



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Determinación de los polimorfismos: + 647 G>C en
el gen del Receptor de Glucocorticoide y -159 C>T
en el gen de CD14, en pacientes con Asma y
Enfermedad Obstructiva Crónica (EPOC)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Ana Ma. Pires D.S. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(es): Dr. Juan B. de Sanctis
Dra. Concepción Hernández

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE - 2009

RESUMEN

El Asma y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) son enfermedades respiratorias que se originan por un proceso inflamatorio crónico; ambas patologías se caracterizan por ser complejas, y resultan de la interacción de múltiples agentes ambientales con diversos genes. Se conoce que un número importante de pacientes es resistente a los efectos de glucocorticoides y se desconoce las razones; por ello, la importancia de analizar los polimorfismos del gen del receptor de Glucocorticoide y las pruebas funcionales para ensayarlo. Diversos investigadores han indicado que algunos polimorfismos de tipo SNP (polimorfismos de nucleótido simple), han sido asociados con el desarrollo de Asma y EPOC, uno de ellos en el gen del Receptor de Glucocorticoide (GR), el cual está definido a +647 pb en el intrón 2 y consiste en la transversión de una Guanina (G) por una Citosina (C). Por otro lado, el CD14 es una glicoproteína expresada en la membrana de mastocitos, macrófagos, que actúa como receptor de componentes bacterianos como Lipopolisacáridos (LPS). Uno de los polimorfismos en la región promotora del gen de CD14, está definido a -159 pb del sitio de inicio de la transcripción, y consiste en la transición de una Citosina (C) por una Timina (T).

El objetivo de nuestra investigación fue: estudiar la posible asociación entre la presencia de las variantes alélicas de estos dos polimorfismos, con el desarrollo y severidad de Asma y EPOC, en comparación con sujetos controles (sin enfermedades respiratorias). Para ello, se realizó la amplificación de los segmentos de interés en cada polimorfismo por PCR y luego el corte con enzimas de restricción específicas. Al mismo tiempo se analizó en dichos pacientes, tanto la función del receptor LPS-CD14-TLR-4 en ensayos biológicos *in vitro* de activación celular, como la función del Receptor de Glucocorticoide, mediante la producción o inhibición inducida por LPS, de TNF- α y radicales O_2^- .

Se observó que la presencia de los genotipos del polimorfismo en el gen del GR, difieren significativamente de lo reportado para la población caucasoide control ($p < 0,01$), y de lo reportado para Asma y EPOC en dicha raza. Por su parte, entre las variantes alélicas del polimorfismo de CD14, no se obtuvieron diferencias significativas. En las pruebas funcionales, no se halló asociación directa entre los genotipos de los polimorfismos estudiados, y la respuesta celular a dexametasona y sus análogos (ginsenoides). Se concluye que la resistencia farmacológica a los esteroides depende de varios mecanismos de respuesta celular que, en principio, no están directamente asociados con las variantes genotípicas de los dos polimorfismos SNP estudiados.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue financiado por el PROYECTO FONACIT N° G2005000389, asignado al proyecto de investigación: “*Farmacogenética de Medicamentos y productos Naturales antiinflamatorios en Enfermedades Humanas Crónicas*”, coordinado por el Dr. Juan B. De Sanctis, coordinación de investigación del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

Al Dr. Juan B. De Sanctis, por aceptarme dentro de la familia del IDI, por darme libertad para experimentar y aprender durante el trabajo, por sus consejos y luces en los momentos de preocupación durante la realización de esta investigación, gracias por confiar en mí y en mi trabajo.

Al Instituto de Inmunología (IDI) por abrirme las puertas, y permitirme trabajar en un ambiente multi-disciplinario y de nutrido conocimiento científico.

A la Dra. Nancy Larocca, por ser mi primera maestra y amiga en el laboratorio de Molecular del modulo II, por enseñarme con dulzura los detalles y asistirme de manera oportuna en mis dudas y preocupaciones.

Al Lic. Michael Mijares, por ayudarme y enseñarme de una manera diferente, que hay que estar seguro de si mismo al hacer las cosas y todo saldrá bien.

A la Dra. Dolores Moreno le agradezco por asistirme en la recolección de las muestras en el ambulatorio, dejando un momento sus ocupaciones y acompañarme en el trabajo con los pacientes.

A la Lic. Perla Chirinos por sus orientaciones en Citometría de flujo, y por cuestionarme continuamente durante el trabajo para así obtener resultados claros y reproducibles.

A la Lic. Yohanna Martin, por el tiempo brindado en su asesoría estadística y análisis de datos.

Al Personal Clínico del HUC y del IDI, por su trabajo incansable y dedicado con los pacientes que se incluyeron en el presente estudio.

Personales

En primer lugar a Dios y a la Virgen, por concederme la oportunidad de luchar cada día, y darme la salud que he necesitado durante mi vida.

A mis padres y mi hermano por ser mi querida familia, y saber llevar cada día mi carácter explosivo y cambiante. Mami gracias por que con tu apoyo y exigencias de cada día, has sabido construir lo que soy y lo que he logrado.

A mis amigos de siempre, Eloy, Yoraima, Ana K, Isbelia, Nataly, Leiwis, Yukency y a todo mi combo fantástico, porque a pesar de la distancia y las ocupaciones, siempre se mostraban pendientes de mí durante mis triunfos y fracasos.

A mis compañeros del Laboratorio de Molecular II y de Células I, Andrea, Juan, Gustavo, Mary, Adriana. A la Lic. María J. Peña por su apoyo y consejos oportunos, por ser una amiga que me ha sabido escuchar y ayudar durante mi estadía en el IDI, muchas Gracias chicos...

A mis amigas Karina Día, Nigmat Consigliere y M^a Alejandra Rangel, por todo este tiempo en que hemos compartido buenos y malos momentos, por luchar juntas con esfuerzo para lograr este sueño.

A Nelson Jiménez por su apoyo, cariño y entusiasmo en los momentos de preocupación, por los detalles y palabras que me alegraban el día, y a las Hnas. Ma. del Rocío, Ma. Begoña y Blanca Ma. por sus continuas oraciones y bendiciones.

INDICE DE GENERAL

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1-Definición y características de Asma y EPOC.....	14
1.2- Asma y EPOC.....	15
1.3- Causas de Asma y EPOC.....	16
1.4- Definición y Tipos de Polimorfismos.....	17
1.5- Características de los Glucocorticoides.....	20
1.6- Características de la Glicoproteína CD14.....	22
1.7- Características de las respuestas inflamatoria y anti-inflamatoria.....	26
1.8- Dexametasona y Ginsenósidos.....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	32
3. ANTECEDENTES.....	33
3.1- Gen del Receptor de Glucocorticoide.....	33
3.2- Polimorfismo+647 G>C en el gen del GR.....	35
3.3- Gen de CD14 y el polimorfismo -159 C>T en la región promotora del gen de CD14.....	38
4. HIPÓTESIS.....	43
5. OBJETIVOS.....	43
5.1- Objetivo general.....	43
5.2- Objetivos específicos.....	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
6.1- Población de Estudio.....	45
6.2- Criterios usados para la exclusión de los pacientes del presente proyecto de investigación.....	45
6.3- Detección de polimorfismos en un grupo de pacientes con Asma, EPOC y sujetos controles.....	46
6.3.1- Obtención de ADN genómico.....	46

6.3.2- Extracción de ADN (según QIAamp DNA miniKit).....	47
6.4- Amplificación y análisis de los fragmentos de interés.....	48
6.4.1- Polimorfismo en el gen del Receptor de Glucocorticoide (GR).....	49
6.4.2- Polimorfismo en el gen de CD14.....	49
6.5- Ensayos funcionales para la evaluación de TNF -α y O₂⁻.....	52
6.5.1- Aislamiento de Leucocitos Humanos Totales.....	52
6.5.2- Detección de radicales de Oxígeno.....	52
6.5.3- Determinación de la Viabilidad Celular.....	53
6.5.4 - Determinación de la producción de H ₂ O ₂ por citometría de flujo.....	54
6.5.5- Determinación de la producción de TNF - α	55
6.6- Análisis Estadístico.....	57
7. RESULTADOS.....	58
7.1- Variantes genotípicas del polimorfismo <i>BclI</i> en la longitud de los fragmentos de restricción, en amplificados por PCR del gen del Receptor de Glucocorticoide.....	59
7.2-Análisis mediante ensayos de PCR- RFLP, en la región promotora del gen de CD14.....	60
7.3- Resultados de Análisis de Secuencias.....	61
7.4- Distribución de las variantes polimórficas en el gen del GR, en la población de pacientes con Asma, EPOC y grupo control.....	65
7.5- Distribución de las variantes del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, en un grupo de pacientes con Asma, EPOC y en un grupo control.....	65
7.6-Distribución de los grados de severidad de pacientes con Asma y EPOC, en función de la distribución de genotipos para cada polimorfismo.....	67
7.7-Efectos de la dexametasona y los ginsenósidos, sobre la formación de H ₂ O ₂ , en polimorfonucleares de pacientes y controles por Citometría de Flujo.....	71
7.8- Evaluación de la producción de TNF- α inducida por LPS, en respuesta a los tratamientos con dexametasona y ginsenósidos por ELISA tipo Sándwich.....	76
8. DISCUSIÓN.....	79
9. CONCLUSIONES.....	92
10. RECOMENDACIONES.....	94
11 BIBLIOGRAFÍA.....	96
12. ANEXOS.....	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Células predominantes en la respuesta inflamatoria de Asma y EPOC, así como las consecuencias funcionales de dicha inflamación, así como las consecuencias funcionales de dicha inflamación.....	16
Figura 2: Esquema del mecanismo de acción de los glucocorticoides con su receptor intracelular GR, y la actuación sobre la expresión citoquinas al interactuar con ADN vinculados con factores de transcripción como (NF-kB) o (AP-1).....	21
Figura 3: Estructura genómica del Receptor de Glucocorticoide y el polimorfismo <i>Bcl I</i> entre la unión del intrón 2/exon 2	22
Figura 4: Esquema de la posición del gen de CD14 en el cromosoma número 5 en la posición 31.1.	22
Figura 5: Esquema de activación de la respuesta inmune inflamatoria mediada por el complejo LPS-CD14-TLR-4, y su regulación a través de LBP.....	24
Figura 6: Estructura y localización del polimorfismo -159 C>T en el promotor de CD14. ATG: codón de inicio de la traducción. -----: Intrón. —: región 5' o 3' no traducida. ■: región codificante.....	25
Figura 7: Respuesta inflamatoria (Th1) y anti-inflamatoria (Th2), las células y las citocinas que actúan en cada proceso.....	27
Figura 8: Actividad de los compuestos ginsenósidos y dexametasona sobre receptoresn.n celulares, y la actuación del complejo LPS-CD14 sobre la transcripción del factor NF-kB	30
Figura 9: Estructura química de los compuestos a utilizar para evaluar la liberación de TNF- α y radicales de oxígeno.....	31
Figura 10: Diagrama del método de detección de la citocina inflamatoria TNF- α por ELISA Tipo Sándwich.....	56

Figura 11: Electroforésis en gel de agarosa al 3% con los genotipos del polimorfismo +647 G>C en el gen del GR de pacientes con Asma.....60

Figura 12: Gel de agarosa al 3% con los productos de PCR-RFLP para los genotipos del polimorfismo -159 C>T en la región promotora de CD14 de pacientes con EPOC.....61

Figura 13: Electroferograma producto de secuenciación, correspondiente a un amplificado del intrón 2 del gen del Receptor de Glucocorticoide en un paciente con Asma. Las líneas rojas corresponden a Timina (T), las líneas negras a Guanina (G), líneas verdes a Adenina (A), y las líneas azules a Citosina (C)63

Figura 14: Alineamiento de la secuencia del gen del Receptor de Glucocorticoide. La secuencia corresponde a un amplificado por PCR con los iniciadores (F): 5' GCAGTGAACAGTGTACCAGACC-3' (R): 5'-AAATTGAAGCTTAACAATTTTGGC-3', reportada por *Fleury y col., 2003*, en muestras de ADN de sujetos con Asma. En dicha figura se resalta el 100% de identidad con una región del gen del GR para *Homo sapiens*.....64

Figura 15: Alineamiento de la secuencia del gen de CD14. La secuencia corresponde a un amplificado por PCR con los iniciadores (F): **F:** 5'-GTGCCAACAGATGAGGTTTAC-3' (R): 5'GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-3', reportada por *Kowal y col., 2008*, en muestras de ADN de sujetos con EPOC. En dicha figura se resalta el 100% de identidad con una región de 22 pb del transcrito variante 1, para la molécula de CD14 en *Homo sapiens*.....64

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Características de los polimorfismos en los genes del Receptor de Glucocorticoide y de CD14, y su asociación con algunas enfermedades.....	19
Tabla II: Condiciones para la mezcla de PCR, para la restricción enzimática, así como para la corrida electroforética, para el gen del GR y para el gen de CD14.	51
Tabla III: Componentes de cada condición usada para el ensayo de NBT.....	53
Tabla IV: Condiciones analizadas en el ensayo de Capacidad Oxidativa de Leucocitos Humanos Totales	55
Tabla V: Media etaria, sexo y paquetes de cigarrillos inhalados por año, para los grupos Asma, EPOC y Controles.....	59
Tabla VI: Distribución de las variantes genóticas y frecuencia alélica del polimorfismo de <i>BclI</i> en el gen del Receptor de Glucocorticoide, entre pacientes con Asma, EPOC y sujetos controles.....	66
Tabla VII: Distribución de los genotipos del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, así como la frecuencia de los alelos C y T, en los pacientes con Asma, EPOC y Controles.....	67
Tabla VIII: Grado de severidad de los pacientes con Asma, en función de la variantes polimórficas para el gen del GR y el gen de CD14, empleando el criterio de clasificación de GINA 2006.....	69
Tabla IX: Distribución del grado de severidad de los pacientes con EPOC, en función de las variantes genóticas para los polimorfismos en los genes del GR y de CD14, el criterio de clasificación presentado fué ATS 2004.....	70
Tabla X: Evaluación del efecto de los compuestos dexametasona, PPD, CK y PPT, sobre la viabilidad de las células polimorfonucleares de individuos controles.....	72

Tabla XI: Efecto sobre la producción de H ₂ O ₂ en respuesta a los ginsenósidos, en polimorfonucleares de tres pacientes respondedores a la dexametasona.....	74
Tabla XII: Efecto de los ginsenósidos sobre la producción de H ₂ O ₂ , en células polimorfonucleares de cinco pacientes no respondedores a la dexametasona.....	75
Tabla XIII: Producción de la citocina TNF- α en leucocitos humanos totales de cuatro sujetos con Asma, luego de la estimulación con LPS y los tratamientos con los compuestos.....	77
Tabla XIV: Producción de TNF- α en leucocitos humanos totales de cuatro pacientes con EPOC, inducida por LPS y los tratamientos con Dexametasona, PPD, PPT y CK.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adenina	FEV1: Volumen Espiratorio Forzado durante el primer segundo
ABTS: 2,2'-azino-di [3-etil-benzotiazolin sulfonato	FVC: Capacidad Vital Forzada
AP-1: Proteína activadora 1	G: Guanina
ATS: Asociación Americana del Tórax	GCs: Glucocorticoides
BCA: Acido Bicinónico	GR: Receptor de Glucocorticoide
BLAST: <i>Basic Local Alignment Search tool</i>	GREs: Elementos de Respuesta de Glucocorticoides
BSA: Albúmina de Suero Bovino	HDM: <i>House Dust Mite</i>
C: Citosina	HPA: Hormona Hipotalámica Pituitaria Adrenal
CeSAAN: Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucléicos	HRB: Hiperreactividad Bronquial
CF: Fibrosis Cística	HRP: Peroxidasa de Rábano Picante
CK: Compuesto K	HSP: <i>Heat shock protein</i>
Compuesto K: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]	IgE: Inmunoglobulina E
CTL: Células citotóxicas	IL-10: Interleucina-10
DCF-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetato	IL-6: Interleucina-6
DEAE: Dietilaminoetanol	INF-γ: Interferón γ
DMSO: Dimetilsulfóxido	ISAAC: Estudio Internacional de Alergia y Asma en Niños
dNTPs: desoxirribonucleótidos	LBP: Proteína de unión al ligando
DO: Densidad óptica	LI: Leve intermitente
EDTA: Ácido Etilendiamino tetraacético	LP: Leve persistente
ELISA: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	LPS: Lipopolisacáridos
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	MAPK: Protein kinasa activada por Mitógeno
ETS: Humo de tabaco ambiental	MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
	mEPH: Epoxi hidrolasa microsomal

μL: Microlitros
mL: mililitros
MP: Moderado persistente
MTT: 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5-
difenil tetrazolio
NADPH: Nicotinamida Adenina
Dinucleotido Fosfato (oxidasa)
NBT: Nitro azul de Tetrazolio
NCBI: *Nacional Center for Boitechnology
Information*
NF-κB: Factor Nuclear κB
NK: Células citotóxicas Naturales
O₂⁻: Ión superóxido
PBS: Buffer Fosfato Salino
PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa
PI3K: Fostatidilinositol trifosfato
PMA: Forbol Miristato Acetato

PPD: 20(S) - Protopanaxadiol
PPT: 20(S) - Protopanaxatriol
RA: Arthritis Reumatoide
RFLP: Polimorfismo de la Longitud de
Fragmentos de Restricción
SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple
SP: Severo persistente
T: Timina
TGF-β: Factor transformador de
crecimiento beta
Th0: linfocitos T indiferenciados
Th1: Respuesta inflamatoria
Th2: Respuesta anti- inflamatoria
TLR-4: Receptor Toll-like -4
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-α
VNTR: Variaciones del Número de
Repeticiones en Tándem

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Definición y Características de Asma y EPOC

Tanto el Asma como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) son enfermedades del sistema respiratorio, que se caracterizan por la obstrucción del flujo de aire y por procesos inflamatorios crónicos, de alta prevalencia mundial (*Barnes., 2000*).

Según datos epidemiológicos presentados por el Estudio Internacional de Alergias y Asma en Niños (ISAAC), la prevalencia de Asma en Latinoamérica varía entre un 6,6 % y un 32,1 % en infantes menores de 14 años (*Aldrey y col., 2003*). La Iniciativa Global para el Asma (siglas en inglés *Global Initiative of Asthma*) (2005), define el Asma como una inflamación crónica de las vías aéreas, en la que tienen un papel destacado determinadas células y mediadores. Desde el punto de vista funcional se caracteriza por Hiperreactividad Bronquial (HRB); y desde el punto de vista clínico por episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, generalmente con un mayor o menor grado de obstrucción generalizada al flujo aéreo, reversible en forma espontánea o con tratamiento. La hiperreactividad bronquial y los niveles de IgE total encontrados en el Asma, tienen un fuerte componente genético, y la interrelación entre éste y los agentes medioambientales poseen un rol central en el inicio y desarrollo de esta patología. (*Barnes y col., 1998*). La sensibilización en edades tempranas a diferentes aeroalergenos, presencia de dermatitis atópica y/o rinitis alérgica, tabaquismo materno durante el embarazo, y exposición al humo del cigarrillo u otros contaminantes ambientales e infecciones respiratorias bajas, incrementan el riesgo de desarrollar Asma en forma crónica (*Larocca., 2005*).

Por su parte la prevalencia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asociada a el hábito de fumar en adultos con edades comprendidas entre 40-60

años, varía entre 7,8% y 19,7% según el Proyecto Latinoamericano para la Investigación de Enfermedades de Obstrucción Pulmonar (PLATINO 2002), realizado en cinco ciudades de Latinoamérica: Ciudad de México (México), Montevideo (Uruguay), Sao Paulo (Brasil), Santiago (Chile) y Caracas (Venezuela) (*Tálamo y col., 2007*). La EPOC es una patología caracterizada por la limitación de flujo respiratorio progresivo y pocas veces reversible, asociada con la respuesta anormal e inflamatoria de los pulmones a las partículas y gases nocivos (*Barnes., 2000*). Los principales factores de riesgo establecidos en la patogénesis de dicha enfermedad son el hábito tabáquico, la deficiencia severa de α -1 antitripsina y un componente etario. Aunque, solo el 20% de los fumadores desarrollan EPOC y un 10% de individuos con EPOC no son fumadores, también se estima la prevalencia de factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad (susceptibilidad genética) (*Meyers y col., 2002*).

1.2- Asma y EPOC

Aún cuando ambas patologías involucran inflamación en el tracto respiratorio difieren en algunos aspectos: los estudios histopatológicos de EPOC muestran una implicación predominante de las vías respiratorias periféricas (bronquiolos) y del parénquima pulmonar, mientras que el Asma implica inflamación de todas las vías respiratorias, sin implicación del parénquima pulmonar. En la EPOC existe una obstrucción de los bronquiolos, con fibrosis e infiltración con neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos), mientras que en Asma predominan eosinófilos, mastocitos y linfocitos T CD4⁺ (T cooperadores) (Figura 1) (*Holloway y col., 1999*). El síntoma más importante en EPOC es la disnea progresiva, que a diferencia del Asma, se considera una enfermedad no

episódica con inicios en la etapa adulta, caracterizada por la ausencia de respuesta a fármacos broncodilatadores como corticosteroides (*Barnes y col., 2004*).

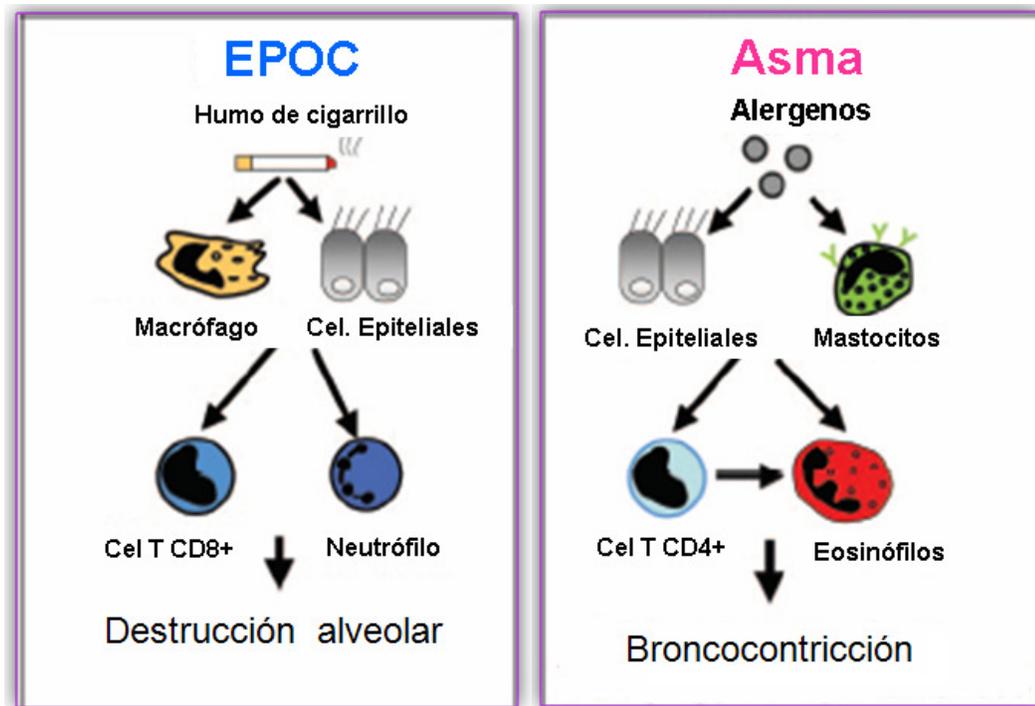


Figura 1. Células predominantes en la respuesta inflamatoria de Asma y EPOC, así como las consecuencias funcionales de dicha inflamación. Tomado y modificado de *Barnes y col., 2004*.

Las evidentes similitudes entre Asma y EPOC, se explicaron en 1960 por la Hipótesis Dutch, donde se sugiere que estas dos patologías no son entidades distintas, y que la similitud en los mecanismos de estas enfermedades pueden estar implicados en el desarrollo de ambas patologías en un mismo individuo, de hecho, recientes estudios epidemiológicos con adultos sugieren que el Asma es un factor de riesgo para el desarrollo futuro de EPOC (*Jack., 2004; Hanania., 1996*).

1.3- Causas de Asma y EPOC

El Asma y la EPOC son enfermedades respiratorias comunes causadas por la interacción de la expresión de genes con factores ambientales. La EPOC está fuertemente

influenciada por el ambiente; un ejemplo es el humo de cigarrillo, considerado como el factor de riesgo más importante, pero debido a que sólo un 10 % de los individuos con una significativa historia como fumadores desarrollan la enfermedad, se sugiere susceptibilidad genética (*Cheng y Cheng., 2004*). La influencia ambiental también es importante para el desarrollo del Asma, comprende la exposición a contaminantes ambientales tales como el humo de cigarrillo, alérgenos (dentro y fuera del hogar) e infecciones respiratorias, especialmente infecciones virales (*Penden y col., 2005*). La exposición a oxidantes exógenos, adicional a las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) endógenas, incrementan el estrés oxidativo en el pulmón (*Barnes y col., 2004; Penden., 2005*).

Además de los elementos ambientales y celulares implicados, ha sido ampliamente descrito que el inicio y desarrollo de estas dos patologías son influenciadas por variaciones genéticas, entre ellas la presencia de polimorfismos en posiciones y genes específicos.

1.4- Definición y tipos de Polimorfismos

El Asma y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica son patologías multifactoriales y complejas, sin embargo el análisis del desarrollo de ambas enfermedades se puede realizar mediante el estudio de polimorfismos genéticos. El término polimorfismo está definido como, la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un mismo locus. Los alelos, son variaciones de las secuencias de ADN presentes en un locus o posición particular del cromosoma, y por convención se habla que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más del 1% de la población (*Luque y Herráez., 2005*).

Existen algunas formas de polimorfismo genético, entre ellos el tipo *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), y el tipo Variaciones del Número de Repeticiones en Tándem, del inglés *Variable Number Tandem Repeats* (VNTR). Los SPNs pueden estar localizados en las regiones no codificantes del genoma (intrones o promotores) y no alteran el producto génico porque no se traducen, pero si afectan su expresión. Mientras que si se hallan en la región codificante (exones) pueden o no producir un cambio de secuencia protéica, si la secuencia nueva no codifica para un aminoácido distinto al preexistente se les conocen como SNPs sinónimos, y si codifican para un aminoácido diferente al inicial se conocen como SNPs no sinónimos, y pueden influenciar la regulación del gen por efectos de splicing o empalme, eficacia de transcripción, actividad del promotor, inducción de un codón de parada (*DeRijk y De Kloet., 2008*).

En biología molecular, el término polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que varían entre individuos, y que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción. La herramienta RFLP es utilizada como marcador para identificar grupos particulares de individuos con variaciones en secuencias de su genoma, que pueden aumentar el riesgo de contraer ciertas enfermedades genéticas. (*Luque y Herráez., 2005*).

En este estudio se analizó por técnicas moleculares la presencia los genotipos de dos polimorfismos genéticos, uno de ellos en el gen del Receptor de Glucocorticoide (GR) y otro en la región promotora del gen de CD14, así como la actividad funcional del GR y del complejo LPS-CD14-TLR-4 en la liberación o represión de moléculas pro-inflamatorias, y su influencia en el desarrollo y susceptibilidad tanto de Asma como de EPOC en la

población estudiada. En la tabla I se muestran algunas de las características de los polimorfismos estudiados.

Tabla I: Características de los Polimorfismos en los genes del Receptor de Glucocorticoide y de CD14, y la asociación de los genotipos de dichos polimorfismos con algunas enfermedades.

Gen	Localización del gen	Tipo de polimorfismo	Localización de la variante	Patologías asociadas con la presencia de los genotipos de los polimorfismos	Referencias
GR	5q31.3	SNP	Intrón II G/C	-Fibrosis Cística -Artritis Reumatoide -Obesidad Abdominal -Enfermedad celíaca -Enfermedad de Chron y asma -Resistencia insulina y desarrollo de perfil aterogénico	Corvol y col., 2007 Lee y col., 2005 Buemann y col., 2007 Rosmond y col., 2000 DeRijk y De Kloet., 2008 Rosmond y col., 2000
CD14	5q31.1	SNP	Región promotora C/T	-Asma no atópica y alergia alimentaria -Enfermedad Alcohólica -Sensibilidad a insulina Colitis ulcerosa y Alergia nasal -Rinitis alérgica y eosinofilia	Woo y col., 2003 Meiler y col., 2005 Leynaert y col., 2006 Hong y col., 2007

1.5- Características de los Glucocorticoides

Los Glucocorticoides (GCs) son hormonas que controlan la proliferación celular y el metabolismo, su secreción es regulada por el hipotálamo, el cual recibe los estímulos del Sistema Nervioso Central. Los GCs ejercen su efecto por la unión con el receptor intracelular de glucocorticoide (GR) en la zona C-terminal, este receptor que está presente en el citoplasma en forma fosforilada también posee zonas para la unión a proteínas de “shock térmico” (Heat shock), por ejemplo HSP₉₀. Al interactuar los GCs con su receptor específico forman un complejo que se transloca al núcleo a través de proteínas chaperonas, una vez que dicho complejo GC-GR se halla en núcleo puede unirse a homodímeros de los Elementos de Respuesta de Glucocorticoides (GREs), y actuar como factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco, aumentando o reprimiendo la transcripción de dichos genes al interactuar con promotores de elementos GC sensibles, (Figura 2). Algunos de los factores que pueden influenciar la expresión de GR son neurotransmisores, corticosteroides y citoquinas (*Fleury y col., 2003*).

El gen de GR se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en la posición 31.3 (5q31.3) (*Murray y col., 1987*), este gen posee 157582 pb, 9 exones y 8 intrones, el RNAm presenta 6517 pb (*GenBank NM- 001018075.1*) (Figura 3). Este receptor puede regular la expresión de varios genes de citoquinas inflamatorias por interacción con ADN vinculados con los factores de transcripción NF-κB o proteína 1 activadora (AP-1) (*Lee y col., 2005*). Las diferentes formas de GR resultan en la variabilidad del gen, que pueden afectar la regulación de algunas funciones biológicas, por ello es clave en la susceptibilidad a algunas enfermedades, particularmente con respecto al stress metabólico. La complejidad de las múltiples isoformas, mutaciones y polimorfismos

en GR pueden afectar la expresión de proteínas, estructura, función y diversas consecuencias clínicas (Corvol y col., 2007).

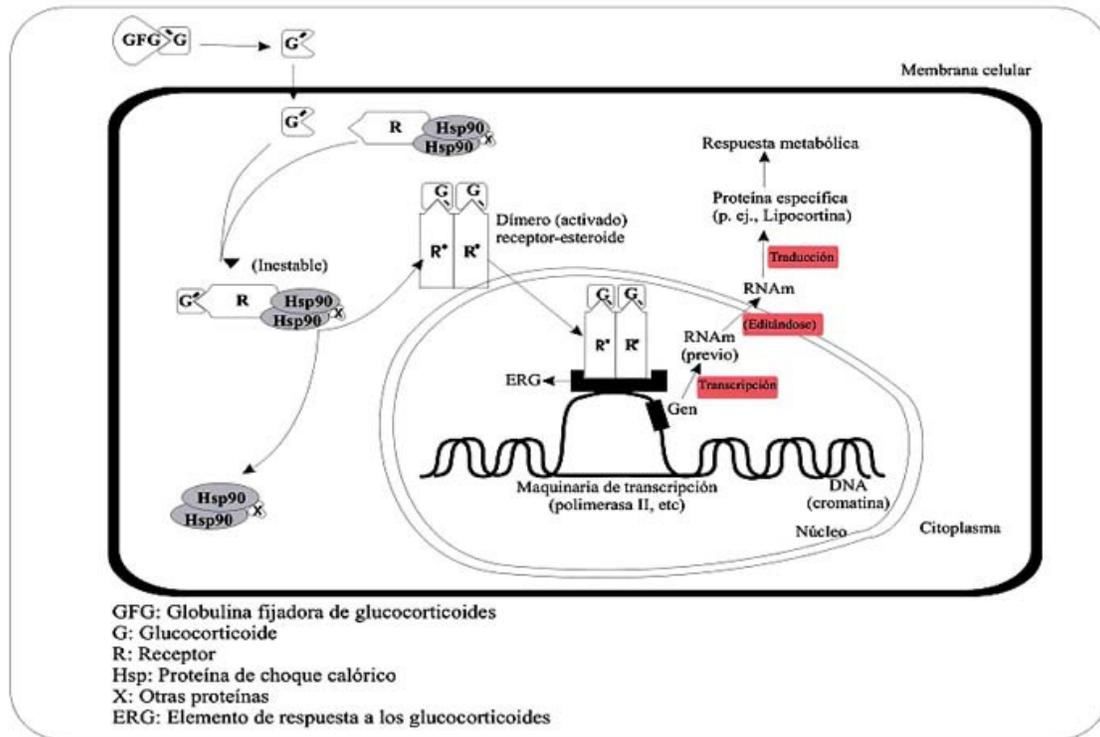


Figura 2: Esquema del mecanismo de acción de los glucocorticoides con su receptor intracelular GR, y la actuación sobre la expresión citoquinas al interactuar con ADN vinculados con factores de transcripción como (NF-kB) o (AP-1). Tomado de *Gonzales y col., 2003*.

De los distintos SNPs que presenta el gen del GR y que se encuentran asociados a la variación en la sensibilización a glucocorticoides, en este estudio se analizó el polimorfismo *BclI* identificado en el intrón 2, a 647 pb de la unión entre el exón 2/ intrón 2, y esta caracterizado por la transversión de una Guanina (G) por una Citosina (C), rs 41423247. (Figura 3)

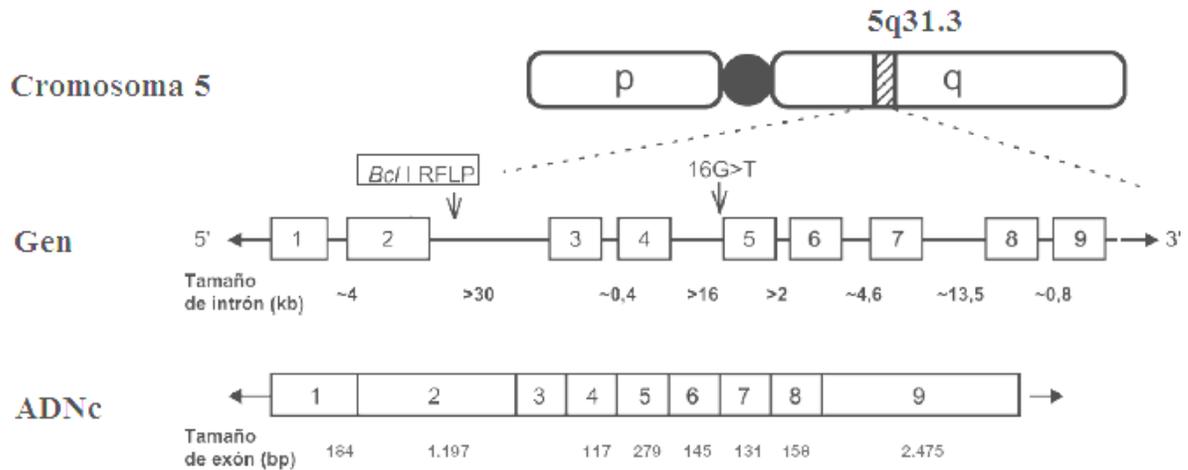


Figura 3. Estructura genómica del Receptor de Glucocorticoide y el polimorfismo *BclI* en la unión intrón 2/ exón 2. Tomado y modificado de *Fleury y col. 2003*.

Al mismo tiempo, en este trabajo se analizó la molécula de CD14, cuyas particularidades se muestran a continuación:

1.6- Características de la glicoproteína CD14

El gen de CD14 se halla localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en la posición 31.1 (5q31.1) (*Goyert y col., 1988*), este gen presenta 1939 pb y 3 exones, el ARNm tiene 1530 pb. (*Genbank NM-001040021*) (Figura 4).

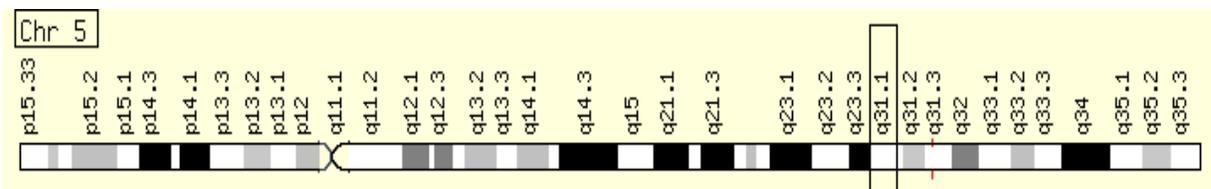


Figura 4: Esquema de la posición del gen de CD14 en el cromosoma 5 en la posición 31.1. Tomado de <http://www.igb.es/cromosomas/cromosoma5.html>.

El CD14 es un receptor mielóide multifactorial de sistema inmune innato, constitutivamente expresado en la superficie de monocitos, macrófagos y neutrófilos (mCD14), que tiene especificidad por lipopolisacáridos (LPS), también interactúa con otros

productos microbianos como peptidoglicanos y ácido lipoteicoico, y es un potente inductor de inflamación pulmonar. La forma soluble de CD14 (sCD14) es abundante en el plasma a concentraciones de microgramos, facilita la unión de LPS a las células que no expresan mCD14, además acelera la transferencia entre las micelas del LPS y lipoproteínas al actuar como transporte. Sus concentraciones se hallan elevadas como resultado de la inflamación, infección etc. (*Lin y col., 2008*).

El acoplamiento de CD14 con LPS resulta en la activación de las células presentadoras de antígenos, incluyendo macrófagos y células dendríticas, con subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias y mediadores. El reconocimiento de CD14 por LPS es aumentada por la unión LPS- proteínas de unión adaptadoras y señales transmitidas del complejo receptor Toll-like 4 (TLR-4)/ MD-2. Estos receptores altamente conservados median la respuesta a través del reconocimiento de específicos Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). A partir de este complejo surge la activación celular y la transcripción del Factor Nuclear- κ B (NF- κ B), así como producción de citoquinas inflamatorias semejantes al Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (*Lin y col., 2008*). Estas citoquinas estimulan la síntesis y liberación de la proteína de unión al ligando (LBP) en hepatocitos, de igual modo el glucocorticoide sintético Dexametasona actúa como refuerzo en la estimulación de la LBP en respuesta a LPS. El Factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) y la interleucina 10 (IL-10) actúan para inhibir la expresión de esta proteína de unión (Figura 5).

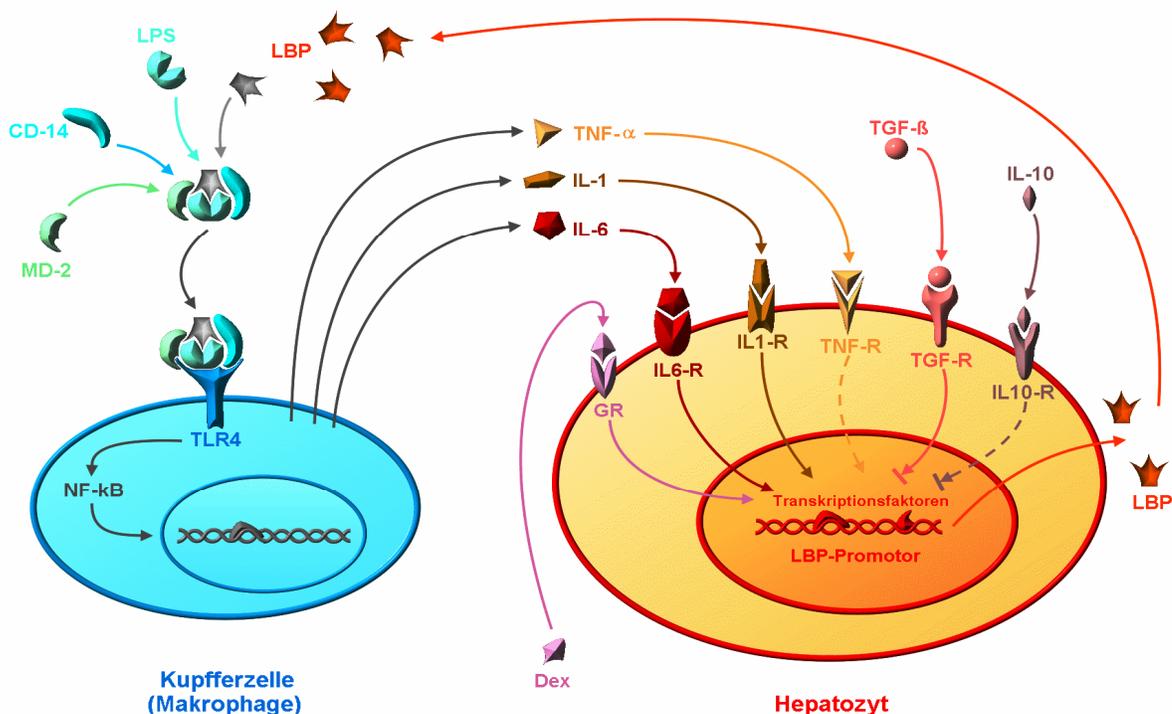


Figura 5: Esquema de activación de la respuesta inmune inflamatoria mediada por el complejo LPS-CD14-TLR-4, y su regulación a través de LBP. Tomado de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hallatschek-werner-2004-10-20/HTML/chapter1.html>.

El CD14 soluble y de membrana al unirse a los componentes bacterianos, modulan indirectamente el balance Th1/Th2 por inducción de fuertes respuestas IL-12 al responder a un estímulo ambiental, y cuya señal es necesaria para la maduración de células T, resultando en la producción de Interferón γ (INF- γ) e inmunoglobulina E (IgE) (*Woo y col., 2003*).

El polimorfismo funcional más prevalente en el gen de CD14 se encuentra en la región promotora de dicho gen y modula la respuesta a lipopolisacáridos, ya que de acuerdo al alelo presente en este polimorfismo se aumentara la transcripción de este gen. Este polimorfismo se caracteriza por la transición de una Citosina (C) por una Timina (T), a -

159 pb del sitio de inicio de la transcripción en la región promotora del gen de CD14, rs 2569190 (Baldini y col., 1999), (Figura 6).

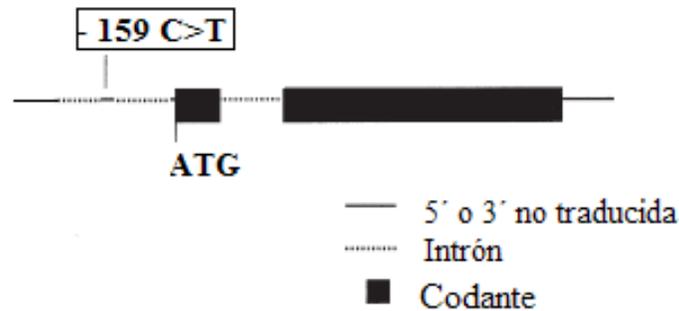


Figura 6: Estructura y localización del polimorfismo -159 C>T en el promotor de CD14. ATG: codón de inicio de la traducción. -----: Intrón. —: región 5' o 3' no traducida. ■: región codificante. Tomado y modificado de *LeVan y col., 2005*.

Dado que no todos los laboratorios de Biología Molecular disponen de equipos de secuenciación, la herramienta más empleada para la detección de secuencias polimórficas, se denomina RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*), basado en la detección de variaciones de las secuencias de ADN (codificantes o no), que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción, o punto de corte para una enzima de restricción. La importancia de las enzimas de restricción radica en su gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta de ADN dúplex, y la consecuente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas de ADN llamadas sitios de reconocimiento o de restricción. Así, cuando se detectan polimorfismos mediante RFLP, los fragmentos obtenidos de la restricción enzimática son diferentes dependiendo del alelo presente, es decir, obedecen a la presencia o ausencia de alguna variante polimórfica, para presentar o no el punto de corte de la enzima de restricción respectiva (*Luque y Herráez., 2005*). Estas variaciones alélicas en fragmentos de ADN son corroboradas por Secuenciación.

1.7- Características de las respuestas inflamatoria y anti-inflamatoria

De acuerdo a las características y naturaleza de los patógenos, se producen respuestas inflamatorias (Th1) o anti- inflamatorias (Th2) al diferenciarse los linfocitos vírgenes Th0. En la respuesta tipo Th1, como producto de la diferenciación de los linfocitos Th0, es liberado (INF- γ) que permite la activación del macrófago, también se libera la interleucina-12 (IL-12), que actúa sobre las células citotóxicas Naturales (NK) y sobre las células citotóxicas (CTL), quienes lisan las células que portan el antígeno que indujo su activación, generándose así una respuesta celular, es decir, mediada por células. La inflamación en las vías aéreas está caracterizada por la presencia de un incrementado número de neutrófilos, y alta concentración de citoquinas.

Por su parte en la respuesta inmunosupresora o anti-inflamatoria, al actuar sobre los linfocitos Th0 un agente extracelular, estos se diferencian a linfocitos tipo Th2, liberándose IL-4 que actúa junto con los anticuerpos IgE e IgM sobre la célula plasmática, mediando la respuesta humoral ó regulada por anticuerpos; de igual forma ocurre la liberación de IL-5 que permite la activación de los eosinófilos, que son encargados de la defensa inmunológica del organismo (Figura 7).
(<http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/perez/p10.jpg>).

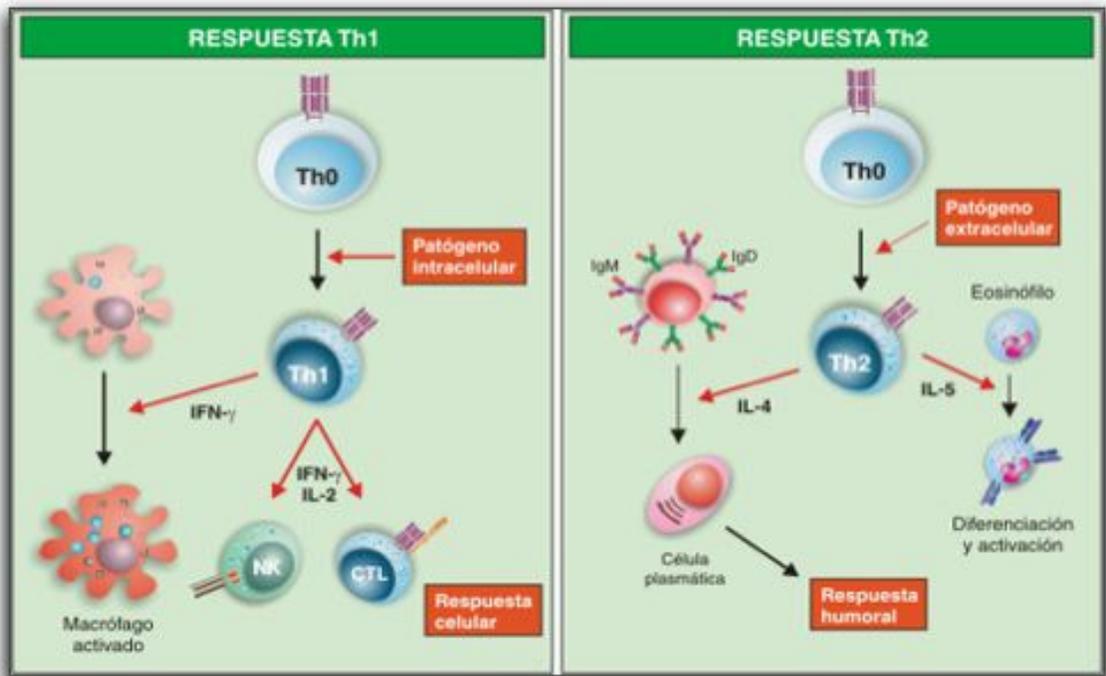


Figura 7: Respuesta inflamatoria (Th1) y anti-inflamatoria (Th2), las células y las citocinas que actúan en cada proceso. Tomado de <http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/perez/p10.jpg>.

Conociendo las considerables evidencias que, el estrés oxidativo originado en el pulmón por la continua exposición a oxidantes endógenos (oxidantes intracelulares) o exógenos (aire contaminado o humo de cigarrillo), juega un importante papel en la patogénesis de un gran número de enfermedades pulmonares, por efectos dañinos directos e indirectos (*McNee., 2000*); se planteó analizar la producción de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 , a través de la NADPH oxidasa en pacientes con Asma y EPOC, previamente genotipificados para los polimorfismos +647 G>C en el gen del GR y -159 C>T en el gen de CD14.

Enzimas como la NADPH oxidasa leucocitaria, encontrada en fagocitos y linfocitos B profesionales, catalizan la producción de anión superóxido (O_2^-) por la transferencia de un electrón a oxígeno molecular usando como donador de electrones la NADPH. El anión O_2^-

es rápidamente convertido en especies de oxígeno tóxicas como H_2O_2 y radicales hidroxilo (OH^\cdot), que pueden eficazmente eliminar microorganismos durante la respuesta inmune; sin embargo, aunque el objetivo de este proceso es remover agentes infecciosos, partículas foráneas o injuria tisular durante la respuesta inflamatoria. Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) generadas por los neutrófilos, son candidatos potenciales para el daño de tejidos adyacentes al sitio de la inflamación, por lo cual las (EROs) han sido involucradas en el daño tisular originado en enfermedades inflamatorias como Artritis Reumatoide, isquemias y síndromes de deficiencias respiratorias en adultos (*DeLeo y Quinn., 1996*).

1.8- Dexametasona y ginsenósidos

En este estudio se evaluó la función del receptor de glucocorticoide y de CD14-LPS-TLR-4, a través de la inducción o supresión de la producción de la citocina $TNF-\alpha$ y radicales de oxígeno, encontrados en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas, para lo cual se evaluaron los siguientes compuestos:

La dexametasona es un potente Glucocorticoide sintético que actúa como anti-inflamatorio e inmunosupresor, es útil para contrarrestar el shock alérgico e incrementa la fosforilación del GR y de receptores nucleares, por ello se usará como control positivo en los ensayos funcionales. De igual modo se conoce, que la dexametasona actúa como un glucocorticoide sintético que al unirse con su receptor GR se traslocan al núcleo uniéndose a homodímeros de los (GREs), de manera que ejerce un impedimento estérico para la transcripción del Factor Nuclear ($NF-\kappa B$), impidiendo el proceso inflamatorio (Figura 8).

Por su parte los Ginsenósidos son los componentes farmacológicamente activos presentes en la raíz del ginseng, son terpenoides saponinas ampliamente clasificados en 20

(S)- Protopanaxatriol (PPT), 20 (S)- Protopanaxadiol (PPD) y [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol] ó Compuesto K. Los ginsenósidos estimulan la síntesis de proteínas e inhiben la agregación de las plaquetas, igualmente son inhibidores de la expresión enzimática vía NF-kB y aumentan la actividad del sistema inmune (*Leung y col., 2006.*) Éstos compuestos, han sido ampliamente estudiados por su actividad anti- tumoral y anti-inflamatoria (*Kim y col., 2004*). Actualmente se desconoce si éstos compuestos se unen al mismo receptor que la dexametasona; las estructuras químicas de dichos compuestos se muestran en la (Figura 9).

Se ha descrito resistencia farmacológica a los esteroides y a la dexametasona; así mismo se ha sugerido que algunos de los polimorfismos en el Receptor de Glucocorticoide, podrían ser parcialmente responsables de dicho fenómeno (*Ito y col., 2006*).

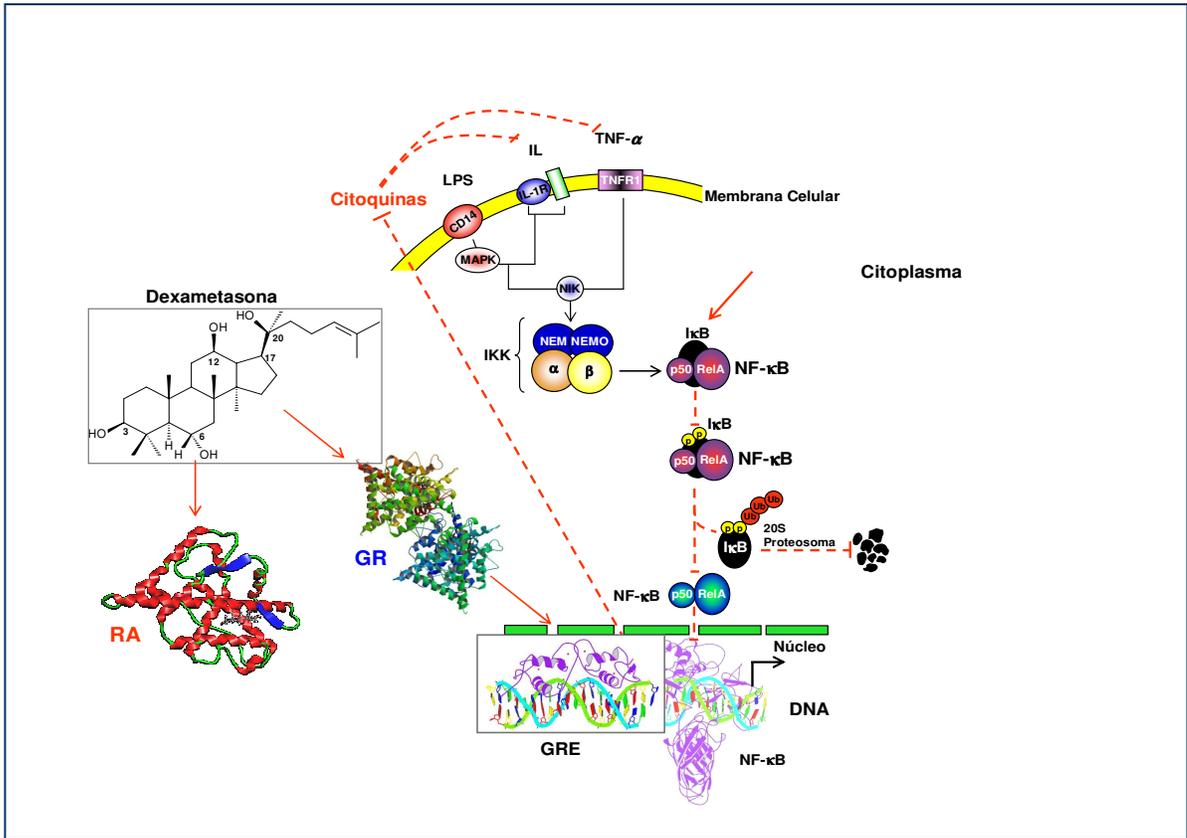


Figura 8: Actividad de los compuestos ginsenósidos y dexametasona sobre receptores celulares, y la actuación del complejo LPS-CD14 sobre la transcripción del factor NF-κB. Tomado y modificado de *Leung y col., 2006*.

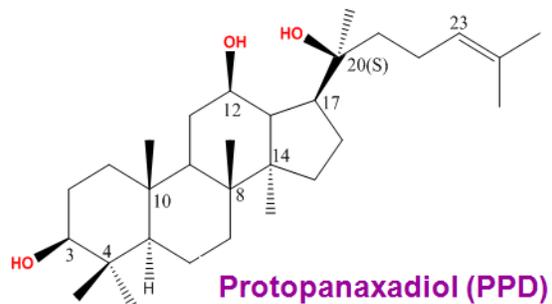
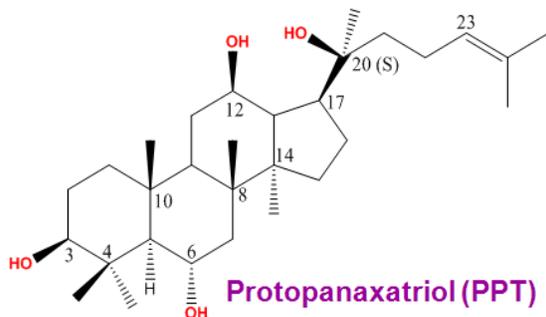
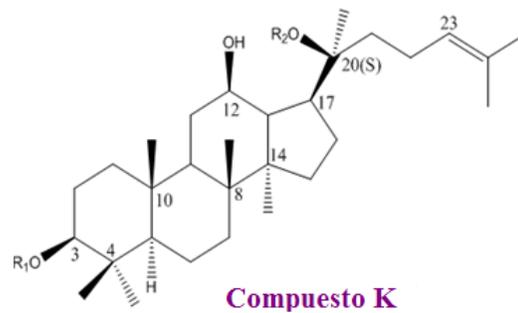
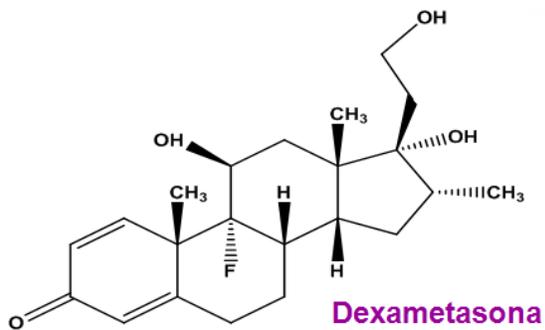


Figura 9: Estructura química de los compuestos a utilizar para evaluar la liberación o inhibición de $\text{TNF-}\alpha$ y radicales de oxígeno. Tomado y modificado de *Leung y col., 2006*.

2. JUSTIFICACIÓN

Conociendo el importante efecto social y económico del Asma y la EPOC en Venezuela, así como el escaso número de estudios centrados en evaluar la susceptibilidad genética, al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas o fenotipos relacionados en nuestro país; consideramos útil e interesante continuar la línea de investigación planteada en algunos trabajos mencionados, con respecto al estudio de polimorfismos en dos genes localizados en el brazo largo del cromosoma 5. Este es un estudio complejo, donde se busca definir cierta asociación entre la genética y los factores clínicos de los pacientes analizados, así mismo es un trabajo es controversial ya que actualmente se conoce, que el análisis clínico no se corresponde con algunos de los datos obtenidos a nivel genético y funcional, por otros investigadores en diversas poblaciones.

Es así como este trabajo forma parte de un análisis, donde se estudian diferentes polimorfismos en un grupo de pacientes con Asma y EPOC, así como en sujetos controles tanto en la población venezolana como colombiana. Este estudio se realiza con el objetivo de analizar este grupo de individuos desde el punto de vista genético y funcional, con el fin de aportar resultados que permitan impulsar tratamientos efectivos a condiciones patológicas de las vías respiratorias, en función de la constitución genética de cada paciente (estudios farmacogenéticos).

3. ANTECEDENTES

Bajo la línea de investigación que considera variantes polimórficas en genes codificantes de enzimas del metabolismo oxidativo, o mediadores de la respuesta inflamatoria como posibles determinantes de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades humanas inflamatorias crónicas en las vías aéreas; y analizando la misma data de pacientes con Asma y EPOC, y sujetos controles, provenientes del Hospital Universitario de Caracas- Venezuela, considerados en el material que se presenta, han sido objeto de estudio las variantes polimórficas de un conjunto de mediadores inflamatorios.

3.1- Gen del Receptor de Glucocorticoide

La localización cromosomal del gen del Receptor de Glucocorticoide fué descrito por primera vez por *Murray y col., 1987*, usando híbridos de células somáticas e hibridación *in situ*, identificándose en la posición 5q31.

Karin. 1998, indica que GRs activados por dexametasona reprimen un gran número de genes inflamatorios estimulados con el complejo p65/ factor 3 de respuesta a Interferón (IRF-3). *Wang y col., 2002*, reportan que el Receptor de Glucocorticoide en ausencia del ligando (hormona) puede ser fosforilado en conjunción con una unión agonista (droga capaz de unirse a un receptor para iniciar su acción) como la dexametasona. El complejo agonista-receptor activo produce una respuesta por medio de un efector o sistema de transducción, es por ello que la hormona dependiente de la fosforilación de GR, puede determinar la especificidad de promotores blancos, co-factor de interacción, tamaño y duración de la señalización del receptor, así como la estabilidad y la localización subcelular del receptor. Unido a ello y de acuerdo a los estudios realizados por *Hawrylowicz y col., 2002*, se conoció que las células CD14+ de pacientes con Asma

resistentes a glucocorticoides, son menos capaces de producir la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en respuesta a dexametasona, que aquellos pacientes con asma sensibles a glucocorticoides.

La identificación de variantes en el gen de GR puede ser útil para evaluar el rol de este gen en la susceptibilidad a enfermedades, o en la predisposición a corticosteroides asociados a reacciones adversas a drogas, así como la sensibilidad a glucocorticoides (*Fleury y col., 2003*). De acuerdo a lo planteado en el estudio de *Barnes y Adcock., 2003*; una de las razones para el fracaso en la respuesta de los pacientes con asma severa a pequeñas proporciones de glucocorticoides, es la presencia de resistencia a glucocorticoides, cuyos efectos terapéuticos son también reconocidos en otras enfermedades inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide y la enfermedad de inflamación intestinal.

Aunque son escasos los trabajos reportados acerca de EPOC, *Barnes y col., 2004* expresan que pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, muestran pequeña respuesta clínica a la terapia con glucocorticoides, ya que las células de dichos sujetos poseen respuestas atenuadas a glucocorticoides exógenos. El humo de cigarrillo, que es una de las principales causas de esta patología, es un elemento de stress oxidativo y puede afectar distintos aspectos de la función de esteroides, incluyendo traslocación nuclear del GR y efectos sobre co-factores nucleares.

Por su parte, (*Ito y col., 2006*) sugieren que diferentes variantes de empalme de GR, puedan afectar la sensibilidad de glucocorticoide alterando el control transcripcional de los genes que responden a glucocorticoide. Igualmente demostraron, que los corticosteroides tienen un potencial rol terapéutico en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de

los vasos preexistentes. A pesar de la habilidad de los glucocorticoides de suprimir la inflamación, del 5 al 10% de los pacientes con Asma no responden al tratamiento con glucocorticoides, por poseer resistencia al tratamiento.

Perttunen y col., 2006, estudiando la relación entre inflamación en las vías aéreas y la severidad de asma, encontraron un incremento en la cantidad de neutrófilos en el esputo inducido de sujetos con asma severa persistente, luego del tratamiento clínico de pacientes con Asma con β 2 adrenérgicos (salbutamol, formoterol), aumentándose la translocación del GR en respuesta a corticosteroides.

3.2- Polimorfismo +647 G>C en el gen del GR

El Polimorfismo *BclI* fue identificado específicamente por Southern blot con pruebas de cDNA de GR específicas, este polimorfismo se caracterizó por la presencia de dos alelos, con bandas de 4,5 kb y 2,3 kb respectivamente. En este estudio se reportó que la frecuencia en población Caucásica norteamericana oscila entre 0,55 para el alelo largo y 0,45 para el alelo corto.

A lo largo del tiempo distintas variantes y polimorfismos en el gen de GR han sido relacionadas con distintas etnias y diversas patologías, *Buemann y col.*, en el año 1997, confirman que el polimorfismo +647 G>C en el GR esta localizado +647 pb de el intrón 2, y se encuentra asociado con obesidad abdominal en individuos Caucásicos. Por su parte *Rosmond y col., 2000*, asociaron este polimorfismo en el gen del GR con sensibilidad tejido específica, así como a resistencia insulina y desarrollo de perfil aterogénico; igualmente indican que el alelo largo de este polimorfismo de 4,5 kb, es mas frecuente en grupos de individuos genéticamente predispuestos al desarrollo de hipertensión. Así mismo *Leung y*

col., 2003, indican que el asma y la atopia están ligadas a marcadores en el cromosoma 5q31 en población Caucásica, Japonesa y China de Singapur, además esta región contiene un grupo de genes que expresan citoquinas originadas de linfocitos tipo Th2, incluyendo IL-4 e IL-13, quienes juegan un rol importante en la regulación de la síntesis de IgE.

En un estudio realizado por *Fleury y col.*, 2003, con el ADN de individuos voluntarios de origen Asiático, Americano, Africano y Europeo, encontraron que del número de los individuos con los genotipos (CC, GC y GG) para este polimorfismo, la mayor frecuencia del alelo C fué encontrada en individuos de la población Asiática y la menor frecuencia de este alelo se obtuvo en individuos de origen Americano, mientras que la frecuencia del alelo C en sujetos de Europa fué similar a lo reportado por *Rosmond y col.*, 2000 para individuos de Suecia.

En consonancia con lo planteado anteriormente *Van Rossum y col.*, 2003, caracterizaron el *BclI*-RFLP en el gen del GR como la transversión G/C en el intrón 2, igualmente reportan que existe alteración de la sensibilidad a GCs de acuerdo al tejido, el alelo G de este polimorfismo fué considerado el alelo silvestre (mas común), con un porcentaje de aparición de 65 %, mientras que el alelo C apareció en 35 % de la población analizada. En un estudio con 1963 sujetos de 50 a 80 años, encontraron que la presencia de los genotipos de este polimorfismo, no depende ni de la edad ni del sexo de los individuos. Estos mismos autores demostraron que la presencia del alelo C de este polimorfismo, contribuye al transporte de bajos niveles de cortisol luego del tratamiento con dexametasona, sugiriendo que individuos con dicho alelo son más sensibles a la interacción negativa de glucocorticoides en el eje HPA, a partir de lo cual se concluyó que los

genotipos del polimorfismo en el Receptor de Glucocorticoide humano, actúan sobre la desregulación del eje HPA.

En la actualidad, no se conoce el mecanismo exacto a través del cual el polimorfismo *BclI* ejerce sus efectos, además no hay función obvia en la transformación de los recursos genéticos pre-ARNm. Es posible que este polimorfismo este vinculado con variaciones en la región promotora (aumento de la expresión), o en la región 3' UTR (aumento de la estabilidad) del gen de GR. Además este gen puede jugar un papel directo en la sensibilidad del eje HPA. Así mismo se conoce que la sensibilidad de los GCs a nivel local pueden verse influenciados por las citoquinas, lo cual ha sido reportado en asma. Además, los 7 empalmes alternativos que presenta este gen podrían desempeñar un rol importante sobre la expresión de proteínas, sin embargo, el sitio *BclI* de este polimorfismo no se encuentra en las proximidades de una secuencia que participe en procesos de empalme, igualmente se propone que el polimorfismo *BclI*, podría encontrarse en desequilibrio de unión con otro, lo que pudiera interferir sobre el efecto que tiene la presencia del polimorfismo solo.

El rol de los alelos del polimorfismo +647 G>C en el gen del GR en la sensibilidad a glucocorticoides sugiere que puede intervenir en la Artritis Reumatoide (RA), sin embargo no fué comprobado su papel en pacientes de Corea con esta patología. (*Lee y col., 2005*). Por su parte *Corvol y col., 2007*, analizaron en individuos con Fibrosis Cística (CF), los cambios en los parámetros respiratorios: Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV₁) y Capacidad Vital Forzada (FVC) de acuerdo a los genotipos del polimorfismo en el gen del GR, encontrando deterioro en FEV₁ en el grupo de pacientes con el genotipo (GG), comparado con el grupo de pacientes con los genotipos (GC y CC)

respectivamente. Del mismo modo, encontraron que FVC declina de forma más severa en los pacientes con el genotipo (GG), con relación a los otros dos genotipos, estas observaciones son consistentes con el efecto del polimorfismo en el gen del GR, en el control de la respuesta inflamatoria del pulmón en CF.

Por otro lado *DeRijk y De Kloet., 2008*, trabajando con dicho polimorfismo como determinante de vulnerabilidad, indican que la región 5q31-32 en donde se encuentra localizado el receptor de glucocorticoide, está asociado con desordenes inmunes como la enfermedad de Chron, enfermedad celíaca y asma. Estos mismos autores, sugieren que existen evidencias que el gen del GR incrementa el riesgo de enfermedades relacionadas con stress metabólico, y las variantes en dicho gen, son parte de la composición genética que determina la forma y vulnerabilidad de la enfermedad.

3.3- Gen de CD14 y el Polimorfismo -159 C>T en la región promotora del gen de CD14

El gen de CD14 fué definido por *Goyert y col., 1988*, en su estudio con monocitos como un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en la posición 31.3 (5q31.3). Posteriormente *Baldini y col., 1999*, describieron por primera vez el polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14 con 481 niños de 11 años, e indicaron que se encontraba asociado con variaciones en la expresión de la proteína de CD14, y mas incrementado en pacientes con Asma luego de la inhalación de LPS. Además se pudo comprobar que los niveles de sCD14 están directamente correlacionados con respuestas (IFN)- γ , e inversamente relacionados con respuestas IL-4. Los individuos heterocigotos (CT) para este polimorfismo, poseen menores niveles de IgE cuando son comparados con los homocigotos (CC), quienes tienen bajos niveles de sCD14 circulando, sugiriéndose la dominancia

(mayor frecuencia) del alelo C de este polimorfismo en los individuos presentes en el estudio.

En un estudio realizado por *Woo y col., 2003* con 128 adultos con atópia, 77 con alergia alimentaria, 47 sin atópia y 64 controles, sugieren que este polimorfismo en el gen de CD14 actúa como marcador de severidad o modificador de enfermedades como alergia. Así mismo se encontró, que individuos portadores del genotipo (CC) para el polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, parecían estar protegidos en contra el desarrollo de asma no atópica pero no contra alergia alimentaria, es decir, la frecuencia del genotipo (CC) fué menor en el grupo de pacientes con asma no atópica que en el grupo de alergia alimentaria. En contraste, el genotipo (TT) para este mismo polimorfismo, presentó diferencias significativas en ambas condiciones: alergia alimentaria y asma no atópica $p < 0,05$. Al estudiar la asociación entre este genotipo del polimorfismo en el gen de CD14, y la severidad de asma en una pequeña población blanca de América no se encontró ninguna diferencia significativa. De igual forma se conoció que alelo T presente en este polimorfismo, resulta en aproximadamente 32 % de incremento en la actividad transcripcional del promotor, cuando es comparada con el alelo C, y los mecanismos para dicha asociación son relatados por interacciones en factores transcripcionales de unión a esta región (*Woo y col., 2003*).

La relevancia funcional del polimorfismo -159 C>T ha sido sugerida en distintos estudios, entre ellos el de *Meiler y col., 2005*, quienes encontraron cierta asociación con infarto de miocardio, colitis ulcerosa, asma, así como relación entre los niveles de sCD14 y la sensibilidad a insulina; así mismo reportan que, existe alta prevalencia de este

polimorfismo en el promotor de CD14 en pacientes con avanzada enfermedad alcohólica, modificando los niveles de IgE en suero.

Choudhry y col., 2005 en su trabajo con individuos de México y Puerto Rico, mostraron que en sujetos expuestos al humo de cigarrillo, existe asociación significativa entre este polimorfismo en el gen de CD14 y una medida cuantitativa de severidad de asma (pre- FEV₁) $p=0,007$. En un estudio combinado con sujetos con Asma de ambos países, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de pre- FEV₁ en los individuos con el genotipo (CC), aún cuando se expusieron en ambientes con humo de cigarrillo, cuyas siglas en inglés son: *Environmental Tobacco Smoke* (ETS). Analizaron también la asociación entre los niveles de IgE y la interacción (Genotipo* ETS), esta asociación sólo fué significativa entre los individuos de Puerto Rico, pero no presentó significancia en la población de México. Al mismo tiempo encontraron que los individuos con el genotipo (TT) expuestos a ETS, tienen significativamente menores niveles de IgE al comparados con los otros genotipos (CC y CT) de dicho polimorfismo. Estudios de asociación realizados por estos investigadores, indican que en latinos existe interacción entre: los niveles de IgE en plasma, los genotipos para el SNP -159 y ETS. Sugiriéndose una relación compleja entre CD14 y la severidad del asma, lo cual, fué verificado, por el decrecimiento de la función pulmonar y bajos niveles de IgE entre individuos de México y Puerto Rico con asma y con los genotipos para este polimorfismo.

En consonancia, *Kedda y col., 2005* estudiando individuos blancos entre 8-25 años procedentes de Australia, demostraron que aquellos sujetos que poseen el genotipo (CC) de este polimorfismo en el gen de CD14 probablemente desarrollan atópia temprana, sugiriéndose la influencia de los genotipos de dicho polimorfismo con atópia edad

específica. *Leynaert y col., 2006* encontraron, en sujetos con exposición al campo en las primeras etapas de vida, riesgo de alergias nasales y atópica mas reducida en sujetos que tienen el genotipo (TT) para este polimorfismo. *Martínez. 2007*, analizando una comunidad urbana de Tucson Arizona observó que sujetos que poseen el genotipo (TT), pueden ser menos vulnerables al desarrollo de respuestas alérgicas porque tienen alta expresión de CD14, que aquellos individuos con los genotipos (CT y CC) para este polimorfismo.

Kowal y col., 2008 reportan, que en individuos con asma y con alergia al polvo casero *House Dust Mite* (HDM), encontraron una mayor prevalencia del alelo C del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14 en niños con asma atópica en una población de la India, y el alelo T en una población de Barbados con la baja severidad de asma. Estos autores sugieren que la pérdida de asociación entre este polimorfismo y el fenotipo de asma, puede ser explicada por la heterogeneidad de la población estudiada, incluyendo diferentes proporciones de pacientes con asma atópicos, historia de fumador y diferentes exposiciones ambientales a LPS.

Diferencias étnicas, pueden contribuir a variaciones en la frecuencia de alelos de fenotipos asociados a genes humanos. En un estudio realizado por *Zhang y col., 2008*, donde se analizaron individuos de origen Africano, Caucásico, Asiático y Europeo, se obtuvo que el patrón de frecuencia del alelo C para el polimorfismo -159 C>T fué mayor en individuos de raza Africana, seguido por la poblaciones Caucásica y Asiática. Además observaron que en sujetos Africanos con el alelo C, existe mayor prevalencia de asma comparado con individuos de origen Caucásico con este mismo alelo; sugieren que pueda existir desequilibrio de unión entre SNP-159 C>T con uno o mas SNPs en la región promotora o en otras regiones del gen de CD14. Lo que concuerda con lo expuesto por

LeVan y col., 2005 quienes expresan, que de los 7 polimorfismos que se hallan próximos a la región promotora del gen de CD14, el polimorfismo -159 C>T ha sido reportado que presenta desequilibrio de unión con otros SNPs, lo cual podría ser explicado por efecto de combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos (haplotipos).

Por otra parte, resultados obtenidos por *Zhang y col., 2008* en un estudio realizado en Alemania, indican que existe tendencia de elevados niveles de sCD14 en niños y adultos de (Munich, Dresden y Giessen) que poseen el genotipo (TT) para este polimorfismo; mientras que individuos de raza Caucásica que presentan este mismo genotipo, poseen bajos niveles de sCD14 al compararlos con el genotipo (CC).

4. HIPÓTESIS

La respuesta inflamatoria en pacientes con Asma o EPOC, depende de la presencia de los polimorfismos +647 G>C en el gen del GR y -159 C>T en la región promotora del gen de CD14, de la magnitud de la activación de macrófagos vía CD14, y de la señal anti-inflamatoria del Receptor de Glucocorticoide.

5. OBJETIVOS

5.1- Objetivo general:

Estudiar los polimorfismos: +647 G>C en el gen del Receptor de Glucocorticoide y -159 C>T en el gen de CD14, en un grupo de pacientes con Asma y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, su relación con la severidad de ambas patologías y la posible vía de activación de celular.

5.2- Objetivos específicos:

- ❖ Determinar el polimorfismo +647 G>C en el gen del Receptor Glucocorticoide en un grupo de pacientes con Asma, EPOC y controles.
- ❖ Analizar el polimorfismo -159 C>T en la región promotora del gen de CD14, en una población con Asma y EPOC, así como en los sujetos controles.
- ❖ Corroborar la relación de los polimorfismos +647 G>C en el gen del GR y -159 C>T en el gen de CD14, con el desarrollo y severidad de Asma y EPOC.
- ❖ Evaluar la función del receptor LPS-CD14-TLR-4 en ensayos biológicos *in vitro* de activación celular, mediante la detección de radicales de oxígeno y la producción de TNF- α .

- ❖ Estudiar la función del Receptor de Glucocorticoide en ensayos biológicos *in vitro* de activación celular, mediante la inhibición inducida por LPS, de TNF- α y O₂⁻.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1- Población de Estudio

- Consistió en un grupo de 200 pacientes mayores a 12 años y de ambos sexos: 100 pacientes con Asma y 100 pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, definidos según criterios clínicos y espirométricos propuestos por GINA. 2006 para Asma y ATS. 2004 para EPOC.

- Dichos pacientes asistieron a la Consulta de Neumonología del Hospital Clínico Universitario (HUC) “Luis Razetti” de la Universidad Central de Venezuela, y decidieron de forma voluntaria y con previo consentimiento informado autorizado por el comité de Bioética del Instituto de Inmunología, participar en el proyecto de investigación “*Farmacogenética de Medicamentos y Productos Naturales en Enfermedades Humanas Crónicas*”.

- A cada uno de los pacientes se le realizaron pruebas de función pulmonar (Espirometría), con medición del Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (VEF₁) y Capacidad Vital Forzada (CVF), por el personal médico calificado del HUC.

6.2- Criterios usados para la exclusión de los pacientes del presente proyecto de investigación

La sospecha de embarazo, la presencia de alguna enfermedad con desgaste metabólico (VIH, autoinmunidad, neuropatía, cáncer), el uso de anabolizantes y/o drogas para reducir peso, la inestabilidad desde el punto de vista respiratorio, y pacientes con otro tipo de enfermedades pleuropulmonares.

El grupo de sujetos **CONTROLES** estuvo constituido por: 100 individuos con previo consentimiento informado por escrito. Estos sujetos debieron ser no fumadores, sin enfermedades respiratorias y/o antecedentes de patologías respiratorias, con espirometría normal y sin enfermedades pleuropulmonares.

6.3- Detección de polimorfismos en un grupo de pacientes con Asma, EPOC y sujetos controles

6.3.1- Obtención de ADN genómico

Las muestras de sangre de la población en estudio fueron obtenidas por el personal calificado del HUC, a través de venipunción de sangre periférica en tubos con el agente quelante (EDTA) Ácido Etilendiamino tetraacético. Partiendo de las muestras de sangre completa, se realizó una centrifugación a 2500 g por 10 min a temperatura ambiente y se obtuvo la capa de blancos o “Buffy coat”, que es una fracción enriquecida de leucocitos con densidad heterogénea. Luego de dicha centrifugación se distinguieron 3 fracciones: en la fase superior se halla el plasma, en la fase intermedia la capa de blancos y en la fase inferior los glóbulos rojos. Para aislar la capa de blancos se retiró cuidadosamente la capa de plasma y luego la capa de leucocitos usando una pipeta Pasteur. Partiendo de 200 µl de la capa de blancos, el ADN se aisló empleando el estuche comercial QIAamp Blood MiniKit (QIAGEN[®], Hilden, Germany), que comprende tratamiento con buffer de lisis y proteinasa K (10 mg/mL) para la fragmentación celular. La purificación de los ácidos Nucléicos se logró mediante cromatografía de intercambio iónico, en función de la capacidad del ADN de ser adherido a la membrana de sílica gel por el intercambiador DEAE (Dietilaminoetanol), que lleva grupos cargados positivamente. El ADN fué eluído

con un buffer con baja fuerza iónica y ligeramente alcalino (10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; pH: 9.0).

6.3.2- Extracción de ADN (QIAamp DNA mini Kit)

El método de extracción de ADN y la secuencia de pasos seguida, se realizó según especificaciones de la casa comercial QIAGEN, el cual consta de 4 etapas: lisis, unión o ligamiento, lavado y elución. Para la extracción del ADN partiendo de 200 μ L de la capa de blancos se agregaron 20 μ L de Proteinasa K en tubos eppendorf de 1,5 mL, ésta fue mezclada en vórtex (Thermolyne, modelo 37 600 Mixer) y se realizó una centrifugación durante 10 seg a 6000 g. Posteriormente se agregaron 200 μ L del buffer de lisis (AL) y se agitó el contenido del tubo con un pulso de 15 seg en vórtex, y se incubó a 56 °C durante 35 min en bloque de calentamiento. Trascurrido el tiempo de incubación, la mezcla fue nuevamente agitada por un pulso de 10 seg en vórtex y centrifugada durante 10 seg a 6000 g, para remover las gotas formadas en el interior de la tapa durante la incubación; luego se le agregó 200 μ L de etanol al 100 % para precipitar los ácidos nucleicos restantes de la solución, ya que estos son insolubles en alcohol, la mezcla fue homogenizada en vórtex durante 15 seg y centrifugada a 6000 g durante 10 seg.

Posterior al proceso de preparación de la muestra se colocó el volumen de cada eppendorf en las columnas que provee el estuche comercial, donde las muestras fueron centrifugadas a 6000 g durante 1 min, el filtrado fue descartado y se cambió el tubo de recolección de filtrados. Luego las columnas fueron lavadas con 500 μ L de buffer AW1 y se realizó una centrifugación a 6000 g por 1 min, se descartó el filtrado y se colocó un tubo de recolección nuevo, y las columnas se lavaron con 500 μ L de buffer AW2 con una

centrifugación de 20000 g durante 3 min. El ADN unido a la membrana fué lavado con dos buffers, en dos centrifugaciones crecientes (6000 g y 20000 g) para mejorar la pureza del ADN, ya que las condiciones de lavado remueven cualquier residuo de contaminación que este afectando al material genético de interés.

Se descartó el filtrado y las columnas con el ADN purificado, fueron transferidas a eppendorf limpios para la posterior elución con 200 μ L de buffer AE, se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 2 min y finalmente se realizó una centrifugación a 6000 g por 1 min, se descartaron las columnas y el ADN aislado quedó en cada eppendorf. El ADN eluído fué colocado a 37 °C durante 15 min, luego fué almacenado y mantenido hasta su uso a -20 °C. Una vez que el ADN fué extraído se debió comprobar que no se encontraba degradado, así como verificar su concentración y grado de pureza, para ello se realizó una medición de Densidad Óptica (D.O) a 260/280 nm por espectrofotometría.

6.4- Amplificación y análisis de los fragmentos de interés

A partir del ADN aislado para los 200 pacientes y 100 controles, se realizó el estudio de los polimorfismos: +647 G>C en el gen del receptor de Glucocorticoide y -159 C>T en la región promotora del gen de CD14. Este estudio se llevó a cabo mediante amplificación de fragmentos específicos de ADN por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), empleando un termociclador PTC200 Peltier Termal Cyler (MJ Research), para la identificación de las secuencias polimórficas se realizó el análisis de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), para lo cual los amplificados de PCR se trataron con una enzima de restricción específica, y los productos de la digestión enzimática fueron verificados con electroforesis en geles de agarosa al 3%, de manera que

se lograra una resolución entre 2 pb y 2 kb aproximadamente. La visualización de los fragmentos de ADN se realizó en un transiluminador de UV (Digit doc[®]) previo tratamiento del gel con solución de Bromuro de Etidio (concentración 1/20000), el programa de visualización instalado en el procesador fué Kodak 1D[®].

6.4.1- Polimorfismo en el gen del Receptor de Glucocorticoide (GR)

El análisis de los genotipos del polimorfismo +647 G>C en el gen del GR se llevó a cabo de acuerdo al protocolo reportado por *Fleury y col 2003*. Las secuencias específicas de los iniciadores, que se emplearon en la amplificación de las secuencias correspondientes, como la concentración de cada uno de los reactivos para la preparación de la mezcla de reacción, así como los parámetros para la amplificación por PCR son detallados en la Tabla II. El control negativo para todos los casos de amplificación consistió en la sustitución del ADN en la mezcla de reacción por agua libre de nucleasas. El análisis RFLP para el polimorfismo SNP +647 pb en el gen del Receptor de Glucocorticoide, se realizó con 10 µL del amplificado de PCR de GR de 206 pb, digerido con 4 UI de la enzima *Bcl I* (*New England BIOLABS, N° R0160S*).

6.4.2- Polimorfismo en el gen de CD14

Para el estudio del gen de CD14, se analizó el polimorfismo de nucleótido simple -159 C>T en la región promotora de dicho gen, usando la enzima de restricción *Ava II* (*New England BIOLABS, N° R0153S*). Las condiciones iniciales empleadas para detectar este polimorfismo fueron reportadas por *Kowal y col., 2008*, pero fué necesario incorporar

modificaciones en la concentración de $MgCl_2$ y en la temperatura de hibridación, con la finalidad de obtener un producto libre de inespecificidades por PCR.

El análisis de restricción se realizó con 10 μL del amplificado por PCR del gen de CD14 de 497 pb aproximadamente, el cual fué digerido con 5 UI de la enzima *Ava II*, esta endonucleasa reconoce la secuencia de restricción GGTTCC, presente solo en el ADN amplificado que contiene el alelo T. (*Kedda y col., 2005*). Las condiciones de restricción enzimática y las cantidades de los componentes utilizados se encuentran especificadas en la Tabla II.

Adicionalmente se empleó el análisis de secuencias previa amplificación por PCR en algunos pacientes heterocigotos, y en algunos pacientes donde se evidenció una posible digestión incompleta de los fragmentos de ADN de interés, para la detección de las variantes genotípicas correctas de ambos polimorfismos. Este proceso se realizó con un total de 10 productos de PCR para +647 G>C en el gen del GR y 10 productos de PCR para -159 C>T en el gen del CD14, los fueron enviados al **Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucléicos (CeSAAN)** del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). El método empleado para la secuenciación y análisis de ácidos nucleicos en CeSAAN se fundamenta en el marcaje del ADN con cuatro fluoróforos, de manera que cada nucleótido tiene un color diferente, empleando un secuenciador de ácidos nucleicos de la compañía Applied Biosystems modelo ABI 3130XL (*On line*, www.appliedbiosystems.com).

Los electroferogramas fueron editados empleando el software DNA for windows, y el alineamiento de las secuencias sentidos y antisentidos se realizó empleando el software DNAMAN versión demo (disponible en <http://www.Lynnon.com/pc/frameoa.html>) con el

objetivo de obtener las secuencias consenso, y por último se realizó la comparación de la secuencia consenso con la base de datos del NCBI (de las siglas en inglés *Nacional Center for Biotechnology Information*), mediante el empleo de BLAST (*Basic local Alignment Search Tool*).

Tabla II. Condiciones para la mezcla de PCR, para la restricción enzimática, así como para la corrida electroforética, para el gen del GR y para el gen de CD14

Condiciones	GR	CD14
Mezcla de reacción (volumen final 50 μ L)	dNTps: a 200 μ M c/u, 2,5 mM de $MgCl_2$. 2,5 pmol de c/primer, 100 ng de ADN, 0,5 UI de Taq polimerasa	dNTps: a 200 μ M c/u, 1,75 mM de $MgCl_2$. 2,5 pmol de c/primer, 100 ng de ADN, 0,5 UI de Taq polimerasa
PCR	Des. Inicial: 94 °C x 5 min. 40 ciclos: 94 °C por 30 seg 59 °C por 30 seg 72 °C por 45seg Ext. Final 72 °C por 7 min	Des. Inicial: 94 °C x 4 min. 30 ciclos: 94 °C por 30 seg 51 °C por 30 seg 72 °C por 30 seg Ext. Final 72°C por 5 min
Secuencias iniciadoras	F:5'-AAATTGAAGCTTAACAATTTGGC-3' R: 5'-GCAGTGAACAGTGTACCAGACC-3'	F:5'-GTGCCAACAGATGAGGTTAC-3' R:5'GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-3
RFLP	10 μ L de amplificado por PCR tratado con 4 U de <i>Bcl I</i> durante 6 horas a 50°C	10 μ L de amplificado por PCR tratado con 5 U de <i>Ava II</i> durante 3 horas a 37°C
Electroforesis	Gel de Agarosa al 3% 100 voltios	Gel de Agarosa al 3% 100 voltios
Referencia	Fleury y col., 2003	Kowal y col., 2008 (modificado)

6.5- Ensayos funcionales para la evaluación de TNF- α y O₂⁻

Con la finalidad de establecer, la relación entre los diferentes genotipos de los polimorfismos en los individuos analizados y el efecto funcional del GR y CD14, se usaron compuestos como la dexametasona y los ginsenósidos, para verificar el aumento o inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno y la citocina TNF- α , para ello se procedió a realizar una serie de metodologías descritas a continuación.

6.5.1- Aislamiento de Leucocitos Humanos Totales

Para ello se partió de 2 mL de sangre previamente heparinizada (10 UI/ml), a la cual se le agregaron 48 mL de solución de lisis (cloruro de amonio-EDTA), se mezclaron los tubos vigorosamente durante 10 min y luego fueron centrifugados a 4 °C durante 10 min a 100 g dos veces, el botón celular fué resuspendido con buffer fosfato salino (PBS)- gelatina y se realizó una centrifugación a 80 g durante 10 min. Concluido este paso se resuspendieron las células en PBS-gel, y se realizó el contaje en la cámara de Neubauer con 20 μ L de suspensión celular y 20 μ L azul de tripano, y se ajustaron los leucocitos en PBS-gel de acuerdo al ensayo a realizar: NBT, Capacidad Oxidativa o ELISA.

6.5.2- Detección de radicales de oxígeno

Para estudiar la función tanto del receptor de glucocorticoide, como del complejo LPS-CD14-TLR-4 de las células analizadas, se detectó la variación en la producción de anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para cuantificar el anión O₂⁻, se utilizó el ensayo de reducción Azul de Nitro-Tetrazolio (NBT) de células mononucleares estimuladas con LPS, de acuerdo al protocolo propuesto por *Franchimont y col., 2009*. Para ello se colocaron 20 μ L de H₂O con 20 μ L de los tratamientos con los ginsenósidos y la dexametasona en las placas de 96 pozos, se dispensó la suspensión de leucocitos

previamente ajustada a 250.000 cel/pozo, y se dejaron incubando durante 30 min a 37 °C en atmósfera de (5 % CO₂). Trascurrido el tiempo, se trataron las placas con 50 µL de los reactivos NBT (0,75 mg/mL) y Forbol Miristato Acetato (PMA) (100 ng/mL concentración final). El contenido de cada condición evaluada se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Componentes de cada condición usada para el ensayo de NBT

Condición	Componentes
Blanco	H ₂ O, medio PBS, PMA-NBT
No estimuladas	H ₂ O, Células, PMA-H ₂ O
Estimuladas	H ₂ O, Células, PMA-NBT
Experimental	H ₂ O, Células, Compuestos, PMA-NBT

Luego de colocar los reactivos correspondientes, las placas fueron incubadas a 37 °C (5% CO₂) durante 1 h, luego fueron centrifugadas a 144 g por 5 min a 4 °C realizándose 3 lavados: dos con PBS-gel y uno con metanol puro para eliminar el NBT no reducido, posteriormente las placas se secaron al aire. Se adicionaron 10,8 mL de KOH 2N para lisar las membranas celulares y 19,2 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 64 % para disolver los cristales obtenidos, las placas fueron agitadas durante 10 min y se leyeron a una longitud de onda de 620 nm en un lector de ELISA.

Es importante recalcar que el ensayo mide la generación del ión superóxido en una mezcla celular leucocitaria. Para ensayos más específicos de definición de la magnitud de respuesta por tipo celular, se utilizó el ensayo por citometría de flujo.

6.5.3- Determinación de la viabilidad Celular

Se realizó a través de la Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas extra mitocondriales

(principalmente), por mecanismos dependientes de NADH y NADPH, con lo cual es posible examinar la cantidad de células metabólicamente activas. Esta metodología se realizó en placas con 180 μL de los leucocitos mas 20 μL de los tratamientos con los ginsenósidos y la dexametasona, se dejaron incubando 30 min a 37 °C (5% CO_2), posteriormente se adicionaron 50 μL de MTT (0.5 mg/mL) y las placas se dejaron incubando durante 4 h a 37 °C (5% CO_2). Éstas fueron luego centrifugadas dos veces a 144 g por 10 min a 4 °C, y una vez extraído todo el sobrenadante se adicionaron 200 μL de DMSO a cada pozo, las placas fueron agitadas durante 10 min y se leyeron a una D.O de 540 nm, posteriormente se calcularon los IC50 mediante regresión no lineal. IC50 (concentración a la cual se alcanza el 50% del efecto).

6.5.4- Determinación de la producción de H_2O_2 por citometría de flujo

Partiendo de las células mononucleares humanas totales aisladas y ajustadas a una concentración de 1.111.111 cel /mL, se colocaron 50 μL de los compuestos (dexametasona y ginsenósidos) en tubos de Citometría y se mezclaron con 450 μL de las células mononucleares, y fueron incubadas a 37 °C en baño de María durante 30 min. Posteriormente se le agregó a cada tubo 20 μL del colorante 2',7'-dichlorofluorescein diacetato (DCF-DA) (520 μM) y se incubaron a 37 °C en oscuridad por 10 min, transcurrido el tiempo las células fueron estimuladas con 20 μL de PMA (2700 ng/mL), e incubadas 15 min a 37 °C en baño de María. Las condiciones evaluadas en el experimento se muestran en la tabla IV.

Tabla IV: Condiciones analizadas en el ensayo de Capacidad Oxidativa de Leucocitos Humanas Totales

Condición	Componentes
Estimuladas	Células, colorante, PMA
No estimuladas	Células, colorante, PBS-gel
No marcadas	Células, PBS-gel, PMA
Experimental	Células, colorante, PMA, compuestos

Luego de transcurrida la incubación con PMA la reacción fué detenida colocando los tubos en hielo, estos luego fueron leídos con láser de 488 nm en citómetro de flujo, usando el marcador de fluorescencia verde FITC a 525 nm. El citómetro de flujo es útil para distinguir células individuales por tamaño, granularidad y positiva o negativa expresión de diferentes receptores, usando fluorocromos conjugados a anticuerpos que reconocen las proteínas de interés, expresadas en receptores en la superficie de células o la expresión de proteínas intracelulares en células permeabilizadas. (Du y col., 2009).

6.5.5- Detección de la producción de TNF- α

La detección cualitativa de la citocina TNF- α se llevó a cabo empleando el ensayo de ELISA tipo Sándwich, de sus siglas en Inglés “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”. Para este ensayo se usó el Kit duo set casa comercial R&D systems, en donde se cubrieron las placas de 96 pozos Immunolon II con 50 μ L por pozo del anticuerpo de captura de ratón anti-TNF- α humano, se dejaron las placas incubando durante 12 horas a 4° C a temperatura ambiente (ta). Posteriormente se realizaron tres lavados de los pozos con buffer de lavado (PBS/ tween 20 0,1%), posteriormente se añadió el buffer de bloqueo (200 μ L PBS/0,1% de tween 20/ BSA 1%), se incubó por 1 h a (ta) y se realizaron nuevamente tres lavados con buffer (PBS/ tween 20 0,1%). Las muestras de los pacientes fueron colocadas

en las placas y se dejaron incubando durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces los pozos con buffer de lavado. Luego se añadieron 50 μL del anticuerpo de detección de cabra anti-TNF- α humano biotinilado y se incubaron las placas a (ta) durante 1 h, seguidamente se añadieron 100 μL de la dilución de Estreptavidina- Peroxidasa de rábano picante (HRP), se dejaron las placas incubando por 30 min a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con (PBS/0,1% de tween 20). Finalmente se añadieron 100 μL del sustrato mezcla 1:1 del color Reactivo A (H_2O_2) y el color del reactivo B (Tetrametilbenzidina) (R & D Systems catálogo DY999); luego las placas fueron incubadas en la oscuridad aproximadamente 20 min y se leyeron a 540 nm. Se utilizó una curva patrón para determinar los niveles de TNF α en los sobrenadantes de las células tratadas.

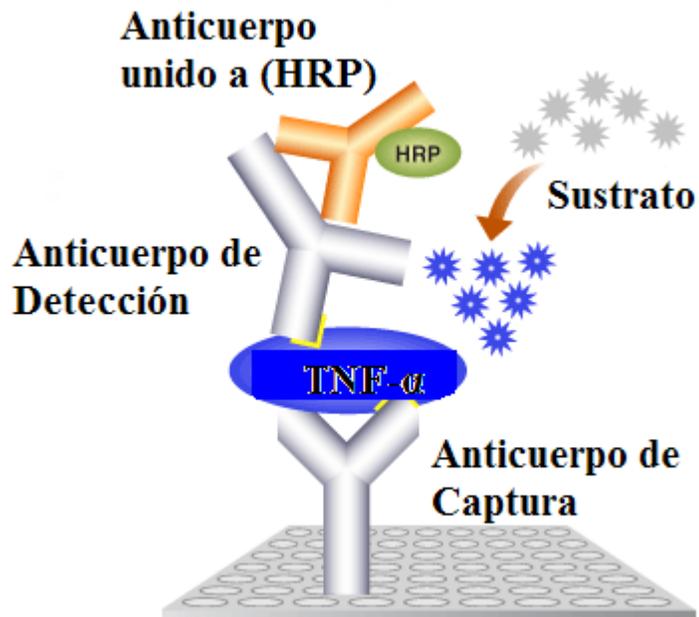


Figura 10. Diagrama del método de detección de la citocina inflamatoria TNF- α por ELISA Tipo Sándwich. Tomado y modificado de <http://www.elisa-assay.com/ch5.html>

6.6.- Análisis Estadístico

Para estudiar la contribución de los genotipos de los dos polimorfismos analizados en este trabajo, y medir la asociación entre las variables y el desarrollo o grado de severidad de Asma y EPOC, se usaron tablas de contingencia con prueba Chi-cuadrada (χ^2), empleando el programa SPSS 14.0 (Versión Estudiantil).

La clasificación de un conjunto de entidades de acuerdo a dos criterios, se presenta en una tabla en la que los r renglones representan los diversos niveles de uno de los criterios de clasificación, y las c columnas representan los niveles del segundo criterio, dicha tabla se conoce generalmente como tabla de contingencia. El uso mas frecuente de esta tabla es en la distribución Chi-cuadrada, en donde se busca probar la hipótesis de que, los dos criterios de clasificación son independientes o no cuando se aplican al mismo conjunto de entidades. Se dice que dos criterios son independientes si la distribución de un criterio es la misma, sin importar la distribución del otro; los grados de libertad de dicha distribución serán igual a $(r-1)(c-1)$, el valor de p se considera significativo cuando adquiere valores inferiores a 0,05 y no significativo para valores superiores (Wayne., 1998).

7. RESULTADOS

La detección de secuencias polimórficas para el gen del Receptor de Glucocorticoide y para el gen de CD14 considerados en este estudio, se realizó en un grupo de 200 sujetos con enfermedades respiratorias: 100 pacientes con Asma, 100 pacientes con EPOC y 100 sujetos controles sin antecedentes de enfermedades respiratorias. Las características de la población consideradas se resumen en la tabla V, en la cual se muestran los valores de la media y desviación estándar de la distribución por sexo, media etaria, el promedio de paquetes de cigarrillos consumidos por año y el porcentaje predicho para VEF_1 para cada grupo de estudio.

En la tabla V se observa que la edad media de los sujetos con EPOC fué mayor que en los grupos Asma y Control, siendo de $62,3 \pm 10$ años con respecto a $41,7 \pm 14$ y $39,3 \pm 14$ años respectivamente, así mismo se notó que la diferencia entre sujetos femeninos y masculinos fué mayor en los grupos Asma y Control. Con respecto al parámetro respiratorio VEF_1 , se encontraron diferencias significativas de los dos grupos de pacientes con respecto en el grupo control ($p < 0,001$). En paralelo, se observa como el número de paquetes de cigarrillos consumidos por año entre los pacientes presentó diferencias significativas (Asma $p < 0,05$ y EPOC $p < 0,001$).

Además se encontró en la mayor parte de los pacientes estudiados, que los individuos fueron no hipoglicémicos, no anti-hipertensivos, no se reportó el uso de antibióticos, de esteroides sistémicos ni inhalados, así como de broncodilatadores. Los pacientes con Asma mayormente fueron (no fumadores o ex fumadores), el grupo EPOC se encontró representado por (ex fumadores y fumadores), mientras que los individuos controles fueron no fumadores.

Tabla V: Media etaria, sexo y paquetes de cigarrillos inhalados por año, para los grupos Asma, EPOC y Control.

	Asma	EPOC	Controles
N° de sujetos	100	100	100
Edad (años)	41,7 ±14	62,3±10	39,3±14
Mujer/Hombre	79/21	54/46	78/22
VEF ₁ % pred	65,4±18	51,7±24	107,4±15
Paquetes/años	2,1±6	35,2±27	*

VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo. CVF: capacidad vital forzada. Pred: Predicho. Paquetes/ año: paquetes de cigarrillos inhalados por año *: No se reportó dicho valor en estos sujetos. Datos expresados como medias ± desviación estándar.

7.1- Variantes genóticas del polimorfismo *BclI* en la longitud de los fragmentos de restricción, en amplificadas por PCR del gen del Receptor de Glucocorticoide

La figura 11 representa la separación electroforética de los amplificados por PCR para el gen del GR en muestras de sujetos con Asma. El amplificado por PCR de 206 pb fué tratado con 5 UI de la enzima *BclI*, para la identificación de los diferentes genotipos; la presencia del alelo C crea el sitio corte para la enzima. La identificación de los genotipos del polimorfismo +647 G>C en el gen del GR se realizó en función al patrón de restricción; genotipos homocigotos para el alelo G fueron caracterizados por una banda de 206 pb, el genotipo homocigoto (CC) de dicho polimorfismo fué identificado por la presencia de una banda de 90 pb y una de 116 pb, y los individuos heterocigotos (GC) se identificaron en el gel de agarosa con tres bandas, una de 206 pb, una de 116 pb y otra de 90 pb.

En los carriles 7 y 8 se observa que hubo una digestión incompleta de los ADN aislados, por ello estos pacientes fueron enviados a secuenciar y así verificar su genotipo particular.

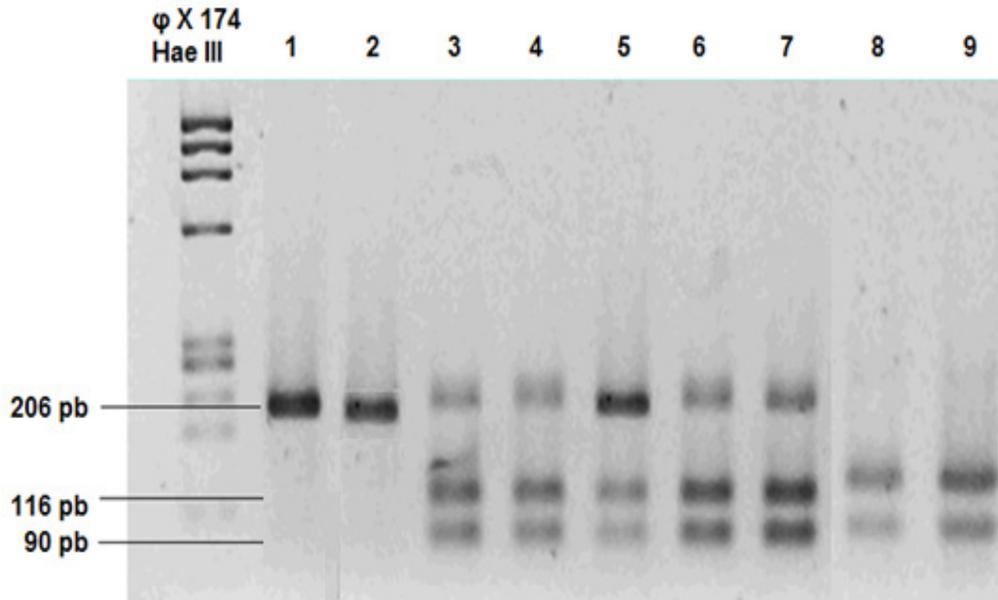


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 3% con los genotipos del polimorfismo +647 G>C en el gen del GR de pacientes con Asma. Marcador Φ X 174 *Hae III*, el carril 1 corresponde al producto de PCR sin digerir con la enzima de restricción, en el carril 2 se muestra el genotipo homocigoto (GG) de 206 pb, en los carriles 3-7 se encuentra el genotipo heterocigoto (GC), y en los carriles 8-9 el genotipo (CC).

7.2- Análisis mediante ensayos de PCR-RFLP de la región promotora del gen de CD14

La determinación del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, se llevó a cabo digiriendo el amplificado de PCR del gen de CD14 de aproximadamente de 497 pb con la enzima *Ava II*. De esta manera, aquellos sujetos homocigotos (CC) que no manifiestan variación en ningún alelo del gen de CD14 presentaron un fragmento de 497 pb, en los individuos con genotipo homocigoto (TT) para este polimorfismo se hallaron dos bandas:

una de 353 pb y una de 144 pb, y se encontraron fragmentos de 497 pb, 353 pb y 144 pb en sujetos con genotipo heterocigoto (CT). La Figura 12 representa una corrida electroforética del producto de PCR-RFLP de muestras de pacientes con EPOC para los genotipos del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14.

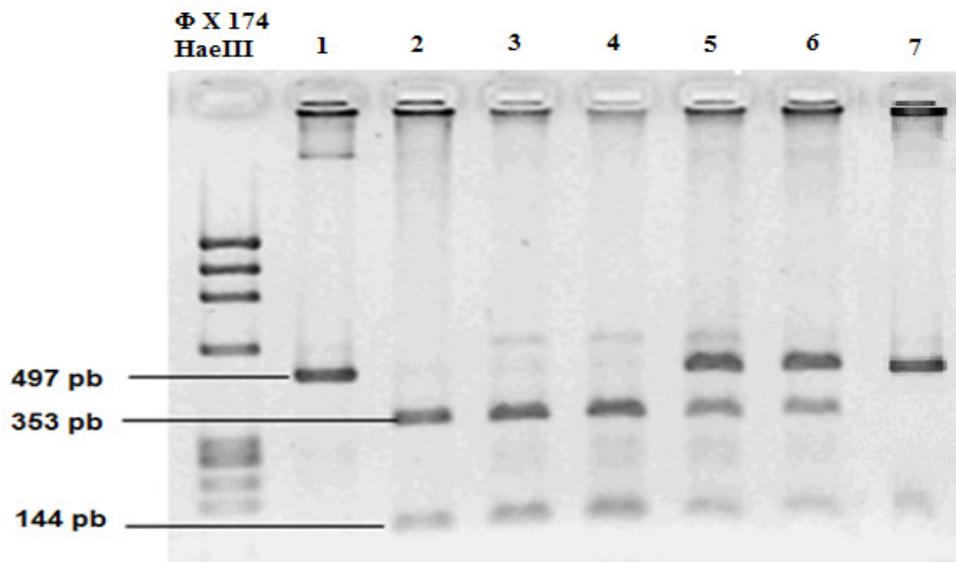


Figura 12. Gel de agarosa al 3% con los productos de PCR-RFLP para los genotipos de -159 C>T en la región promotora de CD14 de pacientes con EPOC. Marcador Φ X 174 *HaeIII*, en el carril 1 se muestra el producto de PCR sin restricción. En los carriles 2-4 se encuentra el genotipo (TT), en los carriles 5-6 el genotipo heterocigoto (CT), y en el carril 7 se halla el genotipo homocigoto silvestre (CC) de 497 pb.

7.3- Resultados de Análisis de Secuencias

Adicional a los ensayos de detección de las variantes genotípicas presentes en los dos polimorfismos estudiados por restricción enzimática, se realizó la detección de las mediante análisis de secuencias, confirmando los resultados obtenidos en las muestras por PCR-RFLP. Del total de las 20 muestras de individuos heterocigotos secuenciadas, se realizó la identificación de los polimorfismos en el gen del GR y el gen de CD14, mediante

la visualización de electroferogramas empleando el software DNA for Windows (Figura 13), el ensamblaje de la secuencia consenso fué realizado empleando el software DNAMAN, y ésta secuencia se utilizó para una búsqueda por BLAST, una herramienta para obtener la identidad de la secuencia comparando con la base de datos del NCBI.

La figura 14 muestra el resultado de comparar la secuencia consenso obtenida a partir del amplificado de un sujeto con Asma, con la base de datos del NCBI, y se destaca que la secuencia nucleotídica comparada corresponde en un 100 % de identidad con una región de 169 pb del gen del Receptor de Glucocorticoide, según lo esperado.

Por su parte en la figura 15 se observa, el resultado de comparar la secuencia consenso obtenida a partir del amplificado de un sujeto con EPOC, con la base de datos del NCBI, y se resalta que la secuencia de nucleótidos comparada, corresponde en un 100 % de identidad con una región de 22 pb del transcripto 1 de la molécula de CD14.

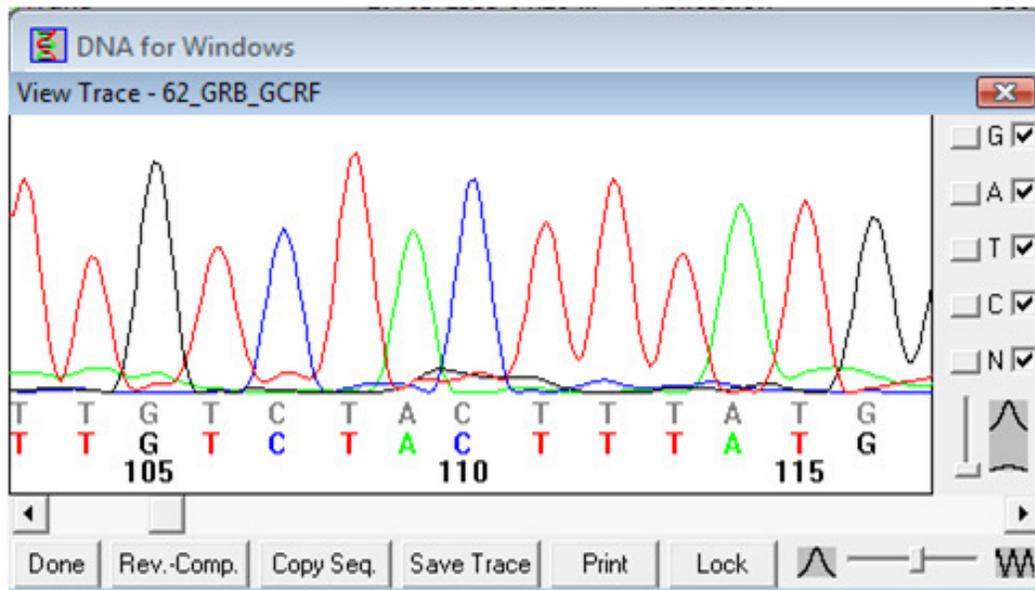


Figura 13: Electroferograma producto de secuenciación, correspondiente a un amplificado del intrón 2 del gen del Receptor de Glucocorticoide en un paciente con Asma homocigoto (CC). Las líneas rojas corresponden a Timina (T), las líneas negras a Guanina (G), líneas verdes a Adenina (A), y líneas azules a Citosina (C).

```

> ref|NG\_009062.1 D Homo sapiens nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
(glucocorticoid receptor) (NR3C1) on chromosome 5
Length=164582

Score = 313 bits (169), Expect = 2e-82
Identities = 169/169 (100%), Gaps = 0/169 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2      TGCAGTGAACAGTGTACCAGACCATAGTATTAGACACAGGTCTTGCTCACAGGGTTCTTG 61
|||||
Sbjct 41413   TGCAGTGAACAGTGTACCAGACCATAGTATTAGACACAGGTCTTGCTCACAGGGTTCTTG 41472

Query 62     CCATAAAGTAGACAAGTTATGTCTGCTGATCAATCTCTTTAAGAGAGGAATTGGTGTCAA 121
|||||
Sbjct 41473   CCATAAAGTAGACAAGTTATGTCTGCTGATCAATCTCTTTAAGAGAGGAATTGGTGTCAA 41532

Query 122    CATGGTGCAAAAACAAAATTTTACGTTCAAATGTTCTGCAAGTTCTCAA 170
|||||
Sbjct 41533   CATGGTGCAAAAACAAAATTTTACGTTCAAATGTTCTGCAAGTTCTCAA 41581

```

Figura 14: Alineamiento de la secuencia del gen del Receptor de Glucocorticoide. La secuencia corresponde a un amplificado por PCR con los iniciadores (F): 5'-GCAGTGAACAGTGTACCAGACC-3' (R): 5'-AAATTGAAGCTTAACAATTTTGGC-3', reportada por *Fleury y col., 2003*, en muestras de ADN de sujetos con Asma. En dicha figura se resalta el 100% de identidad con una región del gen del GR para *Homo sapiens* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

```

> ref|NM\_000591.2 GM Homo sapiens CD14 molecule (CD14), transcript variant 1, mRNA
Length=1623

GENE ID: 929 CD14 | CD14 molecule [Homo sapiens] (Over 100 PubMed links)

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.001
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      GCCTCTGACAGTTTATGTAATC 22
|||||
Sbjct 237    GCCTCTGACAGTTTATGTAATC 216

```

Figura 15: Alineamiento de la secuencia del gen de CD14. La secuencia corresponde a un amplificado por PCR con los iniciadores (F): F:5'-GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC-3' (R): 5'GCCTCTGACAGTTTATGTAATC-3', reportada por *Kowal y col., 2008*, en muestras de ADN de sujetos con EPOC. En dicha figura se resalta el 100% de identidad con una región del transcripto variante 1, para la molécula de CD14 en *Homo sapiens*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

7.4- Distribución de las variantes polimórficas para el gen de GR en la población de pacientes con Asma, EPOC, y grupo Control.

La Tabla VI muestra la distribución de los genotipos para el polimorfismo +647 G>C en el gen del Receptor de Glucocorticoide. Se puede observar que el genotipo heterocigoto (GC) fué el más común entre los tres grupos de individuos analizados; apareciendo este en: 41% en el grupo de pacientes con Asma, 84 % en el grupo de pacientes con EPOC, y en 93% en el grupo control. Igualmente se puede destacar que la frecuencia del alelo G fué mayor en los individuos con Asma (0,695), respecto a (0,525 y 0,510) en los grupos Control y EPOC; mientras que el alelo C fué mas frecuente en el grupo de pacientes con EPOC (0,490). Los resultados fueron analizados con una prueba de Chi-cuadrado, mediante tablas de contingencia, y al analizar el porcentaje de aparición de los genotipos (GG, GC, CC) en los individuos con Asma con respecto a los Controles, se obtuvieron diferencias significativas ($p<0,001$); así mismo al comparar los grupos de Asma y EPOC con los genotipos (GG, GC) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$), mientras que en los pacientes con EPOC respecto a los Controles, la prueba estadística arrojó diferencias significativas ($p<0,040$) en aquellos sujetos que poseían el genotipo (CC) para el polimorfismo +647 G>C en el gen del GR.

7.5- Distribución de las variantes del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, en un grupo de pacientes con Asma, EPOC, y en individuos Controles.

En la Tabla VII se muestra la distribución de los genotipos para el polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, en los tres grupos estudiados el genotipo heterocigoto (CT) fué el más predominante, encontrándose en 61% en pacientes con Asma y en 48 % en el

grupo de pacientes con EPOC, en comparación con un 55 % del grupo control. El alelo C de este polimorfismo fué mas frecuente en los individuos con EPOC (0,580) respecto a (0,535 y 0,475) en los grupos Control y Asma respectivamente; por su parte el alelo T presentó más frecuencia en el grupo control (0.525). La prueba Chi-Cuadrada realizada para estudiar la presencia de los genotipos (CC, CT, TT), en los individuos con Asma con respecto a los Controles no arrojó diferencias significativas, mientras que al analizar estadísticamente el porcentaje de aparición de los genotipos del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, en los pacientes con EPOC con respecto a los sujetos Controles, se obtuvo $p<0,0384$ en sujetos con el genotipo homocigoto (CC).

Tabla VI. Distribución de las variantes genóticas y frecuencia alélica del polimorfismo de *BclII* en el gen del Receptor de Glucocorticoide, entre los pacientes con Asma, EPOC, y sujetos Controles.

Genotipos	Grupo			Total
	Control n=100	Asma n=100	EPOC n=100	
GG	6	49	9	64
GC	93	41	84	218
CC	1	10	7	18
Frecuencia				
<i>Alelo G</i>	0,525	0,695	0,510	
<i>Alelo C</i>	0,475	0,305	0,490	

Asma vs Controles (GG, GC, CC): $p<0,001$

Asma vs EPOC (GG, GC): $p<0,001$

EPOC vs Controles (CC): $p<0,04$

Tabla VII. Distribución de los genotipos del polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, así como la frecuencia de los alelos C y T, en los pacientes con Asma, EPOC y Controles.

Genotipos	Grupo			Total
	Control n=100	Asma n=100	EPOC n=100	
CC	20	23	34	77
CT	55	61	48	164
TT	25	16	18	59
Frecuencia				
<i>Alelo C</i>	0,475	0,535	0,580	
<i>Alelo T</i>	0,525	0,465	0,420	

EPOC vs Controles (CC): $p < 0,038$

7.6 - Distribución de los grados de severidad para los pacientes con Asma y EPOC, en función de la distribución de genotipos para cada polimorfismo

Con finalidad de determinar la posible relación entre los grados de severidad de cada patología, y la distribución de los genotipos de cada polimorfismo, se resumen en las tablas VIII y IX la distribución de los genotipos de los dos polimorfismos analizados, en contraposición con los grados de severidad tanto de Asma como de EPOC. Los grados de severidad fueron definidos como: Leve intermitente (LI), Leve persistente (LP), Moderado persistente (MP) y Severo persistente (SP), según GINA 2006 y ATS 2004.

La tabla VIII muestra que existe una distribución heterogénea entre los genotipos de los polimorfismos estudiados en GR y CD14, y los distintos grados de severidad de Asma. A estos datos se le realizaron pruebas χ^2 , y se observaron diferencias significativas en los

Genotipos (GG y GC) al comparar los grados de severidad LI, MP y SP respectivamente; así mismo, con el genotipo (CT) del polimorfismo de CD14 se hallaron diferencias estadísticamente significativas, al comparar los grados de severidad LI, MP, SP y LP, mientras que el genotipo (CC) se halló significativo al comparar LP y MP.

La tabla IX refleja los grados de severidad de los individuos con EPOC, con respecto a los genotipos observados en cada polimorfismo analizado. Al realizar el análisis estadístico Chi- cuadrado, se hallaron diferencias significativas al comparar los grados de severidad LI y LP con el genotipo (GG), igualmente el genotipo (GC) presentó diferencias estadísticamente significativas al analizar su distribución en los distintos grados de severidad. Así mismo el genotipo (TT) presentó diferencias significativas al comparar SP y LP, mientras que el genotipo (CT) arrojó significancia estadística, al analizar los grados de severidad LI, MP, LP y SP respectivamente.

Para observar cual genotipo de cada polimorfismo, está más asociado con algún grado de severidad de Asma o EPOC particular, sería útil aumentar el número de muestras de pacientes y controles, pues como se notó en las tablas VIII y IX la presencia de cada variante genotípica en los grados de severidad es pequeña y variada, y aunque la prueba estadística indicó que existen diferencias significativas entre algunos genotipos y los grados de severidad, dicha diferencia no necesariamente permite tener conclusiones claras.

Tabla VIII: Grado de severidad de los pacientes con Asma, en función de las variantes polimórficas para el gen del GR y el gen de CD14, empleando el criterio de clasificación de GINA 2006.

Polimorfismo y genotipos	Grado de Severidad Asma				Total
	Leve Intermitente (LI)	Leve Persistente (LP)	Moderado Persistente (MP)	Severo Persistente (SP)	
+647G>C en GR					
GG	6	10	19	17	52
GC	4	8	16	14	42
CC	1	1	3	1	6
-159 C>T en CD14					
CC	5	2	11	5	23
CT	3	12	21	24	61
TT	2	3	7	4	16

Leve intermitente vs Moderado persistente (GG, GC): $p < 0,02$

Leve intermitente vs Severo persistente (GG, GC): $p < 0,02$

Leve persistente vs Moderado persistente (CC): $p < 0,02$

Leve intermitente vs Moderado persistente (CT): $p < 0,002$

Leve intermitente vs Severo persistente (CT): $p < 0,001$

Leve intermitente vs Leve persistente (CT): $p < 0,01$

Tabla IX: Distribución del grado de severidad de los pacientes con EPOC, en función de las variantes genóticas para los polimorfismos en los genes del GR y de CD14, el criterio de clasificación presentado fué ATS 2004.

Polimorfismo y genotipos	Grado de Severidad EPOC				Total
	Leve Intermitente (LI)	Leve Persistente (LP)	Moderado Persistente (MP)	Severo Persistente (SP)	
+647G>C en GR					
GG	0	6	4	1	11
GC	14	34	25	8	82
CC	1	2	4	0	7
-159 C>T en CD14					
CC	7	12	9	5	33
CT	3	17	22	7	49
TT	2	11	4	1	18

Leve intermitente vs Leve persistente (GG, GC): $p < 0,01$

Leve persistente vs Severo persistente (GC): $p < 0,001$

Moderado persistente vs Severo persistente (GC): $p < 0,001$

Leve intermitente vs Moderado persistente (CT): $p < 0,001$

Leve intermitente vs Leve persistente (CT): $p < 0,002$

Leve persistente vs Severo persistente (TT): $p < 0,007$

7.7 - Efectos de la dexametasona y los ginsenósidos sobre la formación de H₂O₂, en polimorfonucleares de pacientes y controles por Citometría de Flujo

Para estudiar la formación de radicales de oxígeno en células polimorfonucleares, tanto en los individuos controles como en los pacientes con Asma y EPOC, se usó como la metodología de Capacidad Oxidativa por citometría de flujo en lugar de la de Reducción del NBT descrita previamente, ya que la primera permite discernir entre las poblaciones celulares de pacientes y controles que son afectadas por los esteroides, y así poder examinar correctamente la producción de H₂O₂ en la población de polimorfonucleares de interés, al interactuar con los compuestos dexametasona y ginsenósidos.

Para ello, se realizó el análisis de los histogramas con el programa inmuno 4 (el cual realiza la resta matemática de los valores de intensidad de fluorescencia), para tomar una base real se trabajaron con 4 ensayos de los controles para el posterior análisis con los pacientes (se trabajó con 8 individuos controles y 4 pacientes con Asma y 4 pacientes con EPOC). En la Tabla X, se muestra el efecto de las drogas Dexametasona, PPD, CK y PPT sobre la viabilidad celular en los individuos controles, con respecto a las distintas concentraciones aplicadas de cada tratamiento con los compuestos. El efecto delta promedio de los controles fué calculado como:

$$\text{Delta} = \text{valor PMA} - \text{valor droga.}$$

En la siguiente tabla X se muestra, que la Dexametasona es más efectiva inhibiendo la producción de peróxidos que los otros tratamientos análogos a bajas dosis (0,5 - 1) μM , en sujetos controles. La concentración requerida para el 50 % de efecto, IC 50 es dexametasona 0,3 μM , PPD 7,5 μM , PPT 1 μM y CK 0,8 μM . A 25 μM el compuesto CK

induce la muerte celular en forma similar a lo observado con los otros compuestos a 50 μM .

Tabla X: Evaluación del efecto de los compuestos Dexametasona, PPD, CK y PPT, sobre la viabilidad de células polimorfonucleares de individuos controles.

Concentración (μM)	Dexa		PPD		PPT		CK	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
0.1	1.5	0.3	0.2	0.5	3.1	0.8	4.5	2.6
0.5	10.2	2.5	3.1	1.5	6.9	2.1	8.2	3.5
1	15.5	4.6	6.9	3.8	10.6	3.3	11.5	6.3
5	20.1	7.8	9.5	6.9	15.8	5.5	16.8	5.5
10	19.6	6.5	15.5	7.5	17.9	6.8	15.3	8.3
25	19.2	5.9	18.9	6.5	17.2	7.1	Muerte	

Dex: Dexametasona. PPT: 20 (S)- Protopanaxatriol. PPD: 20 (S)- Protopanaxadiol. CK: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]. Efecto delta promedio de los controles (delta = valor PMA-valor droga). Prom: Promedio. DS: desviación estándar. Muerte: 75 % células no viables.

Una vez observado el comportamiento de los compuestos en los sujetos controles, los pacientes con Asma y EPOC fueron divididos en respondedores y no respondedores a la dexametasona; definiendo respondedor al ensayo en el cual se observó una disminución en la producción de peróxidos, independientemente de la patología; y al no respondedor al individuo en el cual se incrementó la producción de peróxidos en presencia de los compuestos. Las células de los pacientes son más susceptibles a la muerte celular dado que, a concentraciones de 25 μM de ginsenósidos más del 75 % de las células no son viables, dicho fenómeno debe ser estudiado en más detalle en estudios posteriores.

Por otra parte se destaca que, las respuestas a los tratamientos de los pacientes analizados, no se relacionan con los resultados obtenidos luego de realizarles el genotipaje para los polimorfismos: +647 G>C en el Receptor de Glucocorticoide y -159 C>T en el gen

de CD14, ya que como se muestra en la tabla XI los pacientes presentan patrones genotípicos distintos y una respuesta similar a los compuestos evaluados.

Como se muestra en la tabla XII, los cinco pacientes analizados no presentaron respuesta a la Dexametasona, así mismo se observa que este compuesto al igual que el CK y el PPD parecen activar la producción de H_2O_2 . Mientras que con el PPT no está claro el fenómeno, pues en los pacientes 7 y 8 se observa un efecto inhibitor (valores positivos) en las distintas concentraciones evaluadas. También se muestra que a altas concentraciones estos ginsenósidos inducen la muerte celular, en forma similar al grupo anterior.

En este grupo de pacientes no respondedores a la dexametasona, no se muestra una relación entre el genotipo para los dos polimorfismos analizados y la respuesta a los distintos tratamientos, ya que como se muestra en la tabla XII los cinco pacientes presentan patrones genotípicos distintos para los dos polimorfismos analizados.

Tabla XI: Efecto sobre la producción de H₂O₂ en respuesta a los ginsenósidos, en polimorfonucleares de tres pacientes respondedores a la dexametasona.

Nº Paciente	Concentración (µM)	Dexa	PPD	PPT	CK
		ΔS	ΔS	ΔS	ΔS
1 (GC/TT)	1	20.2	-23.5	-16.3	8.2
	5	27.5	-20.4	-28	10.2
	10	28.2	5	-29.2	32
	25	30.2	Muerte	-35	Muerte
2 (GG/CT)	1	12.6	-20.5	-17.6	80
	5	15	-10.5	-14.5	85
	10	15.6	5	-10	86
	25	18.5	Muerte	-8.3	Muerte
6 (GC/CT)	1	1.3	-8.9	-2.5	1.6
	5	8	-12.7	-4.5	2.8
	10	15	-17.4	-9.5	9
	25	29	Muerte	Muerte	Muerte

Nº Pac: Paciente. (Genotipo para +647 G>C en GR/ genotipo para -159 C>T en CD14).
 Dex: Dexametasona. PPT: 20 (S)- Protopanaxatriol. PPD: 20 (S)- Protopanaxadiol. CK: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]. ΔS: valor PMA-valor droga. ΔS: valor PMA-valor droga.
 Muerte: 75% células no viables.

Tabla XII: Efecto de los ginsenósidos sobre la producción de H₂O₂, en células polimorfonucleares de cinco pacientes no respondedores a la dexametasona.

Nº Paciente	Concentración (µM)	Dexa	PPD	PPT	CK
		ΔS	ΔS	ΔS	ΔS
3 (GG/TT)	1	-53.5	-55.4	-39.6	-62
	5	-54.2	-86.7	-51.6	-61.66
	10	-51.3	-90.1	-59.9	-10.5
	25	-50.3	Muerte	-77.1	Muerte
4 (GG/CC)	1	-26.7	-28.1	-23.5	-30.2
	5	-25.1	-13	-32.5	-42.2
	10	-28.3	-8.2	-41.1	-61.3
	25	-25.7	Muerte	-70.4	Muerte
5 (GG/CT)	1	-68.6	-60.1	-59.9	-68.5
	5	-69.3	-51.9	-43.5	-66
	10	-67.1	-33.3	-33.5	-44
	25	-58.1	Muerte	-25.6	Muerte
7 (GC/CC)	1	-14.9	-15.4	60.5	-2.6
	5	-16.4	-31.4	78.4	-5.6
	10	-15.2	-18.7	79.1	-6.6
	25	-25.7	Muerte	Muerte	Muerte
8 (GC/CT)	1	-32.6	-20.7	16.6	-11.5
	5	-38.2	-47.9	88.8	-16
	10	-18.7	-64.4	81.8	-26.6
	25	-13.2	Muerte	Muerte	Muerte

Nº Pac: Paciente. (Genotipo para +647 G>C en GR/ genotipo para -159 C>T en CD14).
 Dex: Dexametasona. PPT: 20 (S)- Protopanaxatriol. PPD: 20 (S)- Protopanaxadiol. CK: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]. ΔS: valor PMA-valor droga. ΔS: valor PMA-valor droga.
 Muerte: 75% células no viables.

7.8 – Evaluación de la producción de TNF- α inducida por LPS, en respuesta a los tratamientos con dexametasona y ginsenósidos por ELISA tipo Sándwich

Siendo la citocina TNF- α uno de los marcadores para estimar la actividad del receptor de Glucocorticoide, se propuso estimar su producción en leucocitos humanos, al ser tratados con la dexametasona como control positivo de unión a dicho receptor y con los ginsenósidos.

En las tablas XIII y XIV se observa una respuesta similar a los esteroides tanto de los pacientes con Asma o EPOC, a los distintos tratamientos luego de estimulación con Lipopolisacáridos (LPS). Se muestra que independientemente de la patología y de los genotipos detectados para el polimorfismo +647 G>C en el gen de GR y para el -159 C>T en el gen de CD14, estos compuestos inducen inhibición en la producción de TNF- α , lo cual se nota con la disminución en la producción de esta citoquina, con respecto al estímulo con LPS y sin compuestos (*); LPS1 diluido 1/2 con respecto a LPS2. Igualmente se resalta que la Dexametasona es la que provoca más inhibición en la producción de TNF- α , si es comparada con los demás compuestos en todos los individuos analizados, independientemente de la patología.

Debido al bajo número muestras obtenidas para los ensayos funcionales: 8 pacientes (Asma y EPOC) y 8 sujetos controles, así como los valores tan variables observados, no fué posible realizar estadística con los datos de TNF- α y de capacidad oxidativa.

Tabla XIII: Producción de la citocina TNF- α en leucocitos humanos totales de cuatro sujetos con Asma, luego de la estimulación con LPS y los tratamientos con los compuestos.

Nº Pac. Asma	Concentración Comp (μ M)	<i>LPS1</i>		<i>LPS2</i>		Dexa		PPD		PPT		CK	
		valor (pg/ml)	DS	valor (pg/ml)	DS	valor (pg/ml)	DS	Valor (pg/ml)	DS	Valor (pg/ml)	DS	Valor (pg/ml)	DS
2	*	*225	48	*416	68								
	1					92	28	148	22	165	38	198	31
	10					68	15	109	18	125	26	150	22
	25							90	15	83	15	108	17
3	*	*109	8	*216	14								
	1					41	13	89	33	99	8	148	33
	10					20	6	59	14	68	11	115	22
	25							60	17	55	26	93	12
5	*	*99	9	*190	22								
	1					33	12	76	10	55	8	77	15
	10					25	8	55	9	38	6	61	9
	25							41	15	29	10	43	6
6	*	*265	89	*523	128								
	1					135	45	215	45	178	12	235	32
	10					115	29	198	32	118	33	178	29
	25							125	45	78	9	98	15

Valores de TNF- α : (pg/ml). Nº Pac: Pacientes. *: Estimulación de las células con *LPS1-LPS2* sin compuestos. Comp: Compuestos. PPT: 20 (S)- Protopanaxatriol. PPD: 20 (S)- Protopanaxadiol. CK: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]. DS: Desviación estándar.

Tabla XIV: Producción de TNF- α en leucocitos humanos totales de cuatro pacientes con EPOC, inducida por LPS y los tratamientos con Dexametasona, PPD, PPT y CK.

Nº Pac. EPOC	Concentración comp (μ M)	LPS1		LPS2		Dexa		PPD		PPT		CK	
		Valor (pg/ml)	DS										
1	*	*155	28	*325	45								
	1					75	15	98	25	108	22	125	38
	10					50	12	68	18	75	18	95	26
	25							50	23	30	15	49	15
4	*	*325	48	*628	75								
	1					270	66	280	46	255	26	233	41
	10					180	31	252	38	190	42	198	25
	25							190	17	115	31	90	33
7	*	*78	6	*145	5								
	1					68	5	65	28	75	15	48	12
	10					41	16	40	9	51	9	36	8
	25							38	12	28	11	22	8
8	*	*62	15	*98	12								
	1					29	5	82	10	65	2	77	7
	10					21	6	32	12	46	8	58	5
	25							26	9	23	3	41	12

Valores de TNF- α : (pg/ml). Nº Pac: Pacientes. *: Estimulación de las células con LPS1-2 sin compuestos. Comp: Compuestos. PPT: 20 (S)- Protopanaxatriol. PPD: 20 (S)- Protopanaxadiol. CK: [20-DAB-glucopiranosil-20 (S)-protopanaxadiol]. DS: Desviación estándar.

8. DISCUSIÓN

El Asma y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, son enfermedades inflamatorias humanas, cuya complejidad ha sido asociada con la acción de múltiples genes; algunos estudios han demostrado la participación del componente genético en la EPOC, sugiriendo influencia poligénica en la enfermedad, en la cual el componente genético consiste en la contribución de varios genes, más que de un gen único (*Ugenskiene y col., 2005*). Igualmente para Asma se han considerado varios genes candidatos de predisposición, en función a los diferentes fenotipos expresados. Existen estudios de asociación que demuestran la contribución poligénica, relacionando secuencias polimórficas de genes de mediadores inflamatorios y de receptores celulares de participación activa en Asma, con el desarrollo de la enfermedad y su grado de severidad (*Los y col., 1999*).

Es probable que en enfermedades como Asma y EPOC, el efecto de múltiples genes defina la susceptibilidad a padecerlas, es decir, el desarrollo de la patología depende de la acción coincidente de varios eventos genéticos debidos a polimorfismos; en las cuales las variaciones de cada gen pueden influir en bajo grado, comparado con el efecto que pudiera expresar su acción conjunta. En el material presentado se realizó un estudio, considerando dos polimorfismos en genes que pueden interferir con la cascada inflamatoria y la respuesta a agentes anti-inflamatorios, como posibles mediadores de enfermedades de las vías aéreas y su progresión; los polimorfismos analizados corresponden a los genes del GR y del el antígeno CD14.

El receptor de Glucocorticoide permite el reconocimiento de esteroides en el interior celular, y puede regular la expresión de varios genes de citoquinas inflamatorias, mediando

la represión de la transcripción de genes como NF- κ B o proteína 1 activadora (AP1), a nivel de la interacción con el ADN. Por otra parte el antígeno CD14 es un receptor expresado en monocitos y macrófagos que interactúa con componentes bacterianos, contribuyendo en la liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios.

Los polimorfismos en los genes de estos receptores, fueron detectados por amplificación de secuencias específicas con el propósito de indagar si dichos polimorfismos en pacientes con Asma y EPOC contribuyen de forma individual o coexisten, como factores determinantes para el desarrollo y severidad de dichas patologías. En el estudio también se realizaron ensayos biológicos *in vitro* con muestras de pacientes seleccionados, para detectar la producción o inhibición de H₂O₂ y TNF- α , y evaluar la función del receptor LPS-CD14-TLR-4 y del Receptor de Glucocorticoide. La caracterización de la población estudiada se reportó en la **tabla V**; y los resultados obtenidos de la distribución de los genotipos para los polimorfismos en el GR y en el gen de CD14, se resumen en las tablas **VI** y **VII**, junto con las frecuencias alélicas.

En los resultados obtenidos, la distribución del genotipo heterocigoto (GC) para el polimorfismo +647 G>C en el gen del GR fué el mas predominante, encontrándose en (41%) de los sujetos con Asma, comparable a los valores reportados para la población caucásica (46%), en la cual, existe diferencia significativa entre los genotipos de este polimorfismo, con respecto a individuos controles para la misma población ($p < 0,01$) *Rosmond y col., 2000*. Con respecto a los genes que influyen en los efectos exógenos y endógenos de los glucocorticoides, en el presente estudio se analizó el polimorfismo en el gen correspondiente al receptor de glucocorticoide, como posible elemento modificador del desarrollo y grado de severidad tanto en Asma como de EPOC. Se conoce que los

glucocorticoides interrumpen el desarrollo de inflamación y suprimen las reacciones inflamatorias a través de la activación o represión de factores de transcripción, modulando de esta manera la expresión de genes blancos como citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-2, IL-12), moléculas de adhesión celular (E-selectina, VCAM-I, ICAM-1), quemokinas (IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos MIP-), receptores (Complejo mayor de Histocompatibilidad MHC), enzimas inducibles (COX-2 iNOS) y ciclina D1. Específicamente y de acuerdo al modelo de acción transcripcional (genómico), durante el mecanismo de acción del receptor de GC, las moléculas lipofílicas atraviesan la membrana celular y se unen a receptores de glucocorticoides intracelulares (formando el complejo GC-GR), a este nivel, se desencadena la transactivación, así como la transrepresión de genes de respuesta a glucocorticoides. La transactivación y / o transrepresión de los genes rio abajo finalmente resultan en la inducción de la muerte celular programada (apoptosis); de manera que la presencia de mutaciones puntuales o polimorfismos particulares en el gen de GR, pueden conducir a una formación deficiente del complejo Receptor de Glucocorticoide-ligando (GR-GC), o alterar el proceso de transactivación o transrepresión (*Tissing y col., 2005*).

Por todo lo anteriormente descrito, el polimorfismo +647 G>C en el Receptor de Glucocorticoide (*BclI*) siendo intrónico, puede afectar de manera indirecta la actividad del gen de GR; se sugiere que afecta el promotor del gen de GR por actuación selectiva por activación o represión de sitios (*Corvol y col., 2007*). Debido a que este polimorfismo no se encuentra en una región codificante, en una región reguladora o de empalme, su papel funcional si existe, es incierto. Sin embargo, existen polimorfismos en las proximidades del exón 2 y de la región promotora que son importantes funcionalmente, los cuales

pueden estar en desequilibrio de ligamiento con el sitio de restricción del polimorfismo +647 G>C estudiado (*Rosmond y col., 2000*).

Los recursos genéticos e isoformas que se generan por los empalmes alternativos del gen del receptor de Glucocorticoide, así como la iniciación de la traducción alternativa, permiten que cada isoforma esté sujeta a una serie de modificaciones post-trasduccionales, que desempeñan un papel importante en la distribución subcelular. Además de la complejidad de las múltiples isoformas, las mutaciones y polimorfismos GR también pueden afectar a la expresión de proteínas, así como su estructura y función, lo que puede tener diversas consecuencias clínicas en ambas patologías (*Corvol y col., 2007*).

Otro factor importante en la respuesta inflamatoria en pacientes que desarrollan alteraciones a nivel de vías aéreas, son las especies reactivas de oxígeno EROs como: O_2 y H_2O_2 , las cuales son altamente inestables con electrones no apareados, y causan la oxidación de proteínas, del ADN y los lípidos. Así mismo las EROs se han implicado en la iniciación de las respuestas inflamatorias en los pulmones, a través de la activación de factores de transcripción, como el factor (NF)- κ B y (AP) -1, que son igualmente influenciados por GR; y por medio de otras vías de transducción de señales, llevando a una mayor expresión de genes de mediadores pro-inflamatorios. A pesar de que una serie de vías diferentes se activan durante de la respuesta inflamatoria, NF- κ B se considera de suma importancia en la inflamación de EPOC, ya que es activada por todos los estímulos potencialmente patógenos (*Rahman y col., 2006*).

Por todo ello, como parte del material realizado se incluyó el estudio de la producción de H_2O_2 , para evaluar si la respuesta inflamatoria en los pacientes con Asma y

EPOC luego de la estimulación con Lipopolisacáridos, dependía de la activación de las células, por la ruta CD14 o de la señal represora ejercida por el GR. Como control positivo se usó la dexametasona, un potente GC agonista sintético que puede actuar como antiinflamatorio e inmunosupresor de la inflamación en las vías aéreas, mayormente por regulación de las proteínas pro-inflamatorias.

En los ensayos funcionales se evaluó la producción de radicales de oxígeno y la citocina TNF- α , con el uso de la dexametasona y los ginsenósidos CK, PPT, PPD; para ello se utilizó las técnicas de citometría de flujo y ELISA respectivamente, como métodos reproducibles y confiables, para estimar la actividad del GR en marcos experimentales y clínicos (*Du y col., 2009*). En los ensayos se observó que la dexametasona en comparación con los demás compuestos a bajas dosis, actúa mas efectivamente sobre la inhibición de estos mediadores pro-inflamatorios TNF- α y EROs en los pacientes con Asma y EPOC, así como en sujetos controles, independientemente del genotipo para el polimorfismo del GR. Un comportamiento similar fué encontrado por *Adcock y col., 2009*, al estimular las células con LPS, y obtener una atenuada producción de TNF- α como respuesta, de manera dosis-dependiente a la dexametasona. En este mismo contexto *Franchimont y col., 2009*; indican que esta respuesta es dependiente de la amplitud de la estimulación con LPS. Los ginsenósidos probados aunque semejantes a la dexametasona, no necesariamente se unen al mismo receptor de glucocorticoide, o al menos no parecen unirse con la misma eficiencia.

De esta manera se corroboró en los pacientes y controles, la acción inhibidora de los glucocorticoides sobre los procesos celulares, y mediadores relacionados con inflamación a través de mecanismos genómicos y no genómicos (*Horvath y col., 2007*). Sin embargo *Du*

y col., 200); proponen que la administración de agonistas del GR en algunos pacientes, resultan en una significativa baja regulación de la expresión del GR *in vitro* e *in vivo*, así como el poder de unión que media la resistencia a esteroides. Así mismo para asma ha sido reportada, que la sensibilidad local de GR puede estar influenciada por la acción de citoquinas (van Rossum y col., 2003).

Igualmente los polimorfismos en el gen de GR han sido descritos que están asociados con la respuesta alterada a glucocorticoides, particularmente el polimorfismo *BclI* se ha asociado con incrementada sensibilidad de los glucocorticoides, medido con una prueba de supresión de la respuesta del nivel de cortisol sérico con dexametasona en adultos sanos (Tissing y col., 2005). Al mismo tiempo, existe evidencia de que en una serie de enfermedades inflamatorias crónicas, existe disminución de la sensibilidad de los glucocorticoides en las células de sangre, aunque la causa de esta reducción sigue siendo todavía desconocida, se infiere que podría al menos en parte, estar determinada genéticamente (Corvol y col., 2007).

Una característica importante de la inflamación en la EPOC es la falta de respuesta a los glucocorticoides, que se ha vinculado al estrés oxidativo. El hábito tabáquico es la principal causa de la EPOC, y como es comúnmente conocido el humo contiene oxidantes, que estimulan a los macrófagos alveolares, induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual sugiere que el estrés oxidativo puede ser un factor importante en la inducción de resistencia a los glucocorticoides en la EPOC. En la actualidad se indica que compuestos antioxidantes, también pueden mejorar la eficacia de los glucocorticoides por oxidantes y aldehídos, aumento la actividad de la histona diacetilasa en pacientes con EPOC (Rahman y col., 2006).

Los pasos de activación o represión de genes blanco de NF-kB y AP-1, pueden estar influyendo a nivel molecular el desarrollo de asma grave y EPOC, en respuesta al estrés oxidativo o el tabaquismo, la infección viral, alérgica o inflamación crónica. Así mismo, los niveles elevados de IL-2 e IL-4 pueden reprimir el ligando de GR, la cascada de activación de la MAP Kinasa reduciendo la translocación nuclear de GR y la activación de PI3K, puede reducir la actividad de la cooperación GR-represor (*Adcock y col., 2009*). Aún cuando en los resultados obtenidos no se detalla la ruta molecular que interfiere, ni la relación genotipo-severidad, en la **tabla VI** se detalla que el genotipo (GC) pudiera ser uno de los posibles factores de protección contra el desarrollo de Asma, dado que dicho genotipo se presenta con menor porcentaje en los individuos con esta patología si son comparados con el grupo control; mientras que el genotipo (GG) podría constituir un factor de susceptibilidad para el desarrollo de esta misma patología $p < 0,001$, si es comparada con el porcentaje de aparición obtenido para este genotipo en el grupo control; el grado de severidad de asma en dicho genotipo fué Moderado Persistente. En este contexto, ha sido ampliamente revelado que el asma es una enfermedad heterogénea, en la cual los factores que afectan su fenotipo son: la reactividad bronquial y los niveles de IgE en suero, a su vez influenciados por factores genéticos y ambientales como la exposición a alérgenos, y el uso de medicamentos para la terapia de asma (*Kowal y col., 2008*).

Con respecto a la relación genotipo-respuesta a esteroides en los sujetos con Asma y EPOC los resultados obtenidos no fueron significativos, sin embargo permitieron comprobar que las diferencias genéticas existentes en los pacientes, no poseen asociación directa con la respuesta a esteroides (**tablas XI y XII**); inverso a las observaciones

reportadas *LeVan y col., 2005*, quienes plantearon que las variaciones genéticas (de existir) pudieran ser la base de la variabilidad respecto a la sensibilidad en las vías aéreas.

Al mismo tiempo en este trabajo de investigación, se estudió el polimorfismo -159 C>T en la región promotora del gen de CD14 en pacientes y controles. El porcentaje de aparición de los genotipos en los pacientes con EPOC fué: (CC) 34 %, (CT) 48 % y (TT) 18%, alelo T presentó una frecuencia de (0,42), lo cual se aproxima con lo reportado por *Eilertsen y col., 2003*; quienes obtuvieron en individuos sanos porcentajes de 35,0 % (CC), 44,4 % (CT) y 20,5 % (TT) respectivamente, y (0,437) de frecuencia en el alelo T. Al mismo tiempo *Leung y col., 2003*; reportaron porcentajes de 31 % (CC), 50 % (CT) y 19 % (TT) en niños de China; de manera que los resultados reportados se corresponden con los publicados en otros estudios con otras razas y condiciones (controles y sanos). Sin embargo según *Zhang y col., 2008*, este polimorfismo presenta variaciones en la frecuencia de alelos, de acuerdo a los diferentes grupos étnicos. Lo cual es confirmado por *Choudhry y col., 2005*, quienes reportan que la frecuencia de este polimorfismo en individuos originarios de Puerto Rico, México oscilan entre (0,67 ; 0,56 ; 0,74) respectivamente.

Según *Zhang y col., 2008*, utilizar fármacos para explicar las asociaciones entre respuesta- condición genética (p.e. el SNP -159 C>T CD14), es un método apropiado para modelar los fenotipos de asma. Sin embargo, en los ensayos funcionales realizados para estimar la producción de TNF- α y H₂O₂, no se observaron diferencias al comparar la respuesta celular a los esteroides, y los genotipos de este polimorfismo obtenidos por los pacientes (**tablas XIII y XIV**). Para la determinación de peróxido de hidrógeno y producción de TNF- α , los dos ensayos realizados (capacidad oxidativa y ELISA), fué la determinación de TNF- α , la que permitió observar mas claramente el efecto inhibitor de la

dexametasona y los ginsenósidos sobre la producción de esta citocina, aunado a ello, se confirmó que la resistencia a esteroides depende de diversos mecanismos de respuesta celular. Opuesto a los resultados que se muestran, *Franchimont y col., 2009*; reportan que luego de la estimulación con LPS, los individuos homocigotos (TT) presentan alta producción de TNF- α e IL-6 ($p= 0,044$, $p = 0,004$ respectivamente), y poca liberación de IL-10 ($p = 0,003$).

La falta de asociación entre los resultados de genotipo-respuesta a esteroides de este material, se corresponde con *Eilertsen y col., 2003*; quienes no encontraron asociación entre este SNP y mediadores inflamatorios como el fibrinógeno, IL-6, TNF- α , la proteína C reactiva, el leucotrieno B4, o tromboxano B2. Estos mismos autores concluyen que este polimorfismo podría ser un rasgo genético importante, relacionado con la capacidad de CD14 para unirse a lípidos de transporte, tales como el colesterol. Así mismo *Aulock y col., 2005*; mostraron que no existen diferencias significativas en la liberación de la citocina TNF- α , si se realiza una comparación entre los genotipos (CC, CT y TT) para el polimorfismo -159 C>T en la región promotora del gen de CD14.

Por su parte *Hong y col., 2007*; proponen que bajas concentraciones de LPS inducen genes inflamatorios, incluyendo TNF- α a través de vías dependientes del complejo CD14 - TLR-4, siendo ambos, receptores de LPS en macrófagos relacionados con la respuesta pro-inflamatoria. Sin embargo los datos de *Larocca., 2006*, revelan que no se encontraron diferencias en la frecuencia de polimorfismos del receptor Tipo Toll-4 en pacientes con Asma y EPOC vs controles; conclusión que resulta predictiva en este material dado que, reportamos un comportamiento similar al comparar el grupo de Asma contra el grupo

control, mas no así para EPOC vs Controles en el genotipo (CC), el cual presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0384$).

En diversos estudios analizados se han encontrado resultados divergentes con respecto a la función del alelo T del SNP -159 C>T en el gen de CD14. *LeVan y col., 2001*, han asociado este alelo con altos niveles de expresión de CD14 soluble, e indican que se encuentra inversamente relacionado con niveles bajos de IgE total en suero. Así mismo revelan que este polimorfismo puede afectar la regulación de la expresión del gen de CD14, modulando el impacto que tienen los eventos mediados por CD14 sobre las respuestas inmune innata y adaptativa, así como en las enfermedades mediadas por IgE como alergia y asma.

En contraposición, en el presente trabajo el alelo T fué mas frecuente en el grupo control, lo cual puede corresponderse con lo indicado por *Leynaert y col., 2006*; quienes reportan que el alelo T ha sido asociado con bajo riesgo de alergias nasales, atopia y bajos niveles de CD14s, mientras que influencia los elevados niveles de IgE en un estudio realizado en Francia. Los estudios de *LeVan y col., 2001*; proponen que este alelo T es transcrito mas eficientemente en monocitos tanto estimulados como no estimulados con LPS. La expresión de CD14 observada en sujetos con el genotipo (TT), conduce a una mayor activación de las células involucradas en la respuesta inmune, y el aumento de la secreción de mediadores proinflamatorios como: TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IFN- γ , inclinando la respuesta inmune hacia Th1 (*Kowal y col 2008*).

Estudios funcionales han revelado el mecanismo biológico potencial, para la expresión incrementada de CD14s entre individuos con el genotipo (TT) del polimorfismo -159 C>T en la región promotora de CD14. Existen evidencias de el alelo T puede

incrementar la expresión de CD14, por la baja la afinidad de interacciones ADN/ proteínas, producto de la disminución de la afinidad del factor inhibitorio de transcripción SP3, que resulta en el aumento de la actividad del promotor de CD14. En el trabajo realizado por *Kowal y col 2008*, se indica que este polimorfismo ha sido asociado con reactividad bronquial, atopia, sibilancias y asma, lo cual depende de la expresión alterada de sCD14. Las concentraciones de CD14 soluble (sCD14), se determinaron en sobrenadante de cultivo por técnica de ELISA inmunoenzimático, y las diferencias fueron evaluadas mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa.

Martínez., 2007, propone que la interacción antagonista entre el contexto medioambiental y el polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14, son determinantes de la sensibilización alérgica: el alelo T puede ser un factor protector o de riesgo, dependiendo del grado de exposición a los productos microbianos presentes en diferentes concentraciones en marcos urbanos o rurales. Las diferencias en la expresión constitutiva de CD14 (mediado por la condición homocigota para T), definen la sensibilidad a endotoxinas medioambientales, opuesto a aquellos individuos portadores de los otros dos genotipos; de manera que esta puede ser la mejor forma para el efecto protector de bajos niveles de productos microbianos que interactúan con CD14. Aunado a ello *Zhang y col., 2008*, indican que si este SNP puede modular la susceptibilidad a enfermedades alérgicas a través de su participación en la regulación de la IgE, y su efecto puede ser débil y dependiente de otros factores de riesgo ambientales coexistentes.

En el presente trabajo se encontró que existe relación entre los genotipos de este polimorfismo y la severidad de asma (definida según parámetros de GINA 2006), en nuestros resultados el genotipo heterocigoto (CT) fué el más predominante y se encontró

asociado al grado de Severo Persistente. Unido a ello *Kowal y col 2008*; proporcionan reportes de la asociación entre este polimorfismo y la severidad de asma, encontrando que la mayor frecuencia del alelo C se presenta en pacientes con asma moderada y severa, pero no en asma leve, dicha asociación difiere de los resultados obtenidos por *Woo y col., 2003* en sus grupos de pacientes con Asma y atópia.

Los Genotipos para el polimorfismo -159 C>T en el gen de CD14 y los parámetros respiratorios FEV₁ y FVC, han sido relacionados en algunos estudios; *LeVan y col., 2005*, revelan que los valores de estos parámetros fueron menores en sujetos con el genotipo (TT), al compararlos con el genotipo (CC) en granjeros no fumadores. En la presente investigación, se evidenció que el parámetro FEV₁ fué menor en los pacientes con Asma y EPOC (65,4±18; 51,7±24), al compararlo con el grupo control (107,4±15), dicha conducta es esperada ya que, en las enfermedades de obstrucción pulmonar esta parámetro se encuentra disminuido. De acuerdo a los parámetros planteados en (ATS 2004 y GINA 2006), los pacientes de este estudio presentan EPOC moderada y Asma moderada persistente.

Según *Keoki y col., 2005*; las respuestas a endotoxinas medioambientales parecen depender en parte del tiempo de la exposición, de la preexistencia de enfermedades pulmonares como asma, y de diferencias genéticas en los receptores envueltos en el reconocimiento de endotoxinas. Variaciones genéticas como SNPs y las disparidades étnicas, pudieran determinar el desarrollo de susceptibilidad a un fenotipo asmático, de manera que se trata de factores que influyen en forma diversa sobre poblaciones mezcladas producto de estratificación.

Los Polimorfismos genéticos en diferentes genes, entre ellos el -159 C>T en el gen de CD14, y específicamente sus variantes alélicas han sido asociadas con la susceptibilidad a los efectos del humo de cigarrillo (hábito tabáquico); particularmente en este trabajo se notó una clara diferencia, entre el número de paquetes de cigarrillo consumidos por año entre los pacientes (Asma $p<0,05$ y EPOC $p<0,001$), corroborándose así que los factores genéticos influyen junto a otros factores ambientales, sobre la susceptibilidad a los agentes oxidantes del cigarrillo. En la actualidad se sugiere que el receptor de dopamina se halla en alguna región del cromosoma 5, y pudiera encontrarse desequilibrio de ligamiento con el gen de CD14 u otros genes, que jueguen un rol en la dependencia a nicotina.

Aunado a ello *Rahman y col., 2006*; reportan que existen evidencias considerables de una mayor generación de EROs en la EPOC, generada por los oxidantes presentes en el cigarrillo, lo cual puede ser importante en la patogenia de esta enfermedad. Y en el mismo grupo de investigación, al cual está circunscrito este material, se reportó que la existencia de variantes genéticas en enzimas del metabolismo oxidativo como, isoenzimas de la Glutation S-transferasa, y Epoxi hidrolasa microsomal (mEPH), desintoxicantes de EROs, actúan como marcadores de susceptibilidad al desarrollo de Asma y EPOC, en la misma población analizada para este estudio (*Peña., 2008*). En este trabajo el porcentaje de aparición obtenido por los individuos con el genotipo (TT) para este polimorfismo, fué mayor (12 % vs 2 %) en el grupo de los no fumadores, comparado con los fumadores o ex-fumadores en pacientes con Asma, lo cual fué presentado por *Du y col., 2009* con una relación (25 % vs 8 %).

Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado por *He y col., 2004*; el declive de la función pulmonar en fumadores con una obstrucción media o moderada del

flujo aéreo, no se asocia significativamente con los genotipos de los dos polimorfismos paralelamente, sino de forma separada. Estudios epidemiológicos han encontrado relación entre el desarrollo de EPOC en fumadores y ex fumadores, donde solo un porcentaje entre 10-15 % de los fumadores han desarrollado EPOC con un grado significativo de severidad, sugiriendo susceptibilidad genética. La relación humo de cigarrillo-enfermedad respiratoria se conserva al referirse al desarrollo de Asma, debido a que un declive acelerado de la función pulmonar en pacientes con Asma se asociada al hábito tabáquico (*Jack., 2004*). Sin embargo, para este análisis, se puede considerar la respuesta a esteroides, como una de las causas que pudieran determinar el declive en la función pulmonar, en adultos en edad avanzada con EPOC o en jóvenes con Asma.

Aún cuando no pudo ser demostrada la relación genotipo-función (respuesta a esteroides), logramos aproximarnos de manera clara a la relación de los múltiples factores capaces de determinar el desarrollo de Asma y EPOC: desde la influencia de los conocidos polimorfismos genéticos (*London y col., 2007*), hasta las posibles alternativas en rutas de señalización de dos de los receptores posiblemente asociados con el desarrollo de las patologías en los individuos analizado; todos estos parámetros pudieran ser discutidos por separado o en conjunto para cada grupo de estudio. Todo ello con la finalidad de demostrar, que la complejidad del Asma y EPOC van a más allá de una influencia genética, de respuesta a tratamiento o rutas de traducción de señales a nivel de factores de translocación nuclear y represores de transcripción, sino de múltiples factores no evaluados en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

- ❖ El porcentaje de aparición de los genotipos del polimorfismo +647 G>G en el gen del Receptor de Glucocorticoide en nuestra población mestiza, presentó diferencias significativas al compararlo con la población caucásica.
- ❖ Las variantes alélicas del polimorfismo en la región promotora del gen de CD14, presentó significancia estadística ($p < 0,05$) sólo al comparar los sujetos con EPOC con el grupo control.
- ❖ El efecto biológico, resistencia celular a esteroides, no está asociado directamente con los dos polimorfismos SNP estudiados.
- ❖ El efecto de la dexametasona es mas efectivo que sus análogos ginsenoides, en la disminución de la producción de H_2O_2 y $TNF- \alpha$ en los pacientes con Asma y EPOC evaluados.
- ❖ El ensayo de ELISA en comparación con el de capacidad oxidativa, permitió observar más claramente el efecto de la dexametasona.

10. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores que consideren polimorfismos genéticos en genes implicados en los procesos inflamatorios se plantea:

- Estudiar la expresión y fosforilación del Receptor de Glucocorticoide, y analizar su asociación con el desarrollo de Asma y EPOC.
- Estimar los niveles de CD14s y su relación con el polimorfismo en la región promotora del gen de CD14, y con la severidad de ambas patologías.
- Ampliar el número de pacientes en los ensayos funcionales, de manera que se logren realizar análisis estadísticos claros.
- Realizar el análisis funcional de TLR-4, en los grupos: Asma, EPOC y controles, con lo cual se podría completar los estudios biológicos entre este receptor, y el de CD14 analizado.
- Llevar a cabo estudios de otros polimorfismos dentro del mismo gen número 5, para conocer cual es su papel dentro de la respuesta inflamatoria en Asma y EPOC.
- Ampliar el número de pacientes en los ensayos funcionales con las muestras de los pacientes, de manera que se logren realizar análisis estadísticos claros.

- Identificar a largo plazo, los pacientes que puedan beneficiarse de nuevas estrategias terapéuticas, y adaptar el tratamiento según el perfil genético del paciente (Farmacogenética).

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adcock, I., Chou, P., Durham, A., Ford, P. 2009. Overcoming steroid unresponsiveness in airways disease. *Biochem Soc T.* **37**: 824-829.
- Aldrey, O., De Stefano, M., Capriles, A. 2003. Prevalencia del Asma infantil en Caracas, ISAAC 2003. *Alergia, Asma e Inmunología.* **5**: 33-42.
- Baldini, M., Lohman, C., Halonen M., Erickson, R., Holt P., Martínez, F. 1999. A Polymorphism in the 5' Flanking Region of the CD14 Gene Is Associated with Circulating Soluble CD14 Levels and with Total Serum Immunoglobulin E. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**: 976-983.
- Barnes, P. Mechanism in COPD: Differences from Asthma. 2000. *CHEST.* **117**:10-14.
- Barnes, P. J., Shapiro, S. D., Pauwels, R. A. 2004. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: mecanismos moleculares y celulares. *Eur Respir J.* **5**: 76-95.
- Barnes, P., Cheng K., Page, C. 1998. Inflammatory mediators of Asthma. An Update. *Rev Pharmacol.* **50**: 517-572.
- Barnes, P., Adcock, I., 2003. How do corticosteroids work in asthma?. *Ann Intern Med.* **139**: 359-370.
- Buemann, B., Vohl, MC; Chagnon, M., y colaboradores. 1997. Abdominal visceral fat is associated with a BclII restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res.* **5**:186-192.
- Cheng, Yu C., Chen, Yang P. 2004. Genetic polymorphism of epoxide hidrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J.* **23**: 818-824
- Choudhry, S., Avila, P., Nazario, S., Ung, N., Kho, J., Rodríguez, J. y colaboradores. 2005. Asthma Severity and Immunoglobulin E Levels in Latinos with Asthma. *Am J Resp Crit Care.* **172**: 174-182.
- Corvol, H., Nathan, N., Charlier, C., Chadelat, K., Le Rouzic, P., Tabary, O. y colaboradores. 2007. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression of lung disease in young patients with cystic fibrosis. *Respir Res.* **8**: 1-9.
- DeLeo, F., Quinn, M. 1996. Assembly of the Phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Lekocyte Biol.* **60**: 677-692.

- DeRijk, R.H., De Kloet, E.R. 2008. Corticosteroid receptor polymorphisms: Determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol.* 1-9.
- Du, J., Li, Min., Zhang, D., Zhu, X., Zhang, W., Gu, W. y colaboradores. 2009. Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 4: 1-11.
- Eilertsen, K., Olsen, J., OSTERUD, B. 2003. Association of the -159 C-T polymorphism in the CD14 promoter with variations in serum lipoproteins in healthy subjects. *Blood Coagul Fibrin.* 14: 663-670.
- Fleury, I., Beaulieu, P., Primeau, M., Labuda D., Sinnett, D., Krajcinovic, M. 2003. Characterization of the Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene. *Clin Chem.* 49: 1528-1531.
- Gonzales, S., Wendell, A., Palacios, M. 2003. Estudio farmacognóstico y actividad anti-inflamatoria del fruto de *Averrhoa carambola L.* Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Lima, Perú. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/sdx/sisbib/fiche.xsp?base=documents&id=sisbib.2003.gonzales_sw-principal. [Consulta el 5 de Abril de 2009].
- Goyert, SM., Ferrero, E., Rettig, WJ., Yenamandra, AK., Obata, F., Le Beau, MM. 1988. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science.* 239: 497-500.
- Franchimont, D., Martens, H., Hagelstein, M., Louis, E., Dewe, W., Chrousos, G., Belaiche, J., y colaboradores. 2009. Tumor Necrosis Factor a Decreases, and Interleukin-10 Increases, the Sensitivity of Human Monocytes to Dexamethasone: Potential Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2834-2839.
- Hanania, N. 1996. The Challenge of differentiation Asthma from Chronic Obstructive Pulmonary disease. *Med Educ Res.*
- Hawrylowicz, C., Richards, D., Loke, TK., Corrigan, C., Lee, T. 2002. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 109: 369-370.

- He, J., Ruan, J., Connett, J., Anthonisen, J., Paré, P., Sandford, A. 2002. Antioxidant Gene Polymorphisms and Susceptibility to a Rapid Decline In Lung Function in Smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **166**:323-328.
- Holloway, J.W., Beghe, B., Holgate, ST. 1999. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy.* **29**: 1023-1032.
- Hong, S., Kim, H., Kang, M., Lee, S., Kim, J., Kim, B., Jang, S. y colaboradores. 2007. The TNF- α (-308 G/A) and CD14 (-159 C/T) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **119**: 398-404.
- Horvath, G., Vass, S., Wanner, A. 2007. Inhaled corticosteroids reduces asthma-associated airway hyperperfusion through genomic and nongenomic mechanisms. *Pulm Pharmacol y Ther.* **20**: 157-162.
- Hunningkate, G., Wess, S., Celedón, J. 2006. Asthma in Hispanic. *Am J Respir Crit Care Med.* **173**:143-163
- Ito, K., Chung, F., Adcock, I. 2006. Update on glucocorticoid action and resistance. *J.Allergy Clin Immunol.* **117**: 522-543.
- Jack, E. 2004. The relationships between asthma and COPD: Lesson from transgenic mice. *CHEST.* **126**: 111-116.
- Karin, M. 1998. New twist in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable?. *Cell.* **93**: 487-490.
- Kedda, M.A., Lose, F., Duffy, D., Bell, E., Thompson, P.J., Upham, J. 2005. The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. *Thorax.* **60**: 211-214.
- Keoki, L., Ownby, D., Maliarik, M., Johnson, C., 2005. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **94**: 323-332.
- Kim, Sujong., Kang, Byung., Cho, Si Yong., SPNG, Dae., Chang, Hui., Yeom, Myung., Kim, Duk. y colaboradores. 2004. Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin. *Biochem Bioph Res Co.* **316**: 348-355.
- Kowal, K., Bodzenta-Lukaszyk, A., Pampuch, A., Szmitkowski, M., Zukowski S., Donati, M. y colaboradores. 2008. Analysis of -675 4G/5G SERPINE1 and C-159T

CD14 Polymorphisms in House Dust Mite-Allergic Asthma Patients. *J Investig Allergol Clin Immunol.* **18**: 284-292.

- Larocca, N. 2005. Polimorfismos de receptores semejantes a Toll 2 y 4 en pacientes con Asma Bronquial y EPOC. Tesis de Maestría, Instituto de Inmunología-UCV. Caracas, Venezuela.
- Lee, E.B., Kim, J.Y., Lee, Y.J., Song, Y.W. 2005. Glucocorticoid receptor polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **64**: 503-504.
- Leung, K., Cheng, Y., Mak, N., Chan, K., Fan, T.Wong, N. 2006. Signaling pathway of ginsenoside- Rg1 leading to nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS letters.* **580**: 3211-3216.
- Leung, TF., Tang, NLS., Sung, YM., Li, AM., Wong, GWK., Chan, IHS. Y colaboradores. 2003. The C-159 T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. *Pediatr Allergy immu.* **14**: 255-260.
- LeVan, T., Bloom, J., Bailey, T., Karp, C., Halonen, M., Martínez, F y colaboradores. 2001. A common Single Polymorphism in the CD14 Promoter Decreases the Affinity of Sp Protein Binding and enhances Transcriptional Activity. *J Immunol.* **167**: 5838-5844.
- LeVan, T., Von, S., Romberger, D., Lambert, P., Martínez, F. Vásquez, M. y colaboradores. 2005. Polimorfismos in the CD14 gene associated with Pulmonary Function in Farmers. *Am J Respir Crit Care Med.* **17**:773-779.
- Leynaert, B., Guillaud- Bataile, M., Soussan, D., Benessiano, J., Guenegou, A., Pin, I. 2006. Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 C-159 T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol.* **118**: 658-665.
- Lin, J., Yong-ming, Y., Ning, D., Jia-ke, C., Yan, Y., Xiao-xia, H. y colaboradores. 2008. Influence of CD14 polymorphism on CD14 expression in patients with extensive burns. *BURNS XXX*: 1-7.
- London, S. 2007. Gene-Air Pollution interaction in Asthma. *Proc Am Thorax Soc.* **4**:217.

- Los, H., Koppelman, G.H., Postma, D.S. 1999. The importance of genetics influences in Asthma. *Eur. Respir J.* **14**: 1210-1227.
- Luque, J., Herráez, A. 2005. Secuenciación del Genoma y Proyecto Genoma. En *Biología Molecular e Ingeniería Genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencia de la salud*. Madrid: Harcourt: 233-341.
- MacNee, W. 2000. Oxidants/Antioxidants and COPD. *CHEST.* **117**:303-317.
- Martinez, FD. 2007. CD14, Endotoxin, and Asthma Risk Actions and Interactions. *P Am Thorac Soc.***4**: 221-225.
- Meiler, C., Mühlbauer, M., Johann, M., Hartmann, A., Schnabl, N., Wodarz, N. y colaboradores. 2005. Different effects of the CD14 gene polymorphism on disease outcome in patients with alcoholic liver disease and chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol.* **11**: 6031-6037.
- Meyers, D., Larj, J., Lange, L. 2002. Genetic of Asthma and COPD: Similar Results for Different Phenotypes. *CHEST.* **126**: 105-110.
- Murray, J.C., Smith, R.F., Ardiner, H.A., Weinberger, C.1987. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) IOCae at. *Nucleic Acids Res.* **15**: 6765.
- Penden, D. 2005. The epidemiology and genetics of Asthma risk associated with air pollution. *J Allergy clin Immunol.* **115**: 213-219.
- Perttunen, H., Moilanen, E., Zhang, X., Barnes, P., Kankaanranta, H. 2006. β 2. Agonists Potentiate Corticosteroid- Induced Neutrophil Survival. *J Chron Dis.* **5**: 163-169.
- Peña, J. 2008. Polimorfismos genéticos de enzimas del metabolismo oxidativo y Alpha₁ Antitripsina en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y Asma Bronquial. Tesis de Licenciatura, Instituto de Inmunología-UCV. Caracas, Venezuela.
- Rahman, I., Adcock, I.M. 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.* **28**: 219-242.
- Rosmond, R., Chagnon, Y.C., Holm, G., Chagnon, M., Pérusse, L., Lindell, K. Y colaboradores. 2000. A Glucocorticoid Receptor Gene Marker Is Associated with Abdominal Obesity, Leptin, and Dysregulation of the Hypothalamic- Pituitary- Adrenal Axis. *Obes Res.* **8**: 211-218.

- Tálamo, C., De Oca, M., Halbert, R., Pérez, R., Jardim, J., Muriño A. y colaboradores. 2007. Diagnostic labeling of COPD in five American Cities. *CHEST*. **131**: 60-67.
- Tissing, W., Meijerink, J., Den Boer, M., Brinkhof, B., van Rossum, E., van Wering, E. y colaboradores. 2005. Genetic Variations in the Glucocorticoid Receptor Gene are not related to Glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* **11**:6050-6056.
- Ugenskiene, R., Sanak M., Sakalauskas, R., Szezeklik, A. 2005. Genetic polymorphisms in Chronic Obstructive pulmonary disease. *Medicina (kaunas)*. **41**: 17-22.
- Van Rossum, E.F., Koper J.W, Van den Beld, A.W., Uitterlinden, A.G., Arp, P., y colaboradores. 2003. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensibility to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*. **59**: 585-92.
- Wang, Z., Frederick, J., Garabedian, M. 2002. Deciphering the Phosphorylation "Code" of the Glucocorticoid Receptor *in Vivo* *J. Biol. Chem.* **277**: 26573-26580.
- Wayne, Daniel. 1998. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial LIMUSA S.A. Tercera edición, México.
- Woo, J., Assa, A., Helzer, A., Bernstein, J., Khurana, G. 2003. The -159 C→T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* **112**: 438-444.
- Zhang, G., Goldblatt, J., LeSouf, P. 2008 Does the relationship between IgE and the CD14 gene depend on ethnicity?. *Allergy*. **63**: 1411-1417.
- <http://ivic.ve/microbiología/cesaan/> Cesaan Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. [Consulta el 20 de Julio de 2009].
- <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hallatschek-werner-2004-10-20/HTML/chapter1.html>. [Consulta el 10 de Abril de 2009].
- <http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/perez/p10.jpg>. [Consulta el 18 de junio de 2009].
- <http://www.igb.es/cromosomas/cromosoma5.html>. [Consulta el 20 de agosto de 2009].

- <http://www.elisa-assay.com/ch5.html>. [Consulta el 1 de julio de 2009].
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. [Consulta el 5 de octubre de 2009].
- <http://www.Lynnon.com/pc/frameoa.html>. [Consulta el 7 de octubre de 2009].

12. ANEXOS

Anexo 1: Clasificación de la Severidad de Asma (GINA 2006)

Escalón 1: Leve Intermitente
Síntomas menos de 1 vez por semana Exacerbaciones breves Síntomas nocturnos no más de dos veces al mes $FEV_1 \geq 80\%$ del de referencia Variabilidad del $FEV_1 < 20\%$
Escalón 2: Leve Persistente
Síntomas más de 1 vez a la semana pero menos de 1 vez al día Exacerbaciones que pueden afectar la actividad y el sueño Síntomas nocturnos más de dos veces al mes $FEV_1 \geq 80\%$ del de referencia Variabilidad del $FEV_1 20-30\%$
Escalón 3: Moderado Persistente
Síntomas a diario Exacerbaciones que pueden afectar la actividad y el sueño Síntomas nocturnos más de una vez a la semana Uso diario de beta-2 agonistas de acción corta $FEV_1 60-80\%$ del de referencia Variabilidad del $FEV_1 > 30\%$
Escalón 4: Grave Persistente
Síntomas a diario Exacerbaciones frecuentes Síntomas nocturnos frecuentes Limitaciones de actividad física $FEV_1 < 60\%$ de referencia Variabilidad del $FEV_1 > 30\%$

Global Estrategy for Asthma Management and Prention

NIH publication No.02-3659, Issued January, 1995 (undated 2002)

Management Segment (Chapter 7): Undated 2004 from the 2003 document.

The GINA reports are available on www.ginasthma.org

Anexo 2: Clasificación de EPOC por la Asociación Americana del Tórax (ATS, 2004)

Estadio	Características
0: En riesgo	<ul style="list-style-type: none"> . Espirometría normal . Síntomas crónicos (Tos, aumento de la producción de esputo)
I: EPOC leve	<ul style="list-style-type: none"> . $FVE_1 / FVC < 70 \%$. $FEV \geq 80 \%$ de referencia . Con o sin síntomas crónicos (Tos, aumento de la producción de esputo)
II: EPOC moderado	<ul style="list-style-type: none"> . $FVE_1 / FVC < 70 \%$. $50 \% \leq FVE_1 < 80 \%$ de referencia . Con o sin síntomas crónicos (Tos, aumento de la producción de esputo)
III: EPOC grave	<ul style="list-style-type: none"> . $FVE_1 / FVC < 70 \%$. $30 \% \leq FVE_1 < 50 \%$ de referencia . Con o sin síntomas crónicos (Tos, aumento de la producción de esputo)
IV: EPOC muy grave	<ul style="list-style-type: none"> . $FVE_1 / FVC < 70 \%$. $FVE_1 < 30 \%$ de ref. o $FVC < 50 \%$ de ref. con insuficiencia respiratoria crónica o insuficiencia cardiaca derecha.

Celli BR, Mac Nee W. Standard for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS

Positions paper: Eur Respir J. 2004 ; 23 : 932-946

Anexo 3: Consentimiento informado autorizado por el Comité de Bioética del IDI.

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA Y CIRUGÍA DEL TORAX
CATEDRA DE PATOLOGÍA GENERAL Y FISIOPATOLOGÍA**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ C.I. _____
mayor de edad, residenciado en _____, en mi carácter de paciente
o de representante legal; habiendo sido informado de las características y beneficios del
estudio denominado **Determinación de los polimorfismos: +647 G>C en el en del
Receptor de Glucocorticoide y -159C>T en el gen de CD14, en pacientes con Asma y
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)**, autorizo a los investigadores para
incluirme en dicho proyecto.

Nombre legible y C.I. del paciente o representante

Firma del Paciente o representante legal

Nombre legible y C.I. del médico

Firma del médico

Anexo 4: Condiciones para envío de las muestras para su secuenciación



Secuenciación de ADN a partir de:

- Vectores de Cadena Simple (M13)
- Vectores de Cadena doble (plásmidos)
- Productos de PCR (purificados)
- Cósmicos
- Cromosomas Artificiales de Levadura (YAC)
- Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC)
- ADN genómico de Bacterias

El Laboratorio recibe el material genético como está indicado en la *Tabla 1* y el o los “primer” (s) por separado a una concentración de 5 pmol 7 ul

Las muestras pueden entregarse hidratadas (SOLAMENTE) en agua bidestilada esterilizada. No deben utilizar Tris-EDTA. Los materiales biológicos hidratados deben llegar al Laboratorio en condiciones de almacenamiento adecuadas (máximo 4 °C)

Las condiciones necesarias para la secuenciación son las siguientes:

- el éxito de la secuencia dependerá de la calidad del adn.
- la cantidad de adn necesaria para la secuenciación es de 5 µl, si la muestra esta bien concentrada, 10 µl – 15 µl si esta medianamente concentrada y 20 µl si la concentración del mismo es baja.
- las cantidades de adn que se exigen de acuerdo con el tipo y la extensión del templado son las siguientes:

Templado	Cantidad Optima de primer (pmoles)	Cantidad Total de ADN (ng)
Producto de PCR:	5	1 - 3
100 – 200 pb	5	3 - 10
200 – 500 pb	5	5 - 20
500 – 1000 pb	5	10 - 40
1000 – 2000 pb	5	20 - 50
> 2000 pb		

Anexo 5: Patrón de bandas del marcador de peso molecular $\phi X 174$ *Hae III*, utilizado en las electroforesis realizadas.

