,200 (0,637-2,261)	0,571	
	rs2070874	TT	47	337	Referencia	–	
		TC	43	410	0,752 (0,485-1,165)	0,202	
		CC	7	102	0,492 (0,215-1,122)	0,091	
	rs2227284	TT	57	408	Referencia	–	
		TG	33	353	0,669 (0,425-1,051)	0,081	
		GG	7	88	0,569 (0,251-1,290)	0,177	
	rs2243290	AA	44	331	Referencia	–	
		AC	41	416	0,741 (0,473-1,161)	0,191	
		CC	12	102	0,885 (0,450-1,739)	0,723	
	Parcialmente controlada	rs6822844	GG	89	562	Referencia	–
			GT	24	249	0,608 (0,378-0,978)	0,040
			TT	5	38	0,830 (0,318-2,167)	0,704
		rs6534349	AA	89	665	Referencia	–
			AG	23	170	1,010 (0,620-1,647)	0,965
			GG	6	14	3,202 (1,199-8,546)	0,020
rs2069762		GG	17	78	Referencia	–	
		GT	27	357	0,347 (0,180-0,667)	0,001	
		TT	74	414	0,820 (0,459-1,464)	0,502	
rs3136534		AA	48	346	Referencia	–	
		AC	56	402	1,004 (0,665-1,515)	0,984	
		CC	14	101	0,999 (0,529-1,886)	0,998	
rs2243250		TT	40	333	Referencia	–	
		TC	63	412	1,273 (0,835-1,940)	0,262	
		CC	15	104	1,200 (0,637-2,261)	0,571	
rs2070874		TT	53	337	Referencia	–	
		TC	47	410	0,728 (0,479-1,107)	0,138	
		CC	18	102	1,122 (0,629-2,001)	0,696	
rs2227284		TT	71	408	Referencia	–	
		TG	39	353	0,634 (0,418-0,962)	0,032	
		GG	8	88	0,522 (0,242-1,124)	0,096	
rs2243290		AA	47	331	Referencia	–	
		AC	54	416	0,914 (0,602-1,386)	0,673	
		CC	17	102	1,173 (0,645-2,133)	0,599	
No controlada		rs6822844	GG	124	562	Referencia	–
			GT	50	249	0,910 (0,634-1,305)	0,608
			TT	3	38	0,357 (0,108-1,177)	0,090
		rs6534349	AA	117	665	Referencia	–
			AG	55	170	1,838 (1,280-2,641)	0,001
			GG	5	14	2,029 (0,717-5,742)	0,182
	rs2069762	GG	20	78	Referencia	–	
		GT	50	357	0,546 (0,307-0,969)	0,038	
		TT	107	414	1,008 (0,590-1,721)	0,976	
	rs3136534	AA	86	346	Referencia	–	
		AC	78	402	0,780 (0,556-1,095)	0,151	
		CC	13	101	0,517 (0,277-0,966)	0,038	
	rs2243250	TT	85	333	Referencia	–	
		TC	72	412	0,684 (0,484-0,967)	0,031	
		CC	20	104	0,753 (0,441-1,285)	0,299	
	rs2070874	TT	67	337	Referencia	–	
		TC	86	410	1,055 (0,743-1,497)	0,764	
		CC	24	102	1,183 (0,706-1,983)	0,522	
	rs2227284	TT	97	408	Referencia	–	
		TG	74	353	0,881 (0,631-1,231)	0,460	
		GG	6	88	0,286 (0,121-0,675)	0,004	
	rs2243290	AA	83	331	Referencia	–	
		AC	78	416	0,747 (0,531-1,051)	0,094	
		CC	16	102	0,625 (0,350-1,116)	0,112	

Tabla 4
Distribución genotípica y asociación de riesgo en niños asmáticos y controles sanos, según la clasificación GINA de gravedad del asma

Clasificación GINA de gravedad	SNP	Genotipo	Casos (n)	Controles (n)	Odds ratio	p	
Grave	rs6822844	GG	73	562	Referencia	–	
		GT	28	249	0,865 (0,546-1,372)	0,539	
		TT	1	38	0,202 (0,027-1,497)	0,117	
	rs6534349	AA	73	665	Referencia	–	
		AG	26	170	1,393 (0,863-2,247)	0,174	
		GG	3	14	1,952 (0,548-6,952)	0,302	
	rs2069762	GG	10	78	Referencia	–	
		GT	24	357	0,524 (0,241-1,140)	0,103	
		TT	68	414	1,281 (0,632-2,596)	0,491	
	rs3136534	AA	46	346	Referencia	–	
		AC	46	402	0,860 (0,558-1,327)	0,497	
		CC	10	101	0,744 (0,362-1,528)	0,421	
	rs2243250	TT	44	333	Referencia	–	
		TC	45	412	0,826 (0,532-1,283)	0,396	
		CC	13	104	0,946 (0,490-1,824)	0,868	
	rs2070874	TT	44	337	Referencia	–	
		TC	47	410	0,878 (0,567-1,357)	0,558	
		CC	11	102	0,826 (0,411-1,658)	0,590	
	rs2227284	TT	60	408	Referencia	–	
		TG	36	353	0,693 (0,447-1,073)	0,100	
		GG	6	88	0,463 (0,194-1,107)	0,083	
	rs2243290	AA	54	331	Referencia	–	
		AC	34	416	0,501 (0,318-0,787)	0,002	
		CC	14	102	0,841 (0,448-1,577)	0,589	
	Moderada	rs6822844	GG	53	562	Referencia	–
			GT	24	249	1,022 (0,616-1,693)	0,932
			TT	3	38	0,837 (0,250-2,803)	0,773
		rs6534349	AA	56	665	Referencia	–
			AG	19	170	1,327 (0,768-2,293)	0,310
			GG	5	14	4,241 (1,473-12,208)	0,007
		rs2069762	GG	4	78	Referencia	–
			GT	24	357	1,310 (0,442-3,885)	0,625
			TT	52	414	2,449 (0,861-6,966)	0,093
rs3136534		AA	29	346	Referencia	–	
		AC	42	402	1,246 (0,760-2,044)	0,382	
		CC	9	101	1,063 (0,487-2,319)	0,877	
rs2243250		TT	33	333	Referencia	–	
		TC	36	412	0,881 (0,538-1,445)	0,617	
		CC	11	104	1,067 (0,521-2,186)	0,858	
rs2070874		TT	35	337	Referencia	–	
		TC	34	410	0,798 (0,487-1,307)	0,371	
		CC	11	102	1,038 (0,509-2,117)	0,917	
rs2227284		TT	42	408	Referencia	–	
		TG	34	353	0,935 (0,582-1,503)	0,783	
		GG	4	88	0,441 (0,154-1,263)	0,127	
rs2243290		AA	38	331	Referencia	–	
		AC	35	416	0,732 (0,452-1,185)	0,205	
		CC	7	102	0,597 (0,259-1,379)	0,227	
Leve		rs6822844	GG	151	562	Referencia	–
			GT	52	249	0,777 (0,548-1,101)	0,156
			TT	7	38	0,685 (0,300-1,565)	0,370
		rs6534349	AA	150	665	Referencia	–
			AG	53	170	1,382 (0,968-1,972)	0,074
			GG	7	14	2,216 (0,879-5,587)	0,091
		rs2069762	GG	27	78	Referencia	–
			GT	61	357	0,493 (0,294-0,826)	0,007
			TT	122	414	0,851 (0,525-1,378)	0,512
	rs3136534	AA	101	346	Referencia	–	
		AC	92	402	0,784 (0,571-1,076)	0,132	
		CC	17	101	0,576 (0,329-1,009)	0,053	
	rs2243250	TT	88	333	Referencia	–	
		TC	96	412	0,881 (0,538-1,445)	0,617	
		CC	26	104	0,946 (0,579-1,543)	0,824	
	rs2070874	TT	88	337	Referencia	–	
		TC	95	410	0,887 (0,641-1,226)	0,469	
		CC	27	102	1,013 (0,624-1,646)	0,956	
	rs2227284	TT	123	408	Referencia	–	
		TG	76	353	0,714 (0,518-0,983)	0,038	
		GG	11	88	0,414 (0,214-0,801)	0,008	
	rs2243290	AA	82	331	Referencia	–	
		AC	104	416	1,009 (0,730-1,394)	0,956	
		CC	24	102	0,949 (0,572-1,575)	0,841	

Tabla 5Nivel sérico de expresión de IL-2 e IL-4 en sujetos infectados y no infectados por *Mycoplasma pneumoniae*

Sujetos	Gen	Expresión	No infectado por <i>M. pneumoniae</i>	Infectado por <i>M. pneumoniae</i>	p
En general	IL2	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	0,85-156,36 80,23 ± 45,98	0,46-144,36 74,55 ± 41,98	0,038
	IL4	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	0,22-15,34 7,72 ± 4,34	0,83-15,89 8,41 ± 4,28	0,011
Asmáticos	IL2	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	1,56-156,36 81,74 ± 45,69	0,52-143,99 74,58 ± 41,48	0,016
	IL4	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	0,46-15,34 7,93 ± 4,29	1,13-15,89 8,61 ± 4,32	0,042
Control	IL2	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	0,85-151,18 77,73 ± 46,51	0,46-144,36 74,46 ± 43,25	0,492
	IL4	Rango (pg/ml) Media ± DE (pg/ml)	0,22-11,42 7,50 ± 4,38	0,83-13,97 8,21 ± 4,23	0,032

asma leve presentaron asociación de riesgo con 2 polimorfismos (rs2069762 y rs2227284), mientras que los pacientes con asma moderada o grave tuvieron asociación con un polimorfismo cada uno (rs6534349 en moderada, rs2243290 en grave). Es interesante resaltar que los pacientes asmáticos con distintos grados de gravedad presentaban polimorfismos totalmente diferentes. Esto sugiere que cada polimorfismo podría ejercer un efecto único y exclusivo que contribuye a la aparición del asma. Sin embargo, cabe mencionar también que cuando se realizó el análisis conforme a los niveles de gravedad del asma, el tamaño muestral fue demasiado bajo como para garantizar una interpretación fiable de los datos¹⁴. Esta cuestión es una de las limitaciones del presente estudio.

Nuestra propuesta es que estos polimorfismos podrían alterar la expresión de los productos proteicos, lo que causaría las modificaciones del riesgo explicadas más arriba¹⁵. En concreto, postulamos que los alelos variantes de los polimorfismos rs6822844, rs2069762 y rs3136534 podrían reducir la expresión de los productos proteicos, mientras que los de los polimorfismos rs6534349, rs2243250, rs2227284 y rs2243290 podrían aumentar la expresión de los mismos. Nuestro postulado se basa en el hecho de que la IL-2 es una citoquina proinflamatoria, por lo que una mayor expresión de IL-2 puede conllevar un mayor nivel de inflamación, lo que facilita el desarrollo de asma, y viceversa¹⁶. Por el contrario, la IL-4 es una proteína antiinflamatoria, de modo que un aumento de la expresión de IL-4 podría conllevar una reducción del nivel de inflamación, lo

que, a su vez, protegería al anfitrión frente al asma, y viceversa. No obstante, se precisan más estudios experimentales para confirmar nuestros postulados. También observamos que no existía relación entre el polimorfismo rs2070874 y el riesgo de padecer asma en todas las clasificaciones de los sujetos del estudio (es decir, clasificación basada en control según GINA y clasificación basada en la gravedad según GINA). Esto sugiere que el polimorfismo no participa en la aparición del asma.

También estudiamos la diferencia en los niveles séricos de expresión de IL-2 e IL-4 entre sujetos con y sin infección por *M. pneumoniae*. Encontramos una expresión significativamente mayor de IL-2 e IL-4 en los pacientes no infectados por *M. pneumoniae* e infectados por *M. pneumoniae*, respectivamente. No se trata de un hallazgo inesperado, ya que la inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmunitario¹⁷. Suponemos que un nivel de IL-2 mayor, que estimula la inflamación, es importante a la hora de rechazar las infecciones patógenas¹⁸. Los sujetos con mayor nivel de IL-2 fueron, por lo tanto, los que no estaban infectados por *M. pneumoniae*. La relación entre los niveles de IL-2 y la infección por *M. pneumoniae* fue significativa solo entre los pacientes asmáticos, pero no en los controles. Esta observación coincide con el hecho de que la IL-2 desempeña un papel importante en la patogenia del asma¹⁹. Por su parte, la IL-4 suprime la inflamación, de modo que un alto nivel de IL-4 no permite al sistema inmunitario del anfitrión funcionar de forma óptima. Los pacientes

Tabla 6Distribución genotípica y asociación de riesgo en todos los sujetos con cargas bajas y altas de *Mycoplasma pneumoniae*

SNP	Genotipo	Baja carga de <i>M. pneumoniae</i> (n)	%	Alta carga de <i>M. pneumoniae</i> (n)	%	p	Odds ratio	p
rs6822844	GG	147	71,35	92	66,67	0,6427	Referencia	—
	GT	52	25,24	41	29,71		1,2598 (0,7755-2,0467)	0,3509
	TT	7	3,40	5	3,62		1,1413 (0,3518-3,7026)	0,8258
rs6534349	AA	145	70,39	109	78,99	0,1488	Referencia	—
	AG	56	27,18	28	20,29		0,6651 (0,3965-1,1157)	0,1223
	GG	5	2,43	1	0,72		0,2661 (0,0306-2,3102)	0,2299
rs2069762	GG	23	11,17	14	10,14	0,686	Referencia	—
	GT	77	37,38	58	42,03		1,2375 (0,5865-2,6111)	0,5760
	TT	106	51,46	66	47,83		1,0229 (0,4919-2,1269)	0,9516
rs3136534	AA	89	43,20	57	41,30	0,9356	Referencia	—
	AC	96	46,60	66	47,83		1,0735 (0,6797-1,6952)	0,7611
	CC	21	10,19	15	10,87		1,1153 (0,5314-2,3407)	0,7730
rs2243250	TT	87	42,23	54	39,13	0,8211	Referencia	—
	TC	98	47,57	68	49,28		1,1179 (0,7062-1,7697)	0,6343
	CC	21	10,19	16	11,59		1,2275 (0,5894-2,5567)	0,5840
rs2070874	TT	85	41,26	52	37,68	0,794	Referencia	—
	TC	98	47,57	69	50,00		1,1509 (0,7247-1,8278)	0,5515
	CC	23	11,17	17	12,32		1,2082 (0,5907-2,4712)	0,6044
rs2227284	TT	109	52,91	66	47,83	0,1019	Referencia	—
	TG	86	41,75	56	40,58		1,0754 (0,6825-1,6945)	0,7540
	GG	11	5,34	16	11,59		2,4022 (1,0514-5,4887)	0,0376
rs2243290	AA	87	42,23	54	39,13	0,844	Referencia	—
	AC	97	47,09	68	49,28		1,1294 (0,7132-1,7887)	0,6038
	CC	22	10,68	16	11,59		1,1717 (0,5658-2,4266)	0,6696

que presentaban un nivel mayor de IL-4 fueron, por lo tanto, los que estaban infectados por *M. pneumoniae*, independientemente de si se trataba de pacientes asmáticos o controles no asmáticos.

Las enfermedades respiratorias más graves en términos clínicos presentaban cargas mayores de infección por *M. pneumoniae*²⁰. Por eso, seguimos comparando la distribución de los 8 polimorfismos de *IL2* e *IL4* en sujetos con alta y baja carga de *M. pneumoniae* con el objetivo de identificar si alguno de los polimorfismos está relacionado con infección con baja carga del patógeno. No se hallaron diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos entre ambos grupos, pero se observó una asociación de riesgo significativa en el genotipo de variante homocigótica del polimorfismo rs2227284. Esto sugiere que el genotipo de variante homocigótica del polimorfismo rs2227284 podría predisponer a sus portadores a infecciones con alta carga de *M. pneumoniae*, tal y como explicaban Wang et al.²¹ cuando demostraron que el polimorfismo rs2227284 podía afectar a la respuesta humoral.

De hecho, varios estudios han investigado la relación entre distintos polimorfismos en los genes de *IL2* e *IL4* y el riesgo de padecer asma²²⁻²⁴. No obstante, la mayoría de dichos estudios solo incluían uno o 2 polimorfismos en su análisis, lo que podría ocasionar interpretaciones engañosas, ya que el efecto de un polimorfismo podría compensarse con la presencia de otros polimorfismos en el mismo gen²⁵. La fuerza de nuestro estudio radica en la incorporación de un gran número de polimorfismos en 2 genes estrechamente relacionados.

Conclusiones

En este estudio identificamos 2 polimorfismos que podrían usarse como biomarcadores predictivos para calcular el riesgo de padecer asma en niños. También hemos demostrado que los niveles séricos de IL-2 e IL-4 diferían significativamente entre los sujetos con y sin infección por *M. pneumoniae*. Entre los sujetos infectados por *M. pneumoniae* demostramos que el genotipo GG rs2227284 presentaba mayores probabilidades de sufrir una infección con alta carga. Sin embargo, reconocemos que existen varias limitaciones en el presente estudio, como el pequeño tamaño muestral, especialmente por lo que respecta a sujetos con infección por *M. pneumoniae*. En este sentido, se necesitan estudios adicionales con un mayor tamaño muestral.

Financiación

Este estudio ha sido financiado por los autores.

Autoría

RSW y HXJ seleccionaron a los sujetos del estudio, extrajeron el ADN de todas las muestras y realizaron la detección de la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. SQS genotipó los SNP y redactó el artículo. XYL y SJC cuantificaron los niveles séricos de expresión de IL-2 e IL-4 y realizaron los análisis estadísticos. ZBJ ideó el estudio y participó en su diseño y coordinación, y también ayudó a redactar el artículo. Todos los autores han leído y dado su aprobación al artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses, ni directo ni indirecto, respecto al contenido del artículo.

Agradecimientos

Agradecemos a los enfermeros de nuestros hospitales por su ayuda a la hora de seleccionar participantes.

Bibliografía

- Bai J, Zhao J, Shen KL, Xiang L, Chen AH, Huang S, et al. Current trends of the prevalence of childhood asthma in three Chinese cities: A multicenter epidemiological survey. *Biomed Environ Sci*. 2010;23:453-7.
- Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C, Zahran HS, King M, Johnson CA, et al. Trends in Asthma Prevalence, Health Care Use, and Mortality in the United States, 2001-2010. NCHS data brief, no 94. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2012.
- Nisar N, Guleria R, Kumar S, Chand Chawla T, Ranjan Biswas N. *Mycoplasma pneumoniae* and its role in asthma. *Postgrad Med J*. 2007;83:100-4.
- Huhti E, Mokka T, Nikoskelainen J, Halonen P. Association of viral and mycoplasma infections with exacerbations of asthma. *Ann Allergy*. 1974;33:145-9.
- Wood PR, Hill VL, Burks ML, Peters JL, Singh H, Kannan TR, et al. *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute and refractory asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;110:328-34.
- Biscardi S, Lorrrot M, Marc E, Moulin F, Boutonnet-Fauchet B, Heilbronner C, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1341-6.
- Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:697-728.
- Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet*. 1988;1:1129-32.
- Noble A, Thomas MJ, Kemeny DM. Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells. *Eur J Immunol*. 2001;31:2227-35.
- Barton SJ, Koppelman GH, Vonk JM, Browning CA, Nolte IM, Stewart CE, et al. PLAU polymorphisms are associated with asthma, PLAU levels, and lung function decline. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1391-400.
- Koppelman GH. Gene by environment interaction in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2006;6:103-11.
- Baloira Villar A, Pousada Fernández G, Vilariño Pombo C, Núñez Fernández M, Cifrián Martínez J, Valverde Pérez D. CCTTT pentanucleotide repeats in inducible nitric oxide synthase gene expression in patients with pulmonary arterial hypertension. *Arch Bronconeumol*. 2014;50:141-5.
- Babusikova E, Jesenak M, Evinova A, Banovcin P, Dobrota D. Frequency of polymorphism -262 c/t in catalase gene and oxidative damage in Slovak children with bronchial asthma. *Arch Bronconeumol*. 2013;49:507-12.
- Tan SC, Suzairi MS, Aizat AA, Aminudin MM, Nurfatimah MS, Bhavaraju VM, et al. Gender-specific association of NFKB1A promoter polymorphisms with the risk of sporadic colorectal cancer. *Med Oncol*. 2013;30:693.
- Ganem D, Hepatitis Prince AM. B virus infection —natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350:1118-29.
- Chen E, Miller GE. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. *Brain Behav Immun*. 2007;21:993-9.
- Aloysius M, Verma C, Eremin O. Therapy and host defences. En: Eremin O, Sewell H, editores. *Essential Immunology for Surgeons*. New York: Oxford University Press; 2011. p. 379-402.
- Tang Q, Chen W, Hendricks RL. Proinflammatory functions of IL-2 in herpes simplex virus corneal infection. *J Immunol*. 1997;158:1275-83.
- Ceyhan BB, Enc EY, Sahin S. IL-2 and IL-10 levels in induced sputum and serum samples of asthmatics. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2004;14:80-5.
- Nilsson AC, Björkman P, Welinder-Olsson C, Widell A, Persson K. Clinical severity of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) infection is associated with bacterial load in oropharyngeal secretions but not with MP genotype. *BMC Infect Dis*. 2010;10:39.
- Wang Y, Xu P, Zhu D, Zhang S, Bi Y, Hu Y, et al. Association of polymorphisms of cytokine and TLR-2 genes with long-term immunity to hepatitis B in children vaccinated early in life. *Vaccine*. 2012;30:5708-13.
- Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. Relationship between polymorphisms in IL4 and asthma in Japanese women: The Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23:242-7.
- Movahedi M, Mahdavi SA, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Amirzargar AA. IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-12, and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in asthma. *J Asthma*. 2008;45:790-4.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, et al. No association between atopy/asthma and the Ile50Val polymorphism of IL-4 receptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:342-5.
- Suzairi MSM, Tan SC, Aizat AAA, Aminudin MM, Nurfatimah MSS, Andee ZD, et al. The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol*. 2013;37:634-8.