

**PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO A(-444)C DEL GEN LTC4 SINTASA  
HUMANO EN CONTROLES SANOS Y PACIENTES PEDIATRICOS  
ASMÁTICOS EN UNA MUESTRA DE LA CIUDAD DE BOGOTA**

**LUZ MIRYAM SIZA FUENTES**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
FACULTAD: MEDICINA  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA**

**Bogotá, 2.010**

**PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO A(-444)C DEL GEN LTC4 SINTASA  
HUMANO EN CONTROLES SANOS Y PACIENTES PEDIATRICOS  
ASMÁTICOS EN UNA MUESTRA DE LA CIUDAD DE BOGOTA**

**LUZ MIRYAM SIZA FUENTES**

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de  
MAESTRIA en CIENCIAS CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA**

**Directora: Dra. HEIDI MATEUS ARBELAEZ**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
FACULTAD: MEDICINA  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
CON ENFASIS EN GENETICA HUMANA**

**Bogotá, 2.010**

**Dra. HEIDI MATEUS ARBELAEZ, M.D, MSc.**

**MEDICO GENETISTA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Dra. MARIA VICTORIA VILLEGAS, MSc**

**BIOLOGA**

**JURADO**

**Dra. CLAUDIA TAMAR SILVA, MSc**

**BIOLOGA**

**JURADO**

## **Dedicatoria**

*A Dios por ser artífice de mi vida, a mi familia que nunca me abandona cuando emprendo nuevos retos, a todas las personas que me rodearon calurosamente durante el desarrollo de este nuevo capítulo de mi vida y en especial a los pacientes con asma quienes hicieron posible la ejecución de este proyecto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Universidad del Rosario por el apoyo para la ejecución de este proyecto.*

*A la Dra Heidi Mateus por su valiosa dirección, dedicación, paciencia, apoyo al dirigir cada etapa del desarrollo de este trabajo y loable enseñanza.*

*A la Dra Dorita por el apoyo, compañía, enseñanza, dedicación y por su granito de arena dejado a lo largo de este proyecto.*

*A cada uno de los Docentes que hicieron parte en mi formación académica*

*A mi hijo por regalarme cada minuto de su niñez con el fin de poder alcanzar el reto propuesto*

*A mis compañeros Clarita, Andres, Andrea, Juan Andres Cladelis, Carolina por su apoyo, tiempo y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo.*

*A toda mi familia por su motivación y acompañamiento en los momentos difíciles*

*A los pacientes por su interés de participar y quiénes son los protagonistas principales ya que sin ellos no hubiese sido posible la ejecución del proyecto*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b> .....	<b>13</b>
2. 1 HISTORIA DEL ASMA.....	13
2. 2 ASMA.....	15
2.3. EPIDEMIOLOGIA DEL ASMA .....	15
2.4 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL ASMA.....	17
2.5 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO .....	19
<b>2.6 FENOTIPOS DEL ASMA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.1 Asma en la niñez</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.1.1 Sibilancias transitorias en la infancia</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.1.2 Sibilancias no atópicas en los niños y comienzo en la edad escolar</b> ..	<b>21</b>
<b>2.6.1.3 Sibilancias persistentes!</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.2 Asma en la adolescencial</b> .....	<b>22</b>
<b>2..2.1 Asma infantil de aparición tardía</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.2.2 Asma persistente desde la infancia hasta la edad adulta</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.3 Asma en Adultos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.3.1 Asma inducida por aspirina</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.3.2 Asma resistente a esteroides</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.4 Asma alérgica</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7 CLASIFICACIÓN DEL ASMA</b> .....	<b>24</b>
<b>2.8 FISIOPATOLOGIA DEL ASMA</b> .....	<b>25</b>
<b>2.9 CISTEINIL LEUCOTRIENOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.10 PROTEINA SINTASA LTC4</b> .....	<b>33</b>
<b>2.11 GENETICA DEL ASMA</b> .....	<b>34</b>
<b>2.12 GEN SINTASA LTC4 HUMANO</b> .....	<b>36</b>
<b>2.13 ESTUDIOS POBLACIONALES SOBRE LA REGION PROMOTORA DEL GEN</b> .....	<b>37</b>

<b>2.14 FARMACOGENETICA EN EL RECEPTOR CYSLT .....</b>	<b>40</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>47</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 GENERALES .....	48
4.2 ESPECÍFICOS .....	48
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	50
6.3 CRITERIOS DE SELECCION .....	50
<b>6.3.1. Criterios de inclusion.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3.2. Criterios de exclusión.....</b>	<b>51</b>
<b>7. METODOLOGIA .....</b>	<b>52</b>
7.1. OBTENCION MUESTRA DE ADN.....	52
7.2. MUESTRAS DE ADN.....	52
7.3 DETERMINACION DEL POLIMORFISMO A(-444)C DEL GEN LTC4 .....	53
7.4 ANALISIS ESTADISTICO .....	55
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
8.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA POBLACION DE ESTUDIO .....	56
8.2. ESTUDIO MOLECULAR .....	57
8.2.1 COMPARACION FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS ENTRE CASOS Y CONTROLES .....	57
8.2.2 COMPARACION FRECUENCIAS ALELICAS ENTRE EL PRESENTE ESTUDIO Y LAS REPORTADAS EN DIFERENTES PAISES.....	60
8.2.2.1 COMPARACION FRECUENCIAS GENOTIPICAS ENTRE EL PRESENTE ESTUDIO Y LAS REPORTADAS EN DIFERENTES PAISES.....	62
8.2.3 COMPARACION ENTRE EL GENOTIPO Y EL CUADRO CLINICO PRESENTE EN LOS PACIENTES ANALIZADOS.....	65

8. 3 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO .....	67
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
10. <i>CONCLUSIONES</i> .....	77
11. <i>RECOMENDACIONES</i> .....	79
<b>12. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>80</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>85</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatología del asma .....	27
Figura 2. Patogénesis del asma .....	29
Figura 3. Ruta de la biosíntesis de leucotrienos.....	32
Figura 4. Esquema gen LTC4 sintasa humano .....	37
Figura 5. Fragmentos amplificados y digeridos con la enzima MSPI. ....	54
Figura 6. Comparación frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles.....	59
Figura 6a. Comparación frecuencias alélicas entre casos y controles. ....	59
Figura 6b. Comparación frecuencias genotípicas entre casos y controles.....	59
Figura 7. Comparación entre el genotipo y el tipo de asma entre pacientes...66	

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores que contribuyen al desarrollo del asma .....	18
Tabla 2. Regiones cromosómicas involucradas con susceptibilidad al asma.....	35
Tabla 3. características generales de la población de estudio.....	56
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes y controles .....	60
Tabla 5. Comparación frecuencias alélicas controles sanos y pacientes asmáticos entre diferentes países.....	61
Tabla 5a. Comparación frecuencias alélicas controles sanos entre diferentes países.....	61
Tabla 5b. Comparación frecuencias alélicas pacientes asmáticos entre diferentes países.....	62
Tabla 6. Comparación frecuencias genotípicas controles y pacientes entre diferentes países. ....	62
Tabla 6a. Comparación frecuencias genotípicas controles sanos entre diferentes países.....	63
Tabla 6b. Comparación frecuencias genotipo pacientes asmáticos entre diferentes países.....	64
Tabla 7. Comparación frecuencias genotípicas controles sanos y pacientes asmáticos entre diferentes países .....	65
Tabla 8. Clasificación fenotípica del asma en los pacientes analizados.....	67
Tabla 9. Genotipo y características clínicas de los pacientes.....	68

## INTRODUCCION

El asma es una enfermedad crónica común caracterizada por síntomas respiratorios como disnea, tos, sibilancias y desordenes inflamatorios crónicos de la vía aérea la cual se obstruye y limita el flujo de aire por broncoconstricción, mucosidad e inflamación. Es causada por exposición a numerosos organismos, agentes biológicos y sintéticos. Por su frecuencia se constituye en un problema de salud pública y se ha estimado que existen aproximadamente 300 millones de personas en el mundo que la padecen afectando a todas las edades y grupos étnicos. Adicionalmente la prevalencia del asma se ha incrementado mundialmente, representando entre el 7 y el 10% de la población en los países industrializados. En Colombia se ha reportado una prevalencia global acumulada del 7.4%. El impacto en costos del manejo del asma excede, en los Estados Unidos, los 14 billones de dólares anuales, constituyéndose en una de las enfermedades más costosas para los sistemas de salud (GINA, 2006).

Actualmente existen varios fenotipos asociados con el asma y cuya etiología aún no ha sido relacionada con genes específicos. Hasta el momento se han identificado varias regiones cromosómicas ligadas al asma bronquial, entre las cuales se han descrito varios grupos de genes que codifican para ciertas citocinas (5q), el complejo mayor de histocompatibilidad (6p), la subunidad beta del receptor Fc $\gamma$  (11q), el interferón  $\gamma$  (12q) y el locus  $\alpha/\delta$  del receptor de células T (14q), las cuales están estrechamente relacionados con susceptibilidad al asma (Guarín, 2001).

Uno de los genes relacionado con la susceptibilidad y severidad de la enfermedad es el gen Sintasa LTC<sub>4</sub>S humano el cual se encuentra situado en 5q35. La LTC<sub>4</sub> sintasa es una glutatión transferasa de unión a membrana la cual se expresa solamente en células de origen hematopoyético y es la clave para que se lleve a cabo la síntesis de leucotrienos (LTs) los cuales son potentes mediadores pro-inflamatorios que promueven la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, el edema y el reclutamiento de eosinófilos en la vía aérea.

Estudios recientes han relacionado un polimorfismo bi-alélico en la región promotora del gen sintasa LTC<sub>4</sub> (A-444C) como un factor de riesgo para el asma, ya que la presencia del alelo mutante C es más frecuente en personas con asma inducido por aspirina y pacientes con asma severa.

Esta investigación pretende comparar la prevalencia del polimorfismo A(-444)C ubicado en la región Promotora del gen LTC<sub>4</sub> Sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos provenientes de una muestra de la ciudad de Bogotá.

## 2.- MARCO TEORICO

### 2.1 HISTORIA DEL ASMA

El término asma se deriva de la palabra griega *adqma* que significa jadeo, ahogo o dificultad respiratoria y fue empleado por primera vez por Homero en la Iliada. (Pierre, 2008). Desde el año 2600 a.c. el médico Chino Huang-you en su libro Nei Ching, usaba la planta Ma-Huang como medicamento ya que es una planta productora de la sustancia efedrina, la cual estimula los receptores B2 adrenérgicos permitiendo la broncodilatación de la vía aérea.

Hipócrates describió el asma como una enfermedad intolerante mucho más severa que una disnea simple. El asma se comparó con una convulsión epiléptica que se vio como un castigo divino. Asclepiades de Bithynia (75 A.C.) fue el primero en distinguir el carácter agudo y crónico de la enfermedad. Galeno y Aretaeus de Capadocia, observaron que el asma era más frecuente durante el invierno, y se presentaba principalmente en horas de la noche.

Después, Pérsico Avicenna, describe el uso de plantas aromáticas para el tratamiento del asma. Vetee, en años posteriores relata que el asma se desencadena por un frío común, presentándose con mayor frecuencia durante la estación de las lluvias, y por la polución del aire de la ciudad.

Hacia el siglo XII la Escuela de Salerno definió el asma como respiración dificultosa fuerte, con tos y sibilancias y sobre todo con gran estrechamiento y obstrucción del pulmón. Paracelsus, creyó que la enfermedad era el resultado de agentes externos y no de desequilibrios interiores. Realizó varias investigaciones,

sostuvo que el asma bronquial sólo se podía curar a través de las preparaciones líquidas o sustancias químicas y no por las hierbas; determinó el azufre como cura ya que este secaba la mucosidad del pulmón asmático.

Baptista Helmont, destacó que la enfermedad se localizaba primero en los bronquios y asoció el broncoespasmo con la inhalación del polvo. (Pierre, 2008). En 1698, John Floyer hizo referencia a la predisposición hereditaria de la enfermedad e identificó las "especies" de las diferentes asmas. Determinó los periodos convulsivos en los pacientes cuando se encontraban en presencia de los contaminantes y del humo Henry Hyde fue el primero en describir la patología y el tratamiento del asma clasificándolo como una dolencia "intrínseca". Hizo referencia a ciertas células presentes en la saliva del asmático como los eosinofilos, aportó como tratamiento el uso de la cafeína (Pierre, 2008).

Charles H. Blackley observó que las personas que sufrían de asma y rinitis pertenecían a clases sociales con el nivel socio-económico y cultural más alto. Su incidencia era menor entre los obreros rurales, hecho que atribuyó al nivel cultural bajo y la posibilidad que ellos desarrollaban inmunidad debido a la gran exhibición al polen. William B. Osler hizo referencia a la inflamación de la vía aérea en algunas personas cuando había presencia de bronquitis obstructiva.

En 1890 Carl Weigert, describió las características de los gránulos de los mastocitos, y creó el término "metacromasia". Dos años después identificó el eosinófilo con su citoplasma de gránulos acidófilos, encontrados previamente en la saliva de asmáticos (Pierre, 2008).

Hacia 1928, Wilhem Storm estudió el asma inducida por la aspirina, realizó un estudio en 100 pacientes asmático a los cuales suministró una dosis de aspirina y provocó la reacción pulmonar en 16 de los 100 pacientes analizados. En 1928 H.

Dekker relacionó ácaros y asma. Entre 1969–1974 se introdujeron los términos de "linfocina", monocina y citocina, relacionados como mediadores derivados de los linfocitos y monocitos. En el año 2000 se estableció la relación de los reguladores de linfocitos T en el asma. En el 2001 se identificó el primer gen relacionado con el asma y finalmente hacia el año 2003 se obtuvo el anticuerpo Monoclonal anti-IgE el cual es aceptado para el uso clínico en el tratamiento del asma alérgica moderada y severa persistente (Pierre, 2008).

## **2.2 ASMA**

El asma es una enfermedad crónica común de la vía aérea en donde varias células y elementos celulares juegan papeles importantes. Fisiológicamente se manifiesta por un estrechamiento generalizado de la vía respiratoria causado por inflamación crónica, mucosidad y broncoconstricción. Adicionalmente es una enfermedad episódica en la cual, las exacerbaciones agudas se intercalan con periodos asintomáticos que pueden durar desde unos minutos hasta horas. Se caracteriza por presentar un conjunto de eventos patológicos que provocan una función crónica anormal en la vía respiratoria causada por la reducción del diámetro de las vías respiratorias, contracción del musculo liso, congestión vascular, edema de la pared y presencia de secreciones firmes y espesas (GINA, 2005; Rojas, 2001; Harrison, 1994).

## **2.3 EPIDEMIOLOGIA DEL ASMA**

En los últimos años se ha observado un aumento en la prevalencia de la enfermedad debido al incremento de sensibilización atópica y a otras

enfermedades alérgicas. Los países mas afectados son Australia, Brasil, Perú, Nueva Zelanda, Reino Unido, Costa Rica, Canadá y Estados Unidos donde la prevalencia de este país es mayor al 10.1% del cual, 15 millones corresponden a adultos y 5 millones a niños. Seguido por países como Uruguay, Paraguay, Ecuador, Sudáfrica, Costa de marfil y Ucrania los cuales presentan una prevalencia del 7.6 al 10 %. Argentina, Chile, Kenia, Níger, Arabia, Turquía, Irán, España, Francia, Japón, Tailandia y Filipinas presentan una prevalencia del 5.1 al 7.5%, Colombia presenta una prevalencia del 7.4 %. Los países que presentan mas baja prevalencia son México, Rusia, Marruecos, Argelia, Etiopia, Portugal, Italia, Polonia, India, Pakistán, Malasia, Corea del Sur, Mongolia, Indonesia, Grecia y Bulgaria con una prevalencia del 2.5 al 5.0 % y algunos de los países sin estadística clara son: Madagascar, Bolivia, Venezuela, Nueva Guinea, Las Guyana, La Guayana Francesa, Suriname, Nicaragua, Honduras, Guatemala, el Salvador y Belice (Masoli et al, 2004).

La tasa de mortalidad por asma entre países se ha podido determinar gracias a los estudios realizados en pacientes con edades comprendidas entre 5 a 34 años de edad, debido a que es más claro poder establecer el diagnóstico de asma a partir de los 5 años puesto que a edades inferiores se puede confundir con cualquier otro tipo de enfermedad respiratoria permitiendo de esta forma sesgar los datos estadísticos relacionados con tasa de mortalidad para esta entidad (Masoli et al, 2004).

Este planteamiento fue respaldado por una validación de estudio basado en datos de 14 países en 7 regiones. Los datos demostraron que las tasas de mortalidad del asma entre los 5 y 34 años se encuentran en un promedio del 89% según los informes derivados de la OMS. Las tasas más altas de mortalidad se encuentran en países como China la cual presenta un 36.7 % seguido de Rusia con un

28.6%. Los países que presentan las tasas más bajas de mortalidad son Brasil, Canadá y Finlandia con un 1.6%. En Colombia se presenta un 10.1% de Mortalidad (GINA, 2005; Masoli et al, 2004).

Se estima que el asma afecta aproximadamente a 300 millones de individuos de todas las edades y grupos étnicos a nivel mundial. La mitad de los casos aparecen antes de los 10 años de edad y otra tercera parte antes de los 40. En la infancia existe una relación varones: mujeres 2:1 que se iguala hacia los 30 años de edad (GINA, 2006; GINA, 2005).

## **2.4 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL ASMA.**

La reacción asmática se caracteriza por dificultad respiratoria la cual es causada por exposición a numerosos factores ambientales como humo de cigarrillo, polen, ácaros, polvo casero, pelos de animales, ejercicio, sustancias industriales, contaminantes del aire como el ozono, dióxido de sulfuro, óxido de nitrógeno, compuestos orgánicos volátiles e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Infecciones virales, fármacos como la aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos, colorantes, conservantes de alimentos, factores laborales (sales metálicas, polvo de madera y vegetales, productos industriales y plásticos, detergentes) y el componente genético el cual se estima que varía entre el 36 % y el 79 %. (Tabla 1). Se clasifica como una enfermedad multifactorial donde interfieren múltiples genes e influencia ambiental. Se ha estudiado la participación de diferentes regiones cromosómicas, en Colombia el 53% de quienes sufren de asma tienen antecedentes familiares. Por lo tanto es de gran importancia conocer el componente genético de esta entidad debido a que existen un gran número de genes relacionados con exposición a alérgenos los cuales son regulados en distintos loci (GINA, 2006; McCunney, 2005; Weiss y Raby, 2004).

FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL ASMA				
FACTORES AMBIENTALES	FARMACOS	FACTORES LABORALES	INFECCIONES VIRALES	OTROS
Ejercicio	aspirina	Sales metalicas	Rinivirus	Tamaño de la familia
Polen	antiinflamatorios no esteroideos	Polvo de madera	Coronavirus	obesidad
Ácaros	beta bloqueadores	vegetales	Influenza	Infecciones por parásitos
polvo casero	Dipidamole	Enzimas pancreaticas	Parinfluenza	Estado socioeconómico
pelos de animales	Drogas nebulizantes (beclometasona,pe ntamidina)	latex	Virus respirtocio sincitial	dietas
Humo de cigarrillo	Nitrofuranteina	Producción de alimentos(café, té, conservantes)	Adenovirus	higiene
Sustancias industriales	Propafenona,	Producción de detergentes	<b>INFECCIONES BACTERIANAS</b>	clima
contaminantes del aire	protamina	Desinfectantes	Clamidia y micobacterias	Componente genético

Tabla 1. Factores que Contribuyen al desarrollo del asma.

## 2.5 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO.

El asma es una entidad difícil de diagnosticar ya que presenta síntomas similares a los que ocurren en otras enfermedades tales como reflujo gastrointestinal,

rinosinusitis, desórdenes alérgicos, fibrosis quística, laringotraqueomalacia, displasia broncopulmonar, bronqueolitis, fístula traqueo esofágica, inmunodeficiencia cardíaca, y aspiración de cuerpo extraño siendo uno de los impedimentos para poder iniciar un tratamiento efectivo y de alguna forma lograr la prevención de la enfermedad. Con el fin de evitar la confusión con otras enfermedades se han usado criterios clínicos comunes para el diagnóstico del asma los cuales incluyen:

- Síntomas e historia médica de tos principalmente durante la noche, disnea recurrente y dificultad respiratoria.
- Test de espirometría el cual permite evaluar la función pulmonar valorando la severidad, reversibilidad y variabilidad del flujo de aire que puede ser inhalado y exhalado.
- Test de repuesta a broncodilatador donde se analiza la presencia de obstrucción de la vía aérea y la buena respuesta al broncodilatador aumentando el volumen de expiración forzada en un segundo mayor al 12%.
- Test de cambio de inhalación con metacolina el cual estimula directamente el musculo liso de la vía aérea induciendo un decrecimiento en el volumen de expiración forzada en un segundo en más del 20%, un cambio positivo del test de metacolina ( $PC_{20} < 4\text{mg/mL}$ ) indica hiperrespuesta de la vía aérea. Es de gran ayuda en pacientes con sospecha de asma y espirometria normal.
- Imagen radiográfica donde estas se encuentran normales en pacientes con asma (McCormack y Enright, 2008; GINA, 2006; Padula et al, 2001).

- Exámenes de apoyo diagnóstico como conteo de eosinófilos en sangre periférica, esputo, frotis nasal, cuantificación de inmunoglobulina E total; pruebas de alergia dérmicas y serológicas (RAST y/o ELISA), las cuales constituyen una herramienta importante para evaluar el componente alérgico del asma y orientar las medidas de prevención y tratamiento.

En muchos casos el diagnóstico de asma se hace al poner en conjunto los síntomas y signos del paciente con la historia personal y familiar. En otros pacientes en especial en los menores de 5 años se realiza teniendo en cuenta la evolución en el tiempo. En casos dudosos la respuesta al tratamiento médico con antagonistas  $\beta_2$  de acción corta y esteroides inhalados pueden soportar el diagnóstico de asma (Padula et al, 2001)

## **2.6 FENOTIPOS DEL ASMA**

### ***2.6.1 Asma en la Niñez***

En la mayoría de los niños, los síntomas del asma y dificultad para respirar mejoran con la edad pero en un 30-40% continúan con episodios recurrentes hasta la edad adulta, niños con alto riesgo de desarrollar asma tienen una historia familiar, pero la historia materna está más asociada con susceptibilidad en los niños que en las niñas. (Bel, 2004). A la vez el asma en la niñez se puede dividir en tres partes.

### ***2.6.1.1 Sibilancias transitorias en la infancia***

Este fenotipo no tiene una historia familiar de asma, el pronóstico de estos niños es favorable, pero afecta la función pulmonar en el momento del nacimiento.

### ***2.6.1.2 Sibilancias no atópicas de los niños y comienzo en la edad escolar***

Afecta niños hacia los tres años de edad, aproximadamente el 40% no son atópicos, después inician con una historia de infecciones virales del tracto respiratorio bajo y presentan más probabilidad de desarrollar obstrucción de la vía aérea, son personas que responden muy bien a la terapia con antagonistas de los leucotrienos.

### ***2.6.1.3 Sibilancias persistentes***

Se presenta en los primeros 10 años de vida, se asocia con altos niveles de atopia, respuesta bronquial y alteración de la función pulmonar por exposición a alérgenos, virus, bacterias y parásitos, estos son los fenotipos más comunes que se encuentran en la niñez y que son los responsables del desencadenamiento de esta enfermedad (Bel, 2004)

### ***2.6.2 Asma en la adolescencia.***

Se clasifica en asma persistente desde la infancia hasta la edad adulta y asma infantil de aparición tardía.

#### ***2.6.2.1 Asma infantil de aparición tardía.***

Afecta principalmente a las mujeres pero en muy baja proporción, se presenta una hiper respuesta bronquial durante la pospubertad comparado con la prepubertad.

#### ***2.6.2.2 Asma persistente desde la infancia hasta la edad adulta.***

Presenta síntomas durante la pubertad y durante la vida adulta, hay proceso inflamatorio en la vía aérea y sibilancias durante toda la vida. (Bel, 2004).

### **2.6.3 ASMA EN ADULTOS**

#### ***2.6.3.1 Asma inducida por aspirina (AIA)***

Es un fenotipo importante inducido por aspirina y otras drogas anti-inflamatorias no esteroideas. Se estima que la prevalencia es aproximadamente del 10-20% del asma presente en la población adulta y la enfermedad es más severa en mujeres

que en hombres. La frecuencia de atopia es baja pero el fenotipo está asociado con eosinofilia, rinosinusitis, pólipos nasales y niveles incrementados de cisteinil leucotrienos y expresión incrementada de CYSLTR1 sugiriendo patogénesis exactamente por respuesta inflamatoria (Kiley et al, 2007; Kim et al, 2005; Kedda et al, 2004; Bel, 2004).

### **2.6.3.2 Asma resistente a esteroides.**

Es otro fenotipo de gran importancia y se ha visto que en un 10% de los pacientes que son resistentes a glucocorticoides tienen una pobre respuesta a la terapia con glucocorticoides y experimentan exacerbaciones frecuentes y síntomas continuos. Este tipo de resistencia puede ser inducido por varios mecanismos dentro de los cuales se encuentra la densidad disminuida del receptor glucocorticoide, afinidad distorsionada del ligando por el receptor y la expresión incrementada de los factores de transcripción inflamatorios. Se ha observado que la resistencia a esteroides en el asma es adquirida en un 95% de los pacientes y que representa varios subtipos dependiendo del blanco genético del hospedero (Kiley et al, 2007; Bel, 2004).

### **2.6.4 ASMA ALÉRGICA.**

La sensibilización alérgica es la base de este tipo de asma y es frecuente tanto en niños como en adultos. Las personas que presentan este fenotipo experimentan comúnmente sus primeros síntomas en la niñez. La fase temprana de la respuesta es provocada en individuos atópicos, los cuales se caracterizan por liberar

mediadores recientemente sintetizados como leucotrienos, histamina, prostaglandinas y citocinas que inducen broncoconstricción y edema.

La fase tardía es caracterizada por el influjo y activación de linfocitos y otras células inflamatorias que incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias. La respuesta inflamatoria es mediada por linfocitos tipo 2 o T ayudadores y citocinas, pero en estos pacientes hay una mala adaptación en la respuesta a los linfocitos T ayudadores los cuales juegan papel importante en la patobiología de la enfermedad, incrementando la evidencia de otras armas del sistema inmune que contribuyen a la patogénesis del asma como es el caso de los linfocitos Tipo 1 y células natural Killer (Kiley et al, 2007; Bel, 2004).

Existen otros fenotipos relacionados con asma como es el asma inmunológica, la cual es causada por el desencadenamiento de la respuesta inmune ya sea por presencia de alérgenos o por presencia de parásitos; también se encuentra el asma inducida por irritantes, entre otros (Bel, 2004).

## **2.7 CLASIFICACION DEL ASMA.**

Tradicionalmente los grados de síntomas, limitación del flujo de aire, y la variabilidad en la función pulmonar han permitido clasificar el asma dependiendo de la severidad. Por lo tanto el asma alérgica se puede clasificar de dos formas, en Intermitente (asma leve intermitente) y Persistente (asma leve persistente, Moderada persistente y Severa Persistente) según la severidad (GINA, 2006; GINA, 2005).

El asma leve intermitente se caracteriza por síntomas intermitentes menos de una vez por semana, exacerbaciones breves, síntomas nocturnos menos de 2 veces por mes, VEF1 y FEP  $\geq$  80%, variabilidad del FEP y VEF1  $<$  20%.

El asma leve persistente, presenta más de un síntoma una vez por semana, pero menos de una vez al día, las exacerbaciones afectan la actividad y el sueño, síntomas nocturnos más de 2 veces por mes. FEV1 y PEF  $\geq$  80%, variabilidad del FEP y VEF1 entre el 20-30%.

El asma moderada persistente, se caracteriza por presentar síntomas diarios, las exacerbaciones afectan la actividad y el sueño, los síntomas nocturnos son mas de una vez por semana, uso diario de inhaladores B2 agonistas de corta acción, FEV1 y PEF 60-80%, variabilidad del FEP y VEF1  $>$ 30%.

Asma severa persistente: presenta síntomas diarios, exacerbaciones frecuentes, síntomas de asma frecuentes en la noche, hay limitaciones en las actividades físicas, Múltiple medicación de base tomada diariamente; se recomiendan altas dosis de corticosteroides inhalados, y broncodilatadores de larga acción, el FEV1 y PEF es  $\leq$  60-80% y la variabilidad del PEF y FEV1 es  $>$ 30% (GINA, 2006; GINA, 2005).

## **2.8 FISIOPATOLOGIA DEL ASMA.**

El asma es una enfermedad inflamatoria por excelencia, en la que intervienen varios grupos celulares, principalmente mastocitos, eosinófilos y linfocitos, con una

contribución menor de, neutrófilos, macrófagos y epitelio bronquial. Estas células producen una compleja red de mediadores químicos al ser activadas, las cuales son responsables de la obstrucción e hiperreactividad características de la enfermedad (McCunney, 2005).

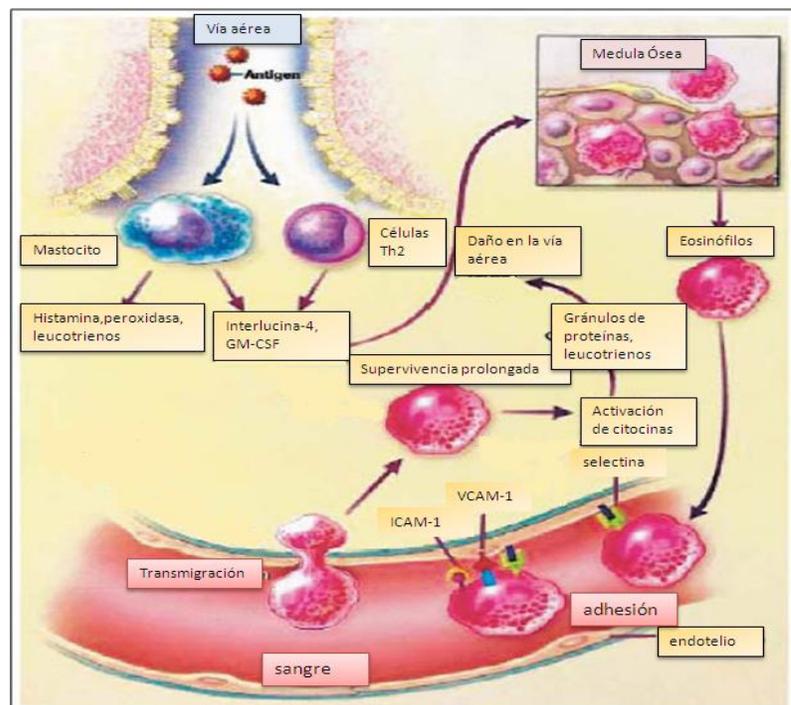
Una vez exista la exposición de un alérgeno se inician dos fases inflamatorias. Una temprana que aparece en el transcurso de minutos y otra tardía que se presenta después de 6 horas. Los mastocitos residentes en la pared del bronquio constituyen los principales efectores de la respuesta temprana formando complejos con IgE en la superficie de los mastocitos y de esta forma activándolos (Paredes, 2008)

Estas células liberan mediadores inflamatorios como histamina, peroxidasas y adenosina las cuales induce broncoconstricción, vasodilatación, edema y aumento en la producción de moco. De igual forma, produce otros compuestos de novo, como leucotrienos C4, D4 y E4, factor activador de plaqueta, prostaglandinas, factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos, factor de necrosis tumoral, interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 6 (IL-6), que relacionan al mastocito también con la respuesta tardía del asma. La liberación de factores quimiotácticos atrae linfocitos T y eosinófilos, los cuales son las células mediadoras de la respuesta inflamatoria tardía. (Paredes, 2008; Harrison, 1994)

La Respuesta inflamatoria tardía involucra células T las cuales producen una serie de citocinas que estimulan eosinófilos y linfocitos B, perpetuando la cadena inflamatoria característica de la fase tardía del asma. Los eosinófilos aparecen en la pared del bronquio 4 horas después de la exposición al estímulo alérgico y el reclutamiento máximo aparece a las 24 horas.

Estas células proceden de la médula ósea donde maduran bajo la acción de IL-3, IL-5 y factores estimulantes de colonias granulocíticas macrófagos. Los eosinófilos también poseen múltiples compuestos preformados, la mayoría de los cuales son Proteasas que inducen daño tisular y provocan denudación del epitelio bronquial.

Una vez los eosinófilos se encuentren en sangre periférica, son atraídos rápidamente hacia los tejidos por medio de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 y TNF-a). Las cuales aumentan la producción de inmunoglobulina E (IgE), favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular conllevando a una eosinofilia, liberadas principalmente por los linfocitos T. Poco después de alcanzar el órgano blanco comienza el proceso de degranulación y muerte celular. (Paredes, 2008; Harrison, 1994). (Figura 1)



**Figura 1. Fisiopatología del asma.**  
[http://cursweb.educadis.uson.mx/payala/ciencias/Respiratorio/EnfermedadesRespiratorias\\_archivos/image001.png](http://cursweb.educadis.uson.mx/payala/ciencias/Respiratorio/EnfermedadesRespiratorias_archivos/image001.png) . Modificada.

Los datos fisiopatológicos característicos del asma son la reducción del diámetro de las vías respiratorias por la contracción del músculo liso, congestión vascular, edema de la pared y presencia de secreciones firmes y espesas. El resultado final es un incremento de la resistencia de las vías respiratorias, a causa de la disminución de los volúmenes espiratorios forzados, velocidad del flujo, hiperinflamación pulmonar, aumento del trabajo de la respiración, alteraciones de la función de los músculos respiratorios, distribución anormal de la ventilación y flujo sanguíneo pulmonar con desequilibrio de sus relaciones y alteración de los gases arteriales (Harrison, 1994).

La patogénesis del asma se relaciona con procesos inflamatorios crónicos de las paredes de la vía aérea llevando a limitación en el flujo del aire. La única forma de obtener información sobre la patología del asma es mediante el análisis de tejido post mortem (Barnes, 1983)

Macroscópicamente en los pacientes que han tenido asma se puede observar en el pulmón un proceso inflamatorio crónico con mezcla de moco, proteínas séricas, células inflamatorias y células muertas. Microscópicamente se encuentra inflamación extensiva del lumen de la vía aérea, presencia de eosinófilos, linfocitos, alteración del epitelio, aumento en el tamaño del músculo liso y vasodilatación, permitiendo de esta forma evidenciar la fuga microvascular y disrupción epitelial conllevando a la broncoconstricción de la vía aérea. Adicionalmente existen mediadores pro-inflamatorios sintetizados de novo que contribuyen a la patogénesis del asma como es el caso de los cisteinil leucotrienos, los cuales son de gran interés en la fisiopatología de esta enfermedad (GINA, 2005; Barnes, 1983). (Figura 2)

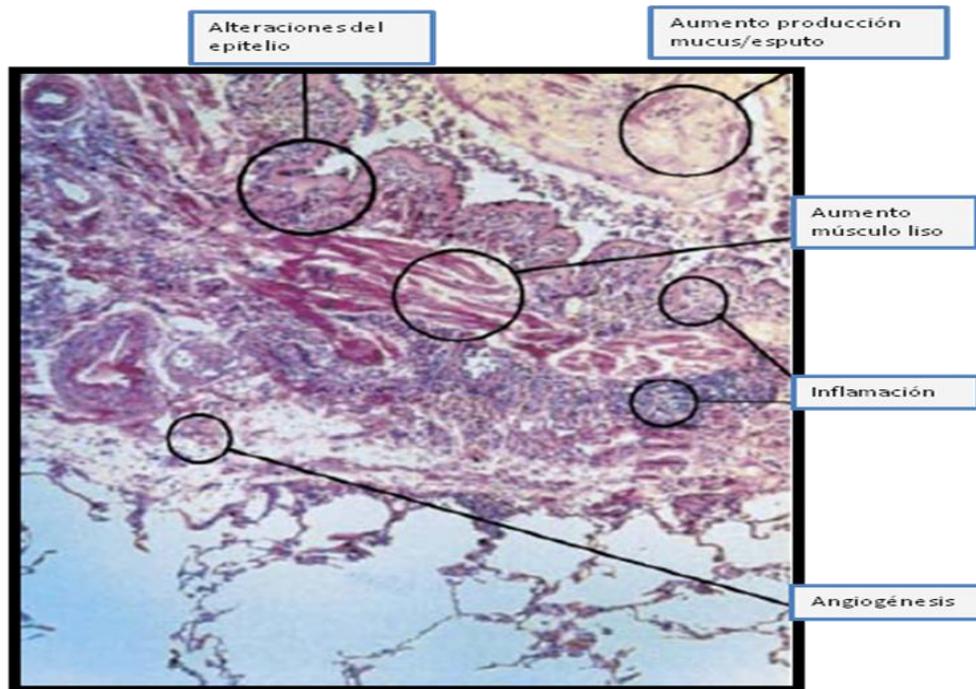


Figura 2: Patogénesis del asma. <http://www.scai.cl/cursos%20alergia/12>.

## 2.9 CISTEINIL LEUCOTRIENOS

Los leucotrienos son una familia de ácidos grasos bioactivos que fueron originalmente identificados en la década de los 70s, se encuentran en células RBL-1, y línea de células leucocitarias. Ellos derivan de las membranas oblicuas que constituyen al ácido araquidónico y son miembros de un grupo grande de biomoléculas conocidas como eicosanoides (Drazen, 1998)

Los cisteinil leucotrienos (Cys-LTs) son potentes mediadores proinflamatorios que promueven la contracción del musculo liso, reducción de la función pulmonar, hipersecreción de moco, edema y reclutamiento de eosinófilos en la vía aérea,

además estimulan el ciclo celular y la proliferación tanto de células hematopoyéticas como del músculo liso (Kedda et al, 2004; Pillai et al, 2004).

El proceso Inflamatorio se desarrolla gracias a la biosíntesis de leucotrienos a partir de células como basófilo, monocitos, macrófagos y eosinófilos por un incremento en el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular y activación de la fosfolipasa A2 citosólica (PLA2). Posteriormente hay translocación de la fosfolipasa A2 (PLA2) citosólica por la membrana perinuclear permitiendo la liberación de Ácido araquidónico por la membrana fosfolipídica.

El Ácido araquidónico es convertido posteriormente por acción de la proteína Activadora de la 5- lipooxigenasa y la enzima 5-lipooxigenasa en 5-HPETE (ácido 5, hidroxiperoxi-eicosatetraenoico) y subsecuentemente a cisteinil leucotrieno A4 (LTA4). Luego la Sintasa LTC4 conjuga LTA4 con la glutatión transferasa (GSH) para formar cisteinil leucotrieno C4 (LTC4). El clivaje secuencial del ácido glutámico y glicina por la glutatión transferasa permite el transporte transmembrana del leucotrieno LTC4 que posteriormente es convertido en leucotrieno D4 y E4 (Lam, 2003; Lam y Austen, 2002)

Los leucotrienos ejercen su acción biológica por unión y activación a los receptores Cisteinil Leucotrienos 1 y 2, Los cuales pertenecen a la clase de receptores de acoplamiento a proteína G. El receptor cisteinil leucotrieno 1 (CYSLTR1) conocido como LTD<sub>4</sub> o LTR<sub>d</sub> es una proteína asociada a la membrana, pesa 45 Kd, el gen se encuentra localizado en el cromosoma X, además fue reportado por estar expresado en mayor proporción en células del músculo liso del pulmón humano, eosinófilos y monocitos de sangre periférica, la estimulación del receptor resulta en constricción del músculo liso (Pillai et al, 2004; Drazen, 1998).

Este receptor es específico de antagonistas leucotrienos como montelukast, zafirlukast y pranlukast los cuales son actualmente utilizados para controlar la broncoconstricción y la inflamación en pacientes asmáticos. (Figura 3).

Estudios clínicos han demostrado que la respuesta clínica a antagonistas CYSLTR1 es altamente variable y cerca del 30 % de los pacientes asmáticos no responden al tratamiento.

El receptor cisteinil leucotrieno tipo 2 (CYSLTR2) conocido como  $LTB_4$  o  $LTR_c$ , se encuentra en el musculo liso vascular del pulmón humano y está localizado en el brazo largo del cromosoma 13 en 13q14. Pillai y et al en el año 2004 identificaron un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la región codificante del receptor CYSLTR2 identificado como 601 A>G que produce un cambio de una Metionina por una Valina en la posición 201. La presencia del alelo G se asocia como un alelo protector contra el asma. La localización del polimorfismo 601 A>G en el dominio 5 transmembrana sugiere un cambio en la interacción ligando-receptor o una habilidad disminuida para iniciar respuesta. Además este polimorfismo es transmitido con una tasa baja en pacientes asmáticos (Pillai et al, 2004; Drazen, 1998).

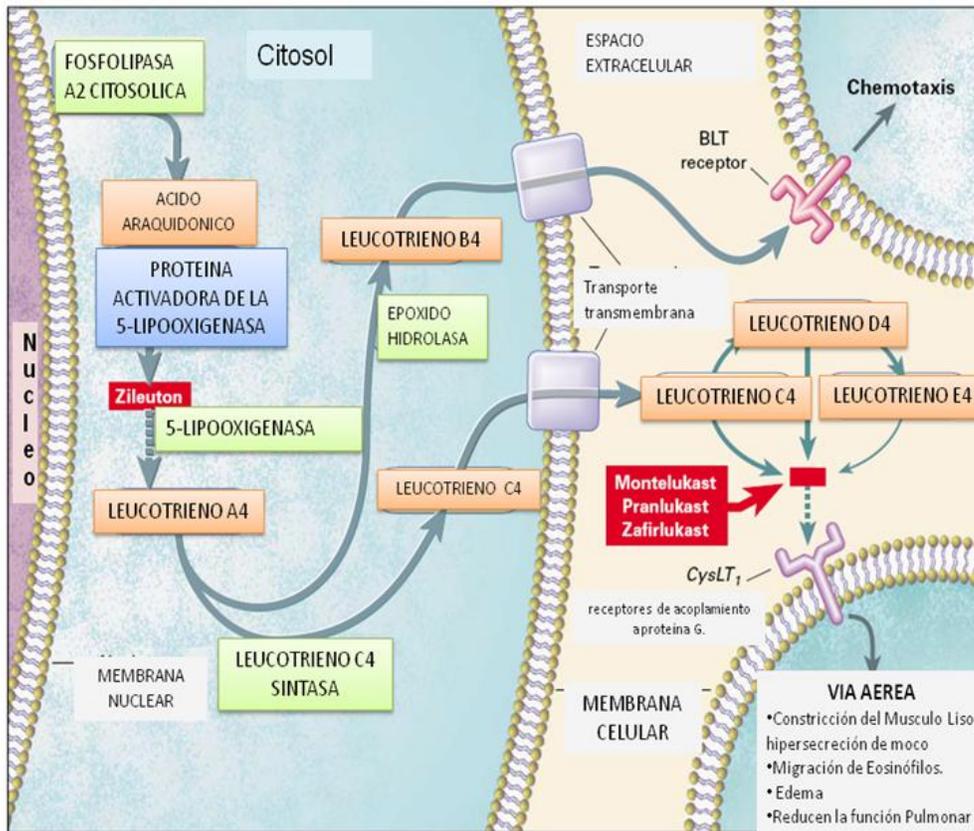


Figura 3 Ruta de la Biosíntesis de Leucotrienos (Drazen, 1999). Modificada.

La vía de síntesis de Cys-LTs está caracterizada por la presencia de tres enzimas de gran importancia la 5-lipooxigenasa (ALOX5), proteína de activación de la 5-lipooxigenasa (ALOXAP) y la sintasa LTC<sub>4</sub>. La ALOX5AP es una proteína de membrana altamente hidrofóbica de 18 kda, considerada por ser parte integral de la vía ALOX5 ya que sirve como sitio de unión, cofactor de la enzima y metabolismo del ácido araquidónico, además cataliza los dos primeros pasos en la formación de Cys-LTs, los cuales están presentes en abundancia en los macrófagos alveolares. También transfiere ácido araquidónico a ALOX5 permitiendo la producción eficiente de LTA<sub>4</sub>. La activación de ALOX5 genera altos

intermediarios reactivos  $LTA_4$  los cuales son rápidamente convertidos en potentes componentes antiinflamatorios  $LTB_4$ ,  $LTC_4$ , y  $LTD_4$ , por acción de la leucotrieno C4 sintasa (Kim et al, 2005; Drazen, 1998).

## **2.10 PROTEINA SINTASA $LTC_4$ .**

La sintasa  $LTC_4$  es una proteína de 18Kd considerada como un homodímero y su actividad está relacionada con la presencia de iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ) e inhibida por iones cobalto ( $Co^{2+}$ ) y por inhibidores de la proteína activadora de la 5 lipooxigenasa (FLAP); tiene localización microsomal y característica para conjugar xenobioticos; exhibe susceptibilidad diferencial para inhibidores y además es una glutatión transferasa de unión a membrana, se expresa solamente en células de origen hematopoyético, principalmente en eosinófilos, basófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos y es la llave para que se lleve a cabo la síntesis de Cys-LTs la cual convierte  $LTA_4$  en  $LTC_4$ .

Codifica para 150 aminoácidos, revela dos sitios de fosforilación potenciales de la PKC y un sitio de N-Glicosilación. 31% de los aminoácidos son idénticos a los de la proteína activadora de la 5 lipooxigenasa, 2/3 (44%) de la N-terminal de estas proteínas son idénticas. La estructura secundaria presenta 3 dominios hidrofóbicos y 2 loop hidrofílicos. La sintasa  $LTC_4$  del ratón también codifica para 150 aminoácidos y el 88% de la secuencia es similar a la del humano, las diferencias entre la sintasa  $LTC_4$  humana y la del ratón están presentes en 18 aminoácidos de los cuales 9 se localizan en la región carboxi-terminal de la proteína del ratón (Lam, 2003; Lam y Austen, 2002).

## 2.11 GENETICA DEL ASMA

La genética de susceptibilidad al asma es compleja, donde algunos genotipos confieren protección y otros riesgos dependiendo de la exposición ambiental encontrada. En este punto un número de genes tienen que ser identificados ya que contienen polimorfismos con gran influencia en el desarrollo de enfermedades pulmonares e inmunes incrementando el riesgo para desarrollar asma (Kiley et al, 2007)

Dado a que el asma y las alergias en general involucran la interacción de factores ambientales y genéticos, muchos estudios hasta ahora revelan que existe una contribución hereditaria importante en la etiología de estas enfermedades. Sin embargo la herencia de este tipo de desórdenes no sigue un patrón de herencia clásica mendeliana característica de desórdenes ocasionados por un solo gen. Por el contrario, las evidencias demuestran que el asma sigue un patrón de herencia similar al observado en desórdenes genéticos complejos, denominados así debido a que varios genes influyen la susceptibilidad a la enfermedad y pueden interactuar en un rasgo complejo (Guarin y Mendoza, 2001).

Hasta la fecha se han realizado varios estudios de ligamiento con el fin de identificar marcadores cromosómicos específicos que conduzca a la identificación del gen de la enfermedad. Hasta el momento se han reportado muchas regiones cromosómicas ligadas al asma bronquial pero aún no se han identificado genes específicos para esta entidad. Se han identificado regiones que incluyen el grupo de genes que codifican para varias citocinas en el brazo largo del cromosoma 5

(5q); el complejo mayor de Histocompatibilidad en el cromosoma 6p; la subunidad beta del receptor Fc $\epsilon$  en el cromosoma 11q; la región en el brazo largo del cromosoma 12 (12q) que contiene el gen de interferón  $\gamma$ , y el locus  $\alpha/\delta$  del receptor de células T en el brazo largo del cromosoma 14q. Adicionalmente se han revelado evidencias de ligamiento con asma en las regiones cromosómicas de los cromosomas 6 y 11 en (6p21 y 11q13) y cuatro regiones nuevas que involucran los cromosomas 4q34-35, 7p13, 13q14.1-14.2 y 16q21-24. Hasta la fecha han ganado mayor importancia los cromosomas 5 y 11 los cuales están relacionados con genes implicados en procesos inflamatorios alérgicos y atopia. Sobre el cromosoma 5 también se localiza el gen LTC<sub>4</sub> sintasa humano sobre el cual se han podido encontrar polimorfismos asociados con la severidad del cuadro clínico de la enfermedad (Guarin y Mendoza, 2001). Tabla 2.

<b>CROMOSOMA</b>	<b>REGION CROMOSOMICA INVOLUCRADA</b>
<b>Cromosoma 5</b>	<b>5q 31-33; 5q(35)</b>
<b>Cromosoma 6</b>	<b>6p21.3</b>
<b>Cromosoma 11</b>	<b>11q13</b>
<b>Cromosoma 12</b>	<b>12q14.3-24.1</b>
<b>Cromosoma 13</b>	<b>13q14</b>
<b>Cromosoma 20</b>	<b>20p13 gen ADAM 33</b>
<b>Cromosoma X</b>	<b>Xq13.2-q21.1</b>

**Tabla 2. Regiones cromosómicas involucradas con susceptibilidad al asma.**

## 2.12 GEN SINTASA LTC4 HUMANO.

El gen Sintasa LTC<sub>4</sub> (LTC4S) humano está situado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), codifica para un gen de aproximadamente 2.51 Kb el cual consta de cinco exones de 71-257 pb y cuatro intrones. El gen humano para la proteína activadora de 5- lipooxigenasa (FLAP) es mayor a 31 Kb por lo tanto el segundo, tercer y cuarto exón de la sintasa LTC<sub>4</sub> son idénticos en tamaño al del gen FLAP. El Primero y quinto exón difiere única y exclusivamente por un número mínimo de nucleótidos en la región no codificadora 5' y 3'. Análisis en la región no codificadora 5' han revelado tres sitios de iniciación de la transcripción del gen LTC4S humano localizados a 66, 69 y 96 nucleótidos corriente abajo del sitio de traducción ATG. Adicionalmente este gen está localizado distalmente a un cluster de genes que codifican para citocinas y centralmente a un grupo de células Th2 y genes implicados en procesos inflamatorios. También se han realizado varios estudios sobre la región no codificadora del gen LTC4 sintasa humano sobre el cual se han identificado dos polimorfismos, uno ubicado a -1072 pb y el otro a -444 pb el cual está estrechamente relacionado con la severidad del cuadro clínico de la enfermedad (Kedda et al, 2004; Lam, 2003; Sayers I-1 et al, 2003; Lam y Austen, 2002). (Figura4).

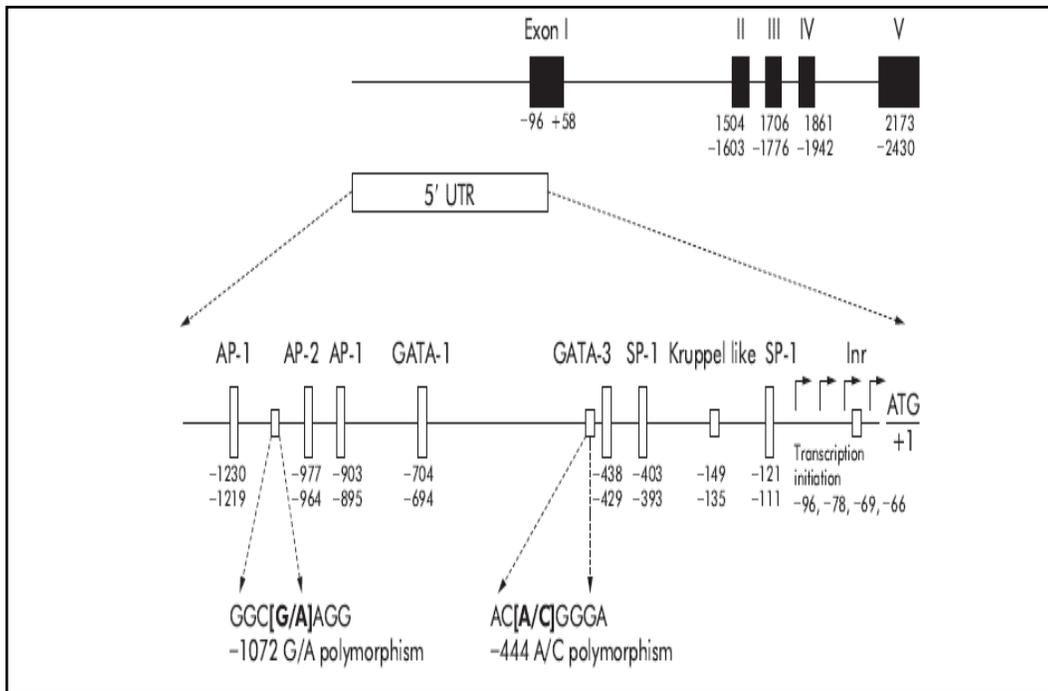


Figura 4. Esquema gen LTC4 Sintasa Humano. (Sayer I et al, 2003)

### 2.13 ESTUDIOS POBLACIONALES SOBRE LA REGION PROMOTORA DEL GEN LTC4S SINTASA HUMANO.

Se han documentado varios tipos de polimorfismos, la mayoría son polimorfismos de nucleótido simple (SNPs); este polimorfismo comprende cambios en un solo nucleótido en el DNA codificante y estadísticamente ocurre en intervalos de 1000-pb en nuestro genoma (Hawkins et al, 2005).

Estudios recientes han mencionado un polimorfismo bi-alélico del gen sintasa LTC<sub>4</sub> en la región promotora donde se ha explorado la transversión de A por C en

el promotor LTC4S permitiendo confirmar la presencia de un polimorfismo en la posición -444 corriente abajo del codón de iniciación. Además se ha identificado un nuevo polimorfismo en la posición -1072 que involucra la substitución de una G-A, a nivel de este polimorfismo no se ha correlacionado el alelo A como factor de riesgo para desarrollar asma y no tiene un papel funcional en la expresión del gen. El polimorfismo -444 A/C fue reconocido en la región no codificadora del gen LTC4 sintasa donde el alelo C se pudo relacionar como un factor de riesgo para pacientes con asma intolerante a la aspirina comparados con pacientes con asma tolerante a la aspirina o sujetos normales, también se ha relacionado con severidad del cuadro clínico de la enfermedad pero no se ha relacionado con pólipos nasales (Kedda et al, 2004; Sayers I-1 et al, 2003).

Estudios realizados por Currie et al en el 2003 permitieron conocer las frecuencias alélicas para el polimorfismo sintasa LTC<sub>4</sub> encontrando que el 71% pertenecen al tipo silvestre A y 29% a la variante C, por lo tanto las frecuencias Genóticas fueron de 49% para el genotipo AA, 6% para el genotipo CC y 44 % para el genotipo AC donde la respuesta a tratamiento con adenosina monofosfato (AMP) y metacolina fue significativa en el genotipo AA y AC/CC, además pudieron demostrar que el polimorfismo LTC<sub>4</sub> no determina respuesta a tratamiento con antagonistas leucotrienos (Currie et al, 2003).

Sanz et al en el año 2006 analizaron los polimorfismos -444A > C LTC4S y 927 > C CYSLTR1 en pacientes asmáticos Españoles y encontraron que en los hombres el alelo C del 927t>C CYSLTR1 fue más común en pacientes con asma (23%) que en los controles (8%), mientras que la presencia de este mismo alelo en las mujeres y los controles fue muy similar (23%) y (22%) respectivamente, posiblemente esta diferencia se debe a la localización del gen en el cromosoma X, ya que en los hombres solo hay un cromosoma X y en las mujeres 2 cromosomas

X . La combinación del alelo T de 927T>C CYSLTR1 y el alelo A de -444 A>C LTC4S fue más común en los controles que en los pacientes asmáticos y la combinación del alelo CA (927T>C CYSLTR1/-444 A>C LTC4S) fue mas común en pacientes con asma que en los controles. En este estudio también se pudo relacionar la presencia del alelo C del polimorfismo 927T>C con dermatitis atópica en un grupo de niños (Sanz et al, 2006).

Acevedo et al. en el año 2007 realizaron un estudio en la población de Cartagena Colombia para observar la reacción de niños asmáticos frente a alérgenos encontrando que portadores del alelo C se asocian con baja respuesta a IgE y a menor sensibilización. Adicionalmente no encontraron asociación entre el Polimorfismo y el cuadro clínico del asma, pero si pudieron determinar que las frecuencias alélicas y genotípicas de la población de estudio eran totalmente diferentes a otras que se habían reportado en otros países posiblemente por la gran mezcla de etnicidad en esta región (Acevedo et al, 2007)

Asano et al. en el año 2002 realizaron otro estudio en 349 pacientes asmáticos en Japón donde ellos pudieron encontrar que el alelo C se asocia con baja respuesta a antagonistas leucotrienos. Adicionalmente encontraron incrementado del alelo C en pacientes con asma tolerante a la aspirina pero no hallaron asociación entre el polimorfismo y la severidad del asma (Asano et al, 2002)

Sampson et al en el año 2000 realizaron otro estudio en una población de Inglaterra donde encontraron que pacientes portadores del alelo C son capaces de aumentar el volumen de expiración forzada en 1 segundo (FEV1) y la capacidad vital forzada (FVC) adicionalmente encontraron asociación entre el

alelo C y la severidad del cuadro clínico de los pacientes con asma (Sampson et al, 2000).

Kim et al en el año 2006 realizaron un estudio en niños coreanos con el fin de poder Correlacionar la presencia del polimorfismo -444 A/C con el fenotipo de asma inducida por el ejercicio encontrando que hay asociación entre el polimorfismo y la severidad de la broncoconstricción inducida por el ejercicio, sugieren que el alelo C es un factor de riesgo para desarrollar cuadro clínico severo de la enfermedad y adicionalmente para desarrollar asma como tal (Kim et al, 2006).

Los estudios poblacionales que se han realizado hasta el momento han mostrado controversia relacionada con la presencia y ausencia del polimorfismo, donde algunos autores describen el polimorfismo como un medio protector contra la enfermedad y otros quienes dicen que aquellos que portan o tienen el polimorfismo son personas que están más expuestas a desarrollar cuadros clínicos severos de la enfermedad y adicionalmente a tener asma durante toda su vida. Es por esto la importancia de conocer la prevalencia del polimorfismo en la población de estudio sobre una muestra de la ciudad de Bogotá en pacientes asmáticos y controles sanos para poder conocer cómo se comporta tal polimorfismo en esta población y de esta forma poder inferir su relación con la enfermedad. Es así la importancia de estudiar este polimorfismo ubicado sobre el gen sintasa LTC<sub>4</sub> humano.

## 2.14 FARMACOGENETICA EN EL RECEPTOR CYSLT.

La farmacogenética se aplica al estudio de la contribución de las diferencias genéticas entre individuos a la variabilidad en la respuesta a fármacos, permitiendo identificar la asociación entre una característica genética y una determinada respuesta. La respuesta variable se refiere habitualmente a la eficacia o a la toxicidad del fármaco donde la característica genética suele ser un polimorfismo en un gen o en un determinado locus. Los mecanismos por los cuales los polimorfismos genéticos causan diferentes respuestas a fármacos pueden ser diferentes, en primer lugar, hay variantes genéticas asociadas con alteraciones de la absorción, distribución o metabolismo de la droga lo que provocaría un incremento o disminución de su acción, otro mecanismo sería la variante genética en la diana sobre la cual actúa el medicamento. En estos casos no son polimorfismos concretos los que modulan la respuesta a un medicamento si no determinadas combinaciones de éstos haplotipos (Orriols y Quiros, 2006).

Los leucotrienos son liberados de un gran número de células dentro de las que se encuentran mastocitos, eosinófilos, y otras células inflamatorias de la vía aérea de pacientes asmáticos. Cisteinil leucotrienos  $C_4$ ,  $D_4$ ,  $E_4$ , se liberan primeramente por la actividad de mastocitos y eosinófilos los cuales son potentes contribuidores a los cambios fisiológicos y patológicos característico del asma. Los leucotrienos incrementan la permeabilidad microvascular modulando en primer lugar las fibras del nervio aferente y estimulando la liberación de moco, transporte lento de mucus y decrecimiento de la actividad del cilio respiratorio humano. La terapia antileucotrieno inhibe síntesis de leucotrienos inhibiendo por un lado la 5-lipooxigenasa (ALOX5) y por otro lado bloqueando el receptor cisteinil leucotrieno. Polimorfismos en el gen Sintasa  $LTC_4$  (A-444C) se han correlacionado con buena respuesta en pacientes asmáticos a zafirlukas. Los

resultados muestran que los sujetos homocigotos por mutaciones en ALOX5 o LTC<sub>4</sub>S tienen una respuesta reducida a la terapia con zafirlukas, además presentan un decrecimiento en el FEV<sub>1</sub> (Morrow, 2007).

Los modificadores leucotrienos disminuyen la necesidad para rescatar terapia oral glucocorticoidea ya que permite la reducción de dosis de glucocorticoides inhalados. Datos publicados indican la magnitud de mejoramiento en FEV<sub>1</sub> en respuesta a glucocorticoides inhalados comparada con la respuesta a antileucotrienos en pacientes con asma moderada persistente.

Adicionalmente se ha observado que los glucocorticoides inhalados reducen la respuesta a metaclonina en la vía aérea y se cree que es un índice de reactividad no específica en esta vía. Hasta el momento no se han reportado estudios del efecto de los modificadores leucotrienos en respuesta a metaclonina (Drazen, 1999).

Se ha observado que la inhalación de una sola dosis de glucocorticoides causa eosinofilia persistente en la mucosa bronquial y esputo de pacientes asmáticos, es así que las drogas modificadoras de leucotrienos han proporcionado una reducción significativa de la eosinofilia en sangre periférica y vía aérea en pacientes asmáticos clínicos (Sampson et al, 2000).

La capacidad para sintetizar Cys-LT a partir de eosinófilos está influenciada por polimorfismos en los genes que codifican para la vía de los leucotrienos, por ende Polimorfismos en el gen que codifica para la 5 lipooxigenasa (5-LO) modifica la transcripción del gen y disminuye la respuesta clínica por inhibición de síntesis de

leucotrienos ya que las diferencias en cuanto a la expresión de la sintasa LTC<sub>4</sub> en eosinófilos y otros leucocitos es solamente por tasas limitadas de síntesis de LTC<sub>4</sub> e incremento en la estimulación de la vía 5-lipooxigenasa.

Según Sampson et al., creen que la prevalencia incrementada de la variante genotipo sintasa LTC<sub>4</sub> en pacientes con asma severa (56%) comparada con sujetos normales (32%) y el aumento en la capacidad para producir LTC<sub>4</sub> en eosinófilos cuando son estimulados, tienen un componente genética que permiten el aumento en la producción de Cys-LT in vivo y se deben principalmente a factores que predisponen para asma severa y no por sensibilidad a aspirina, por lo tanto pacientes que portan esta variante genotípica representan un grupo privilegiado y buena respuesta a la terapia con antileucotrienos (Zafirlukast) ya que se ellos observaron una mejor respuesta a la función pulmonar (Sampson et al, 2000).

Desafortunadamente los datos utilizados en este estudio no fueron estadísticamente significativos por el tamaño de muestra (23 pacientes) por lo tanto se requieren mas estudios con una población más grande para poder demostrar el efecto farmacogenético a nivel de este polimorfismo.

Montelukast es un medicamento recomendado en bajas dosis junto con corticoesteroides inhalados para el tratamiento de pacientes con asma persistente. Se ha visto que polimorfismos repetidos en el promotor ALOX5 y polimorfismos en el gen LTC<sub>4</sub> sintasa humano contribuyen a la variabilidad en respuesta a tratamiento con Montelukast y otros modificadores leucotrienos. Pacientes asmáticos heterocigotos que presentan el genotipo AC y reciben tratamiento con Montelukast tienen un 80% de reducir el riesgo de tener asma

exacerbada comparada con los homocigotos AA y CC, la presencia del polimorfismo A-444C y mutaciones en el gen MRP1 (gen encargado del transporte de los leucotrienos al espacio extracelular) permiten de esta forma que exista un incremento en la concentración de los mismos y por ende se afecte la respuesta al antagonista leucotrieno montelukast. Por lo tanto se ha podido establecer que las variantes del gen contribuyen a la variabilidad de respuesta a drogas en los diferentes fenotipos ligados al asma (Lima et al, 2006).

Asano et al, evaluaron el efecto del pranlukast en 48 pacientes japoneses que presentaban asma moderada y severa persistente, encontrando que pacientes que portaban el genotipo AC/CC presentan una alta respuesta broncodilatadora en más del 15% al FEV<sub>1</sub> comparado con los pacientes que portan el genotipo AA. Según el análisis de regresión lineal demostraron que la reversibilidad de la vía aérea a salbutamol y la presencia del alelo mutante (C) independientemente predicen la respuesta clínica a pranlukast. Además confirman que la variante del alelo está significativamente asociada con diferencias en la respuesta de la función pulmonar y al tratamiento con antagonista leucotrienos (Asano et al, 2002)

Pacientes que portan el alelo C(-444) se asocian con asma intolerante a la aspirina responden mejor al tratamiento con drogas antileucotrienos ya que presentan una tasa de excreción de LTE<sub>4</sub> urinario mayor que los que portan el genotipo AA. Quiere decir que niveles de IgE en suero, conteo de eosinófilos en sangre periférica o tasa de excreción de LTE<sub>4</sub> urinario muestran una larga variabilidad interindividual sugiriendo que estos parámetros no pueden ser usados como predictores de la respuesta clínica en pacientes individuales (Asano et al, 2002).

### 3. JUSTIFICACION.

El asma es una enfermedad multifactorial donde tanto el componente genético como el ambiental desempeñan un papel importante en su presentación, por su frecuencia constituye un problema de salud pública ya que se ha estimado que existen aproximadamente 300 millones de personas en el mundo que la padecen, afectando todas las edades y grupos étnicos. En Colombia se ha reportado una prevalencia global acumulada de 7.4%.

Hasta el momento se han ligado varias regiones cromosómicas al asma bronquial y se han propuesto alrededor de 100 genes como posibles candidatos para esta patología. En la región promotora del gen LTC<sub>4</sub> se encuentra un polimorfismo de nucleótido único denominado A(-444)C, este cambio se ha relacionado con un aumento en la transcripción del gen y por tanto con la elevación de la enzima sintasa LTC<sub>4</sub>. Esta enzima está relacionada con la biosíntesis de leucotrienos, la cual convierte LTA<sub>4</sub> a LTC<sub>4</sub>. Algunos estudios han reportado que su incremento puede llevar a un aumento en la biosíntesis de cisteinil leucotrienos, los cuales son potentes mediadores proinflamatorios que promueven la contracción del músculo liso, la hipersecreción de moco, el edema y el reclutamiento de eosinófilos en la vía aérea asociándose así, con una mayor severidad del fenotipo asmático. Sin embargo, otros análisis en diferentes poblaciones reportan que esta correlación no es tan directa y podría ser dependiente de otros factores como la raza y el ambiente entre otros.

Debido a la controversia planteada entre la asociación del polimorfismo y el fenotipo asmático, se busca con el presente estudio establecer las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A(-444)C ubicado en la región

Promotora del gen LTC4 Sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos con asma y correlacionar el genotipo presente en cada paciente con los grados de severidad de la enfermedad. Este estudio servirá como base para futuros proyectos encaminados a encontrar la relación del polimorfismo con la respuesta al tratamiento.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es una enfermedad multifactorial en la cual intervienen diversos factores genéticos y ambientales. En Colombia se estima que la prevalencia de asma en la población es del 7.4%, afectando principalmente a la población pediátrica.

Dentro de los factores genéticos estudiados se han analizado polimorfismos del gen LTC4S. El polimorfismo A(-444)C se ha sugerido que incrementa la actividad transcripcional del gen LTC4S y por ende la actividad de la enzima sintasa LTC4 llevando a un incremento en la biosíntesis de leucotrienos, mediadores proinflamatorios asociados con la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado se ha sugerido que portadores del alelo C<sub>-444</sub> polimórfico presentan diferencias en la respuesta de la función pulmonar y un cuadro clínico severo. Este estudio pretende identificar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo de interés en una muestra de pacientes de la ciudad de Bogotá, compararlas con la distribución en controles sanos y correlacionarlas con la severidad del cuadro clínico de la enfermedad, teniendo en cuenta la gran heterogeneidad étnica presente en nuestra población.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A(-444)C ubicado en la región Promotora del gen LTC4 Sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos provenientes de una muestra de la ciudad de Bogotá y correlacionar estos genotipos con el grados de severidad clínica del asma.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Identificar el polimorfismo A(-444)C en la región promotora del gen LTC4S en controles sanos procedentes de la ciudad de Bogotá.
- Determinar la distribución del polimorfismo A(-444)C en pacientes pediátricos con asma en una muestra de la ciudad de Bogotá.
- Comparar las frecuencias obtenidas para el polimorfismo A(-444)C en la población asmática y los controles sanos de la muestra analizada.
- Determinar las frecuencias alelicas y genotípicas en la población de estudio.
- Correlacionar el polimorfismo A(-444)C con los grados de severidad del asma en los pacientes analizados.

- Comparar los hallazgos con reportes previos de la literatura nacional y mundial.

## **6. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 TIPO DE ESTUDIO**

Estudio de casos y controles

### **6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se incluyeron 101 muestras de ADN de pacientes asmáticos obtenidos del Banco de ADN del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad del Rosario y 202 controles sanos, para un total de 302 con una relación 1:2.

### **6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **6.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

#### **PACIENTES**

- Edad: 2-16 años de los cuales se obtuvo el ADN del Banco de ADN de la Universidad del Rosario y quienes tenían un diagnóstico confirmado de asma siguiendo los criterios de la Asociación Americana de Tórax.
- Aceptación voluntaria de participar en el estudio mediante llamada telefónica (anexo 2)

## **CONTROLES**

- Personas sanas, mayores de edad, no relacionadas, sin antecedentes familiares y/o personales de asma, fibrosis quística ó enfermedades pulmonares crónicas y sin antecedentes personales de alergia, hipertensión y atopia.
- Aceptación voluntaria para participar en el estudio mediante llamada telefónica (anexo3).

### **6.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Diagnósticos alternativos o adicionales al asma, como: laringotraqueomalacia, cuerpos extraños en la vía aérea o el esófago, infecciones virales crónicas, tuberculosis endobronquial, croup, pertusis, síndromes de aspiración, bronquiectasias, inmunodeficiencias, fibrosis quística ó anomalías congénitas de los sistemas respiratorio, cardiovascular o gastrointestinal.
- Pacientes que no desean participar en el estudio.

## **7. METODOLOGIA**

### **7.1 OBTENCION MUESTRA DE ADN.**

Se tomaron muestras de ADN de 101 pacientes asmáticos y 202 controles sanos del banco de ADN del instituto de Ciencias Básicas de la Universidad del Rosario previo consentimiento informado (anexo 1).

### **7.2 MUESTRA DE ADN.**

Las muestras de ADN de los pacientes asmáticos fueron tomadas del Banco de ADN del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad del Rosario, previo consentimiento de participar en el presente estudio mediante llamada telefónica. (anexo 2).

Las muestras de ADN de los controles fueron tomadas del Banco de ADN del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad del Rosario, previo consentimiento firmado y aprobación voluntaria de participar en el presente estudio mediante llamada telefónica. (anexo 1 y 3).

### 7.3 DETERMINACION DEL POLIMORFISMO A(-444)C DEL GEN LTC4.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el fragmento de interés de la región promotora del gen LTC<sub>4</sub> sintasa. Se utilizaron los primers descritos previamente por Asano et al. (Asano et al 2002)

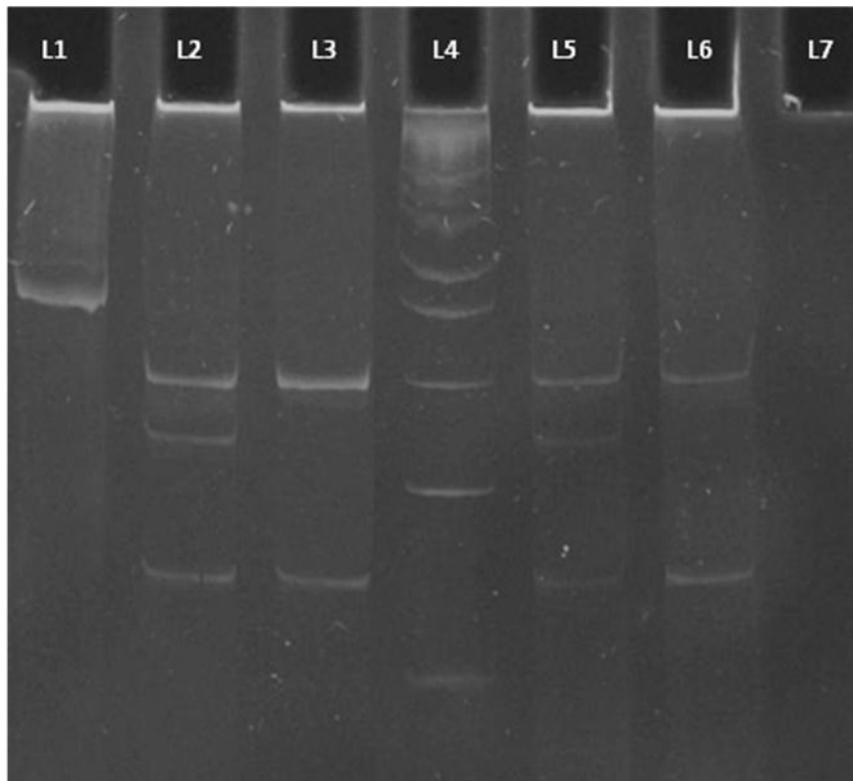
Forward 5`-CAACGACTAAGGCTGGCAGG-3`.

Reverse 5`-CACTTTCTCCAGGGCCTTGC-3`.

La mezcla de reacción fue hecha a un volumen final de 20µl; la reacción incluye 4µl de ADN genómico, 1X de Buffer para PCR de 10X (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl pH 8.8; y 0.1% de Twen 20), 0.1 pmol/µl de cada primer, dNTPs 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, 1.2 U de Taq DNA polimerasa. La reacción se inició con una desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos que consistían en 45seg a 94°C, 45 seg. a 61°C y 45seg a 72°C; finalmente un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C.

La digestión enzimática del fragmento amplificado de 258 pb se realizó con la enzima MspI (cepa ATCC 49670) la cual reconoce secuencias palindrómicas 5´..CCGG..3´ y 3´..GGCC..5´. De cada producto amplificado se tomaron 10µl y se mezclaran con buffer 1X el cual contiene (50mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de ditiotretol I y pH 7.9), 4U de enzima MspI (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1mM ditiotretol, 200 µg/ml BSA y 50% de glicerol) y agua. La mezcla fue incubada a 37°C por 6 horas, transcurrido este tiempo se detuvo la reacción agregando azul de bromofenol. Los fragmentos de digestión se visualizaron en geles de poliacrilamida al 12%, donde se pudo observar un fragmento de 199 pb y 60 pb para el alelo A y otro fragmento de 166 pb, 60 pb y 32 pb para el alelo C. Se utilizaron controles negativos de PCR en cada montaje,

teniendo en cuenta que la enzima realiza su corte ya sea sobre el alelo silvestre o polimórfico permitiendo evidenciar de esta forma un fragmento constante de 60 pb el cual servía como control interno de restricción, por último se utilizó un marcador de peso conocido. Figura 5.



**Figura 5: Productos digeridos con la enzima MSPI. Carril 1: producto amplificado (PA) de 258pb sin digerir, Carril 2: Genotipo A/C (bandas de 199 y 166 pb). Carril 3: Genotipo A/A (banda de 199 pb), Carril 4 Marcador de peso molecular (MP) 50-500pb, Carril 5: Genotipo A/C (banda de 199pb y 166 pb). Carril 6: Genotipo A/A (banda de 199pb). Carril 7: Control negativo.**

#### **7.4 ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico se realizó mediante el programa EPI Info 3.5 para Windows y el programa SPSS versión 16.

Se utilizó el test de chi-cuadrado ( $X^2$ ) con corrección de continuidad de Yates (valores esperados menores de 5); La determinación de frecuencias alélicas y genotípicas se hizo por conteo directo. Las pruebas se evaluaron a un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se analizaron 303 personas de las cuales, 101 pertenecían a pacientes diagnosticados con asma provenientes de la Clínica Infantil Colsubsidio de la ciudad de Bogotá. Estos correspondían a 46 (45.6%) niñas y 55 (54.4%) niños, con un promedio de edad de  $8.82 \pm 3.28$  años.

Adicionalmente se tomaron 202 controles sanos procedentes de la ciudad de Bogotá, de los cuales 114 (56.4%) pertenecían al género femenino y 88 (43.6%) al género masculino, con un promedio de edad de  $22.94 \pm 7.43$  años. (Tabla 3)

GRUPO	N	FEMENINO (%)	MASCULINO (%)	EDAD (años)
ASMA	101	46 (45.6 %)	55 (54.4%)	$8.82 \pm 3.28$
CONTROL	202	114 (56.4%)	88 (43.6%)	$22.94 \pm 7.43$

Tabla 3. Características Generales de la Población de estudio.

## 8.2. ESTUDIO MOLECULAR.

El análisis poblacional realizado sobre las muestras permitió determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A(-444)C.

El cálculo de las frecuencias alélicas esperadas se realizó con base en la formula:

$$p = D + 1/2H.$$

$D$  corresponde al número de individuos con el genotipo AA, que tienen doble dosis del alelo dominante (A) y  $H$  corresponde al número de individuos heterocigotos con una sola dosis del alelo dominante o recesivo (A/C).

Para determinar la frecuencia alélicas del alelo C se utilizo la formula

$$q=R+1/2H$$

$R$  corresponde al número de individuos homocigotos para el alelo C y  $H$  corresponde al número de individuos heterocigotos.

### 8.2.1 COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALELICAS Y GENOTIPICAS ENTRE CASOS Y CONTROLES.

La frecuencia del alelo A en la población de estudio (casos-controles) fue de 0,86 y para el alelo C de 0,15,(n=303). Las frecuencias alélicas encontradas a nivel de pacientes fueron de 0,84 para el alelo A y 0,16 para el alelo C. En lo referente a los controles se encontró 0.87 para el alelo A y 0.13 para el alelo C, al compararlas no se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones de estudio ( $p=0.295$ ).

Para el cálculo de frecuencias genotípicas esperadas se utilizó la siguiente fórmula  $(p+q)^2=p^2+2pq+q^2$ .

La frecuencia del genotipo A/A corresponde a la frecuencia del alelo p (A) al cuadrado, la frecuencia de los heterocigotos es entonces el doble de la frecuencia del alelo p y q, y la frecuencia genotípica de los homocigotos recesivos (C/C) corresponde a el cuadrado de la frecuencia del alelo q (C).

Las frecuencias Genotípicas encontradas en los pacientes fueron: 0.68 para el genotipo A/A y 0.32 para el genotipo A/C. Los controles presentaron una frecuencia del 0.74 para el genotipo A/A y 0.26 para el genotipo A/C; no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones de estudio ( $p > 0.195$ ). Al tomar en conjunto los datos de los dos grupos analizados, se encontró que las frecuencias genotípicas fueron de 0.71 para el genotipo A/A, 0.29 para el genotipo A/C y 0.0 (0%) para el genotipo C/C. (Figura 6a y 6b)

Finalmente, para este estudio poblacional se verificó que la población de estudio se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto se realizó por medio de una prueba de ji-cuadrado mediante la fórmula.

$$X^2 = \sum (O-E)^2 / E,$$

O corresponde al número de individuos observados,

E corresponde al número de individuos esperados, comparando los dos grupos de estudio. Para esta prueba se acepta el equilibrio de Hardy-Weinberg cuando  $p > 0.05$ .

Figura 6: Comparación Frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controle



Figura 6a: Comparación frecuencias alélicas entre casos y

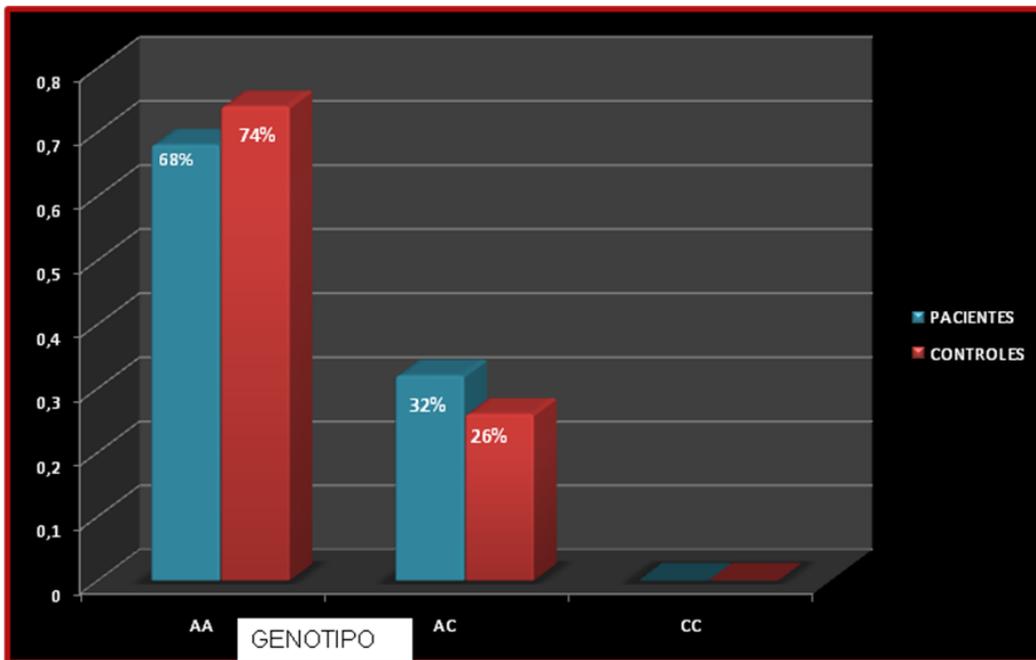


Figura 6b: Comparación frecuencias genotípicas entre casos y controles.

Al realizar la prueba de Hardy-Weinberg, dio como resultado que la población se encuentra en equilibrio y no se encuentra sobrerrepresentación de los alelos con un OR: 0.87 (95%;IC 0.52-1.44), entre Pacientes y controles, lo cual indica que el alelo C se distribuye de forma similar entre casos y controles y su presencia establece un riesgo reducido para desarrollar asma. La tabla 4 recoge los resultados totales del estudio.

Al comparar el genotipo AA y AC entre pacientes se obtuvo un OR de 0.41; 95%; IC: 0,025-6,85. Adicionalmente se realizó el análisis entre los genotipos AA y AC entre casos y controles encontrando un OR de 0,84; 95%; IC:0,48-1,48.

POBLACION DE ESTUDIO	FRECUENCIA GENOTIPICA				FRECUENCIA ALELICA			H-W
	A/A	A/C	C/C	Valor $p$	A	C	Valor $p$	
ASMA	0.68	0.32	0	<b>0.195</b>	0.84	0.16	<b>0.295</b>	0.17
CONTROL	0.74	0.26	0		0.87	0.13		0.09

Tabla 4: Frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes y controles.

### 8.2.2 COMPARACIÓN FRECUENCIAS ALELICAS ENTRE EL PRESENTE ESTUDIO Y LAS REPORTADAS EN DIFERENTES PAISES.

La comparación de las frecuencias alélicas de controles sanos obtenidas en el presente estudio y las reportadas a nivel mundial (Acevedo et al, 2007; Kim et al, 2006; Garcia et al, 2005; Kedda et al, 2004; Asano et al, 2002, Sampson et al, 2000 y Van Sambeek et al. 2000) demostraron diferencias significativas con los países de Japón, Cartagena y Estados Unidos ( $p=0,002819$ ,  $p=0,00018$  y  $p=0,000053$ ) respectivamente. (Tabla 5a), Referente a la comparación de

frecuencias alélicas a nivel de pacientes asmáticos y aquellas comparadas con otras poblaciones a nivel mundial, demostraron similitud con los países de Corea, Australia, España, Inglaterra y Japón ( $p=0,53202$ ,  $p=0,95384$ ,  $p=0,96607$ ,  $p=0,93442$  y  $p=0,06696$ . (Tabla 5b).

**Tabla 5: comparación frecuencias alélicas controles sanos y pacientes asmáticos entre diferentes países.**

PAIS	A	C	p
INGLATERRA	56	6	0,57981
BOGOTA	351	53	
AUSTRALIA	797	119	0,9798
BOGOTA	351	53	
COREA	244	48	0,26358
BOGOTA	351	53	
ESPAÑA	178	28	0,97063
BOGOTA	351	53	
JAPON	268	74	0,002819
BOGOTA	351	53	
CARTAGENA	748	52	0,00018
BOGOTA	351	53	
ESTADOS UNIDOS	199	75	0,000053
BOGOTA	351	53	

**Tabla 5a: Comparación frecuencia Alélicas controles sanos entre diferentes países.**

PAIS	A	C	VALOR <i>p</i>
COREA	739	151	0,53202
BOGOTA	172	30	
AUSTRALIA	1027	181	0,95384
BOGOTA	172	30	
ESPAÑA	208	38	0,96607
BOGOTA	172	30	
INGLATERRA	40	6	0,93442
BOGOTA	172	30	
JAPON	268	74	0,06696
BOGOTA	172	30	

Tabla 5b: comparación frecuencias alélicas pacientes asmáticos entre diferentes países.

### 8.2.2.1 COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS CON LAS REPORTADAS EN LA LITERATURA.

De igual forma se realizó la comparación entre las frecuencias genotípicas de controles sanos y las reportadas a nivel mundial, donde se pudo observar que las frecuencias de los genotipos A/A, A/C y C/C son similares a las reportadas por Inglaterra genotipo A/A ( $p=0,390987$ ) OR: 0,65; 95% CI 0,27-1,55 A/C, ( $p=0,627728$ ) OR: 1,34; 95% ;CI 0,55-3,23 C/C ( $p=0,13304$ ) OR:0,00 95%; CI 0,00-2,66. Con Cartagena se observó similitud en los genotipos A/A ( $p=0,0616594$ ) OR: 1,13;95%;CI 0,75-1,69; A/C ( $p=0,1788397$ ), OR: 0,75; 95%; IC 0,49-1,13, pero se encontraron diferencias significativas en el genotipo C/C ( $p=0,0107306$ ) OR: 0,00; 95%; IC 0,00-0,084. (Tabla 6a). Con los demás países como es el caso de Japón, España, Australia, Corea y Estados Unidos Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6a).

**Tabla 6: Comparación frecuencias genotípicas controles y pacientes entre diferentes países.**

PAIS	A/A	VALOR P	A/C	VALOR P	C/C	VALOR P
INGLATERRA	20	0,390987	10	0,62728	1	0,13304
BOGOTA	149		53		0	
CARTAGENA	304	0,0616594	84	0,1788387	12	0,0107306
BOGOTA	149		53		0	
JAPON	107	0,02719	54	0,30698	10	0,000354
BOGOTA	149		53		0	
ESPAÑA	55	0,0005706	41	0,02168	7	0,00043
BOGOTA	149		53		0	
AUSTRALIA	256	0,000012	174	0,005665	32	0,00027
BOGOTA	149		53		0	
COREA	66	0,0000001	64	0,0009186	16	0,0000052
BOGOTA	149		53		0	
ESTADOS UNIDOS	73	0,0001598	53	0,0210658	11	0,0000366
BOGOTA	149		53		0	

**Tabla 6a: Comparación frecuencias genotípicas controles sanos entre diferentes países.**

La comparación entre las frecuencias genotípicas a nivel de pacientes asmáticos y aquellas reportadas en diferentes partes del mundo demostraron datos similares a los encontrados en países como Japón e Inglaterra con relación al genotipo A/C y A/A encontrando valores de ( $p=0,33308$ ,  $p=0.15507$ ); A/C ( $0.69861$ ,  $0,52889$ ), C/C ( $p=0,13418$ ) respectivamente. Tabla 6b. Se demostró diferencia significativa a nivel del genotipo C/C con Inglaterra ( $P=0,03317$ ); OR: 0,00; 95%; CI 0,00-0,91. Por otro lado se observaron diferencias estadísticamente significativas con los países de España, Australia, Corea y Estados Unidos. (Tabla 6b)

PAIS	A/A	VALOR P	A/C	VALOR P	C/C	VALOR P
JAPON	225	0,33308	113	0,69861	11	0,13418
BOGOTA	71		30		0	
INGLATERRA	12	0,15507	9	0,52869	2	0,03317
BOGOTA	71		30		0	
ESPAÑA	58	0,0008	54	0,04079	11	0,001222
BOGOTA	71		30		0	
AUSTRALIA	290	0,0000536	266	0,0095	48	0,0065
BOGOTA	71		30		0	
COREA	196	0,0000032	200	0,007168	49	0,00095
BOGOTA	71		30		0	
ESTADOS UNIDOS	50	0,0207797	32	0,6196446	12	0,0006533
BOGOTA	71		30		0	

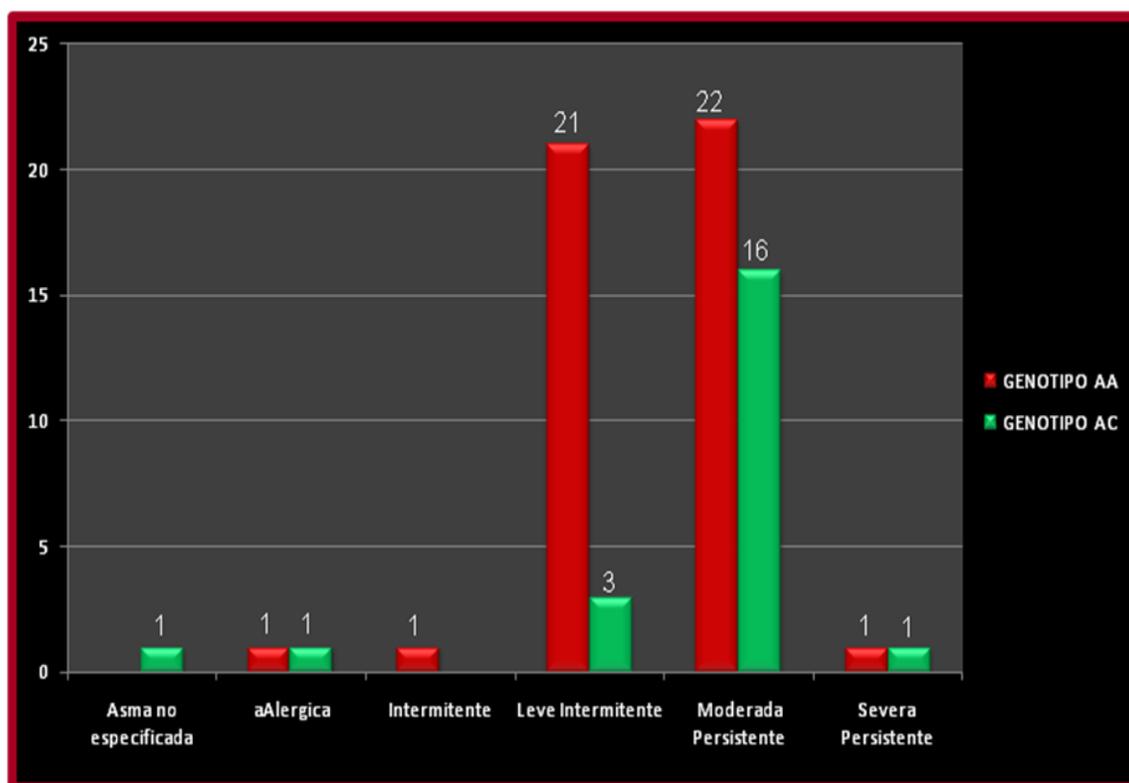
**Tabla 6b: Comparación frecuencias genotípicas pacientes asmáticos entre diferentes países.**

Al comparar las frecuencias genotípicas de la Población de estudio Bogotá Colombia con aquellas reportadas a nivel mundial, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con Inglaterra en los genotipos A/A ( $p=0,06858$ ) OR: 0,55;95%; CI 0,29-1,04; y A/C ( $P=0,3152$ ) OR: 1,44;95%, CI 0,74-2,77; pero si se encontraron diferencias significativas con el genotipo C/C ( $p=0,0032$ ) OR: 0,00; 95%; CI 0,00-0,39 similar a lo observados en los demás países Japón, España, Australia, Corea Estados Unidos y Cartagena. Tabla 7.

**Tabla 7: comparación frecuencias genótípicas controles sanos y pacientes asmáticos con aquellas reportadas a nivel mundial**

PAIS	A/A	VALOR P	A/C	VALOR P	C/C	VALOR P
INGLATERRA	32	0,06858	19	0,3152	3	0,0032
BOGOTA	220		83		0	
JAPON	332	0,01232	167	0,1794	21	0,00045
BOGOTA	220		83		0	
ESPAÑA	113	0,0000002	95	0,00059	18	0,000002
BOGOTA	220		83		0	
AUSTRALIA	546	0,00000	440	0,00001	80	0,0000018
BOGOTA	220		83		0	
COREA	262	0,00000	264	0,0000008	65	0,0000000
BOGOTA	220		83		0	
ESTADOS UNIDOS	123	0,0000058	85	0,0261186	23	0,0000001
BOGOTA	220		83		0	
CARTAGENA	625	0,2850669	173	0,0290833	25	0,0045106
BOGOTA	220		83		0	

**8.2.3 COMPARACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL CUADRO CLÍNICO PRESENTE EN LOS PACIENTES ANALIZADOS.**



**Figura 7: Comparación entre el genotipo y el tipo de asma entre pacientes.**

En los 101 pacientes asmáticos analizados se realizó la clasificación teniendo en cuenta el fenotipo del asma, encontrando seis fenotipos, de los cuales el 46% portaban el genotipo A/A y el 32% el genotipo A/C. El 1% de los pacientes presentaba asma no especificada e intermitente, el 2% presentaban asma alérgica y severa, el 24% presentaban asma leve intermitente y el 38% presentaba asma moderada persistente (Tabla 8, figura 7). Los datos no demostraron asociación entre el fenotipo de asma y presencia del alelo C<sub>-444</sub> polimórfico ( $p=0.107$ ). Tabla 8. Adicionalmente se realizó la comparación entre los diferentes fenotipos de asma y los genotipos AA y AC presente en los pacientes analizados donde se obtuvo como resultado un OR de 0,00 para el fenotipo de asma no especificada y asma intermitente, OR 0,48 para el fenotipo de asma Alérgica y severa

persistente, un OR de 5,3 para asma leve intermitente y un OR: 2,9 para el fenotipo de asma moderada persistente.

TIPO DE ASMA	GENOTIPO		Valor de p
	A/A	A/C	
NO ESPECIFICADA	0 (0.0%)	1 (100%)	0.107
ALERGICA	1 (50%)	1 (50%)	
INTERMITENTE	1 (100%)	0 (0.0%)	
LEVE INTERMITENTE	21 (87.5%)	3 (12.5%)	
MODERADA PERSISTENTE	22 (57.9%)	16 (42.1%)	
SEVERA PERSISTENTE	1 (50%)	1 (50%)	

**Tabla 8: Clasificación fenotípica del asma en los pacientes analizados.**

### 8.3 CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO

En los pacientes analizados se observó que un 33.3% han requerido manejo hospitalario por complicaciones inherentes a su patología, con un promedio de 3.7 hospitalizaciones por paciente. De los pacientes asmáticos hospitalizados el 57.1% portaban el genotipo A/A y el 42.9% el genotipo A/C. De los que no habían requerido manejo hospitalario el 73.8% portaban el genotipo A/A y 26.2% el genotipo A/C. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

el genotipo AA y AC y el número de hospitalizaciones por paciente ( $p$  0.146).

Tabla 9. Con un OR: 0.47; 95% CI 0,14-1,64.

En la población asmática estudiada no se encontró el genotipo C/C.

De los 101 pacientes analizados, dos presentaban asma severa, uno portaba el genotipo A/A y el otro el genotipo A/C.

**Tabla 9: Genotipo y características clínicas de los pacientes asmáticos**

GRUPO ASMA	TOTAL	PROMEDIO HOSPITALIZACIONES	GENOTIPO		Valor <i>p</i>
			A/A	A/C	
HOSPITALIZADOS	21 (33.3%)	3.7	12 (57.1%)	9 (42.9%)	0.146
NO HOSPITALIZADOS	42 (66.7%)	0.0	31 (73.8%)	11 (26.2%)	

## 9. DISCUSION.

El asma es una de las enfermedades respiratorias más comunes en niños pre-escolares, es una causa importante de morbilidad e implica costos elevados para su manejo y tratamiento. La prevalencia varía según los factores de riesgo genéticos y ambientales, las cifras de prevalencia han aumentado principalmente en aquellos lugares donde el clima favorece el desarrollo de esta entidad causando un gran impacto en la calidad de vida de estos pacientes (GINA, 2006; GINA, 2005; Masoli et al, 2004). Al ser el asma una enfermedad de herencia multifactorial, la identificación de polimorfismos en genes relacionados con el desarrollo de la fisiopatología es muy importante ya que permite identificar a los individuos con genotipos de susceptibilidad, con lo que se logra establecer pronósticos de correlación genotipo-fenotipo y escoger terapéuticas individualizadas que favorezcan a los pacientes.

El polimorfismo A(-444)C en el gen LTC4 sintasa previamente se ha relacionado con la predisposición a desarrollar asma y con la severidad del cuadro clínico. Esto se explica porque el alelo C<sub>-444</sub> incrementa la actividad transcripcional del gen, llevando a una mayor síntesis de la enzima leucotrieno C4 sintasa, la cual es esencial para la biosíntesis de leucotrienos, unos de los mediadores inflamatorios que contribuyen a la patogénesis del asma (Kedda et al, 2004).

Varios estudios han asociado el genotipo C/C con fenotipos de asma severa y los heterocigotos A/C tienen adecuada respuesta a los antileucotrienos, sin embargo,

estos hallazgos no han sido reproducibles en varias de las poblaciones analizadas. En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A(-444)C, entre la población de pacientes asmáticos y la población normal, indicando que probablemente el alelo C<sub>-444</sub> no es un polimorfismo de susceptibilidad a la enfermedad en la población analizada ( $p > 0.5$ . OR de 0.87 (95% IC 0.52-1.44) a nivel de frecuencias alélicas y  $p > 0.5$  OR de 0.84 (95% IC 0.48-1.48) a nivel de frecuencias genotípicas), Estos resultados de no asociación entre C<sub>-444</sub> y asma confirman lo reportado por otros autores en diferentes poblaciones como la Japonesa (Asano et al, 2.002), Australiana (Kedda et al, 2.004), Coreana (Kim et al, 2.006), española (Garcia et al, 2.005) y EEUU (Sambeek et al, 2.000).

De la misma manera un estudio previo realizado en población colombiana proveniente de Cartagena no encontró dicha asociación (Acevedo et al, 2007)

Por otro lado existen otras publicaciones realizadas en poblaciones como Inglaterra (Sampson et al, 2.000) y Polonia (Sanak et al, 1.997) que han indicado una asociación entre el alelo C y un fenotipo más severo de asma. Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por diferencias poblacionales, particularmente en lo referente a la frecuencia genotípica de C<sub>-444</sub>./ C<sub>-444</sub>. En poblaciones como la estudiada en el presente trabajo y con el número de pacientes y controles analizado no se encontró ningún individuo con el genotipo de susceptibilidad, lo que indicaría que la composición genética de la población es diferente. Otra posibilidad, es que en los estudios en que se ha evidenciado asociación del polimorfismo y la enfermedad, realmente se hayan dado falso positivo como consecuencia de estratificación poblacional. Este fenómeno ha sido claramente evidenciado en estudios de asociación basado en caso: control y se presenta si la enfermedad es predominante en un grupo étnico particular por

ejemplo caucásico, mientras que la población que ha servido de control es más heterogénea étnicamente. Desde esta perspectiva, la población de afectados va a tener características alelicas y genotípicas que no son comparables con una población mixta, y así cabe la posibilidad que los afectados presenten una frecuencia mayor de un alelo particular respecto a la población control, lo cual no está dado por que el alelo en cuestión está involucrado en el pronóstico de la enfermedad si no porque es frecuente en el grupo étnico relacionado con esta.

Al analizar los valores de OR entre casos y controles no demostraron un aumento del riesgo dado por la presencia de un genotipo particular.

Por otro lado, al comparar los diferentes fenotipos de asma con cada uno de los genotipos los OR sugieren un papel protector del genotipo AA frente al fenotipo de asma no especificada, asma intermitente y severa persistente. Mientras que las personas que portan este genotipo AA tienen una mayor probabilidad de asociarse con el fenotipo de asma leve intermitente (OR:5,3), las personas que portan el genotipo AC es 2,5 veces más probable que desarrollen un fenotipo de asma moderada persistente. Sin embargo, esto debe ser corroborado con un número mayor de pacientes para cada fenotipo.

Es posible también que realmente el polimorfismo A(-444)C no esté directamente relacionado con el pronóstico de asma, pero se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros genes implicados en el desarrollo del asma, localizados en la misma región genómica del gen LTC4 sintasa. El hecho que en algunos estudios este desequilibrio se evidencie y en otros no, estaría explicado principalmente por el número de individuos analizados.

Aunado a lo anterior, otros estudios han determinado que no hay asociación entre el genotipo LTC4S y la severidad del asma, pero sí que portadores del polimorfismo presentan una mayor respuesta al tratamiento con antagonistas leucotrienos y mejores resultados en las pruebas de función pulmonar comparados con los portadores del alelo silvestre (Asano et al, 2002). El objetivo del presente estudio no estaba relacionado con respuesta al tratamiento, pero es interesante proponer futuras investigaciones con el fin de poder dilucidar la relación existente entre el polimorfismo -444A/C y respuesta a tratamiento en pacientes Colombianos.

Sanak et al, en el año 1997 fueron los primeros en caracterizar el polimorfismo A(-444)C donde encontraron que las frecuencias del alelo C en pacientes con asma inducida por aspirina (AIA) fueron dos veces más que en los sujetos normales ( $p=0.226$  vs  $p=0.436$ ) respectivamente. Adicionalmente encontraron que el riesgo relativo de AIA asociado con el alelo C-444. fue de 3.89 (95% CI 1.57-8.98) los cuales sugieren que el polimorfismo representa un factor de riesgo y reacciones adversas a tratamientos con drogas antiinflamatorias no esteroideas.

Posiblemente la asociación encontrada en los dos estudios anteriormente mencionados se deba en el caso de Sampson et al, al número reducido de pacientes y a la presencia de pacientes con sensibilidad a la aspirina, Igualmente en el caso de Sanak et al ya que ellos solo analizaron pacientes con sensibilidad a la aspirina siendo este polimorfismo más frecuente en este tipo de pacientes. Por otro lado la diferencia que existe entre los dos estudios anteriormente mencionados y el presente trabajo se debe a que en este proyecto no se incluyeron pacientes con sensibilidad a la aspirina, por tanto se recomienda que en futuros estudios ingresar pacientes con este fenotipo asmático con el fin confirmar la relación que existe entre este y la presencia del polimorfismo.

Estudios posteriores no han encontrado evidencia estadística de asociación del alelo C-444 con severidad del asma (Acevedo et al 2007; Kim et al 2006; Kedda et al, 2004; Garcia et al, 2005); Asano et al, 2002; Van Sambeek et al, 2000), lo cual sugiere que posiblemente la asociación hallada entre el alelo C y asma sensible a la aspirina (AIA) se deba principalmente a que estas poblaciones representan una población estratificada con pacientes descendientes del este de Europa; donde el alelo C-444 tiene que estar asociado con este fenotipo asmático, por tal motivo no se ha podido evidenciar en otras poblaciones como es la Americana, Japonesa y Australiana. (Kedda et al, 2004), adicionalmente se ha descrito por varios autores (Ming-ming et al, 2006; Garcia et al, 2005; Sampson et al 2000; Sanak et al 1997) que el polimorfismo A(-444)C constituye un factor de riesgo para desarrollar asma per se.

El hecho que no se haya presentando asociación entre presencia del polimorfismo y severidad de la enfermedad puede deberse además de los factores antes mencionados, a que en el presente estudio no se identificó el genotipo CC el cual está relacionado con severidad del cuadro clínico y al hecho que el asma es una enfermedad con herencia poligénica multifactorial en el cual no es posible inferir el genotipo a partir del fenotipo resultando en un gran desafío identificar la susceptibilidad para el desarrollo de esta entidad, por tal motivo la expresión clínica es muy heterogénea ya que existen muchos aspectos como la gravedad, evolución natural, respuesta a tratamiento, ambiente, influencias psicológicas o múltiples polimorfismos funcionalmente activos que se relacionan con la variabilidad individual e interindividual en la fisiopatología entre pacientes.

Algunos autores han concluido que niveles de IgE en suero, conteo de eosinófilos en sangre periférica o la tasa de excreción de LTE<sub>4</sub> urinario muestran una larga variabilidad interindividual sugiriendo que estos parámetros no pueden ser usados

como predictores de la respuesta clínica en pacientes con asma. (Asano et al, 2002), sugiriendo que cada paciente debe ser tratado de forma independiente debido a la gran variabilidad presente en cada uno de ellos.

Los resultados de este estudio muestran claramente la amplia heterogeneidad fenotípica de la enfermedad, la cual se sugiere es consecuencia de la gran variabilidad clínica observada en cada uno de los pacientes analizados, y a las diferencias encontradas en la cantidad de individuos presentes en cada fenotipo. Por otro lado considerando que parte de la heterogeneidad clínica puede estar influenciada por factores genéticos, no se descarta que el ambiente y otros factores socioculturales conlleven a la variabilidad fenotípica presente en el grupo de estudio, y la imposibilidad de afirmar que no son producto del desequilibrio de ligamiento con loci diferentes reflejando de esta forma la complejidad del estudio de genes en una entidad tan compleja como es el asma (Nussbaum et al, 2008)

En relación con la homogeneidad en la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas observadas en los resultados tanto del grupo de casos como el de controles sugiere que la población de estudio se encuentra en equilibrio de Hardy-weinberg corroborando que no hay sobrerrepresentación o preferencia por un alelo determinado confirmando de esta forma que el tamaño de la muestra fue el adecuado para minimizar el efecto de la deriva génica.

En un estudio poblacional realizado en la ciudad de Cartagena, Colombia, se evaluó la distribución genotípica del polimorfismo A(-444)C y la asociación con el asma y la respuesta de IgE, luego de la exposición a alérgenos. (Acevedo et al, 2007). Al comparar estos resultados con el presente trabajo, se aprecia que la distribución de los genotipos AA y AC fueron similares ( $p>0.05$ ) pero se observó

diferencia significativa en el genotipo CC ( $P < 0,05$ ). Una explicación a este comportamiento puede atribuirse al hecho que la población Colombiana es muy heterogénea debido a su constante flujo migratorio interno, lo que haría necesaria la determinación de las frecuencias alélicas en cada zona del país con el fin de poder conocer realmente la distribución genotípica y alélica relacionada con el Polimorfismo A(-444)C al interior de nuestro país.

Sin duda el amplio mestizaje, los cambios demográficos relevantes en los últimos años y las migraciones internas e inmigraciones del país, conducen a modificar la estructura genética de los pobladores; según el censo de 2005 más de 27 millones de colombianos cambiaron de municipio de residencia, en donde Bogotá al ser el lugar de destino de la mayoría de los migrantes, está en una dinámica genética para una población mestiza con gran acervo amerindio (DANE, 2005).

Por otro lado, Cartagena es una población que presenta un acervo genético básicamente originado por la mezcla de españoles y africanos dando como origen un híbrido donde la población indígena nativa mantiene una limitada participación frente a las otras dos razas (Lizcano, 2005; Caraballo et al, 1992).

Teniendo en cuenta la literatura revisada frente al acervo genético característico de las ciudades de Bogotá y Cartagena es posible sugerir que las diferencias encontradas a nivel de los genotipos en controles sanos se deba principalmente a la amplia diferencia étnica observada en estas dos poblaciones comparadas con la etnia asiática y Europea (Lizcano, 2005; Caraballo et al, 1992)

Los genes candidatos y los estudios de asociación en el asma, hasta la fecha han resultado insuficientes para confirmar o refutar la importancia de polimorfismos en genes específicos, esto puede deberse a varias razones, entre las cuales se encuentra la dificultad en establecer el fenotipo, el tamaño de la muestra y la estratificación de la población. La fortaleza del presente trabajo radica en la utilización de pacientes con un cuadro clínico y paraclínico claramente definido siguiendo las guías de la asociación americana de tórax, la utilización de un tamaño de muestra razonable para los objetivos planteados, sin embargo, no podemos descartar estratificación de la población que impida encontrar hallazgos significativos.

Aunque estudios previos sugieren que el polimorfismo (A-444C) del gen LTC4 sintasa humano se encuentra asociado con el asma severa, el presente trabajo no permitió confirmar dicha asociación en esta población cuidadosamente fenotipificada, sin embargo, sería conveniente aumentar el grupo de pacientes con asma severa para confirmar dicho hallazgo.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo A(-444)C ubicado en la región promotora del gen LTC4 sintasa humano en las dos poblaciones de estudio casos-contróles provenientes de una muestra de la ciudad de Bogotá , encontrando una distribución similar entre pacientes y controles no existiendo diferencias estadísticamente significativas.
2. Las frecuencias genotípicas obtenidas en el presente estudio difieren con las reportadas en algunas poblaciones posiblemente atribuido a la gran heterogeneidad étnica de la población estudio.
3. Se demostró que el polimorfismo y la severidad del cuadro clínico de la enfermedad no tienen asociación entre sí, ya que portadores del alelo polimórfico y portadores del alelo silvestre presentaron cuadros clínicos similares.
4. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el fenotipo de asma y portadores del alelo polimórfico debido a la gran variabilidad observada entre pacientes. Sin embargo el OR sugiere que el genotipo AA actúa como un factor de protección frente al fenotipo de asma.

5. La ausencia del genotipo C/C en el presente trabajo, indica que el polimorfismo entre casos y controles no se encuentra asociado ya que la distribución del alelo C fue similar entre ellos.

6. La variabilidad del cuadro clínico de la enfermedad en los pacientes analizados puede deberse a factores diferentes al genotipo que porta cada uno de ellos, como en casos de mutaciones presentes en otras vías y factores ambientales que puedan estar alterando la severidad de la enfermedad.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere continuar el estudio con un mayor número de pacientes donde se pueda evaluar diferentes variantes clínicas que permitan establecer la gran variabilidad individual e interindividual permitiendo de esta forma establecer conclusiones acerca de las verdaderas diferencias existentes entre el fenotipo y el genotipo
2. Se sugiere continuar el estudio realizando muestreos en diferentes regiones del país lo cual permitirá por un lado conocer las frecuencias alélicas y genotípicas en cada región y a la vez conocer la asociación del genotipo C/C y la severidad del cuadro clínico de la enfermedad ya que en el presente estudio no se encontraron datos estadísticamente significativos que pudieran relacionar el polimorfismo con la severidad del cuadro clínico, adicionalmente se observó que la distribución del alelo C fue muy similar entre pacientes y controles.
3. Se recomienda realizar estudios complementarios relacionados con la vía de los leucotrienos, principalmente aquellos relacionados con actividad de la enzima leucotrieno C4 Sintasa ya que esta tiene gran influencia en la patogénesis de la enfermedad debido al incremento de la biosíntesis de leucotrienos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

**Acevedo Nathalie, Vergara Candelaria, Mercado Dilia, Jimenez Silvia, Caraballo Luis. 2007.** The A-444C polymorphism of leukotriene C<sub>4</sub> synthase gene is associated with IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* in a Colombian population. *J Allergy Clin Immunol.* 119(numero 2). 505-506.

**Asano Koichiro, Shiomi Tetsuya, Hasegawa NaoKi et al. 2002.** Leucotriene C<sub>4</sub> synthase gene A(-444)C polymorphism and clinical response to a CYS-LT<sub>1</sub> antagonist, pranlukast, in Japanese patients with moderate asthma. *Pharmacogenetics.* 12: 565-570.

**Barnes J. Peter. 1983.** Pathogenesis of asthma: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 76: 580-586.

**Bel H. Elisabeth. 2004.** Clinical phenotypes of asthma. *Curr. Opin Pulm Med.* 10: 44-50.

**Caraballo LR, Marrugo J, Erlich H, Pastorizo M. 1992.** HLA alleles in the population of Cartagena (Colombia). *Tissue Antigens.* 39: 18-33

**Currie P. Grae, Lima J. John et al. 2003.** Leukotriene C<sub>4</sub> synthase polymorphisms and responsiveness to leukotriene antagonists in asthma. *J. Clin Pharmacol.* 56:422-426.

**Drazen M. Jeffrey. 1998.** Leucotrienes as mediators of Airway Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 158: 193-200.

**Drazen M. Jeffrey. 1999.** Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *The New England Journal of Medicine.* 340 (3): 197-204.

**Garcia Maria Isidoro, Davila Ignacio, Moreno Esther, Lorente Felix, Sarmiento, Gonzalez Rogelio. 2005.** Analysis of the leukotriene C4 synthase A-444C promoter polymorphism in a Spanish population. J Allergy Clin Immunol. 115(numero 1): 206-207.

**GINA. 2005.** Global strategy for asthma management and prevention.

**GINA, POCKET, GUIDE. 2006.** Pocket Guide for asthma management and prevention. Medical communications Resources, Inc: 1-30

**Guarín Montoya Carlos Julio, Mendoza Ayala Adriana Margarita. 2001.** Aproximación a la genética del asma bronquial. Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología. 10(1): 1-17

**Harrison.** Principios de Medicina Interna. 13ª edición. Editorial Mcgraw Gill. Madrid, España. 1994.

**Hawkins A. Gregory, Weiss T. Scott, Bleecker R. Eugene. 2005.** Asthma Pharmacogenomics. Immunol Allergy Clin N Am. 25: 723-742.

**Kedda Mary-Anne, Shi Jing, Duffy David. Et al . 2004.** Characterization of two polymorphisms in the leukotriene C<sub>4</sub> synthase gene in an Australian population of subjects with mild, moderate, and severe asthma. Clin Immunol. 113: 889-895.

**Kiley James, Smith Robert, Noel Patricia. 2007.** Asthma phenotypes. Curr. Opin Pulm Med. 13: 19-23.

**Kim Bin-Hyo, Lee Yeon-So, Shim Yeon Jung, Kim Hyung-Ja, Kang Jin-Mi. 2006.** The leukotriene C4 synthase (A-444C) promoter polymorphism is

associated with the severity of exercise-induced asthma in Korean children. *J. Allergy Clin Immunol.* 117 (numero 2): 1191-1192.

**Kim H.S., Bae S.J., Suh H.C. et al. 2005.** Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: a positive association with airway hyperresponsiveness. *Allergy.* 60: 760-765.

**Lam Bing K, Austen K. Frank. 2002.** Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 68-69: 511-520.

**Lam Bing K. 2003.** Leukotriene C4 synthase. *Prostaglandins and Essential Fatty Acids.* 69 : 111–116

**Lima J John, Zhang Shu, Grant Audrey et al. 2006.** Influence of Leukotriene Pathway polymorphisms on response to Montelukast in asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 173: 379-385.

**Lizcano Fernandez Francisco. 2005.** Composición étnica de las tres áreas culturales del continente Americano al comienzo del siglo XXI. *Convergencia, ISSN 1405-1435, UAEM, México.* 38: 185-232.

**Masoli Matthew, Fabian Denise, Holt Shaun, Beasley Richard. 2004.** The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. *Allergy.* 59: 469-478.

**McCormack C. Meredith, Enright L. Paul. 2008.** Making the diagnosis of asthma. *Respiratory Care.* 53 (5): 583-590.

**Ming-ming PAN, Tie-ying SUN and Hong-sheng ZHANG. 2.006.** Association between leukotriene C4 synthase A-444C polymorphism and asthma in Chinese Han population in Beijing. *Chinese Medical Journal.* 119 (21): 1834-1838

**Morrow J. Thomas. 2007.** Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. *J Manag Care Pharm.* 13 (6): 497-505.

**McCunney J. Robert. 2005.** Asthma, Genes, and Air Pollution. *J Occup Environ Med.* 47 (12): 1285-1291.

**Nussbaum R.L, Mcinnes R.R, Williard H.F. 2008.**Thompson & Thompson genetica en medicina. Septima edición. Editorial Masson.

**Orriols Tellería J.J., Quiros Blanco A. 2006.** Farmacogenética en el tratamiento del asma. *An Pediatr (Barc).* 64 (3): 121-123.

**Paredes Oliver. 2008.** [www.monografias.com](http://www.monografias.com). Asma

**Padula Victor, Bonini Jorge, Sierra Luis, Vargas Francisco, Urdaneta Ruben, Milgran Elías, Aldrey Oscar, Valeri Enzo, Reyes Leisse.**  
Asma: Diagnostico y Clasificación. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría.* 64 (1). 2001.

**Pillai G Sreekumar, Cousens J Diane, Barnes A. Ashley. Et al. 2004.**  
A coding polymorphism in the CYSLT2 receptor with reduced affinity to LTD<sub>4</sub> is associated with asthma. *Pharmacogenetics.* 14: 627-633.

**Pierre d´Almeida Telles Filho. 2008.** Asma Bronquica/Historia da Asma. [http://www.asma-bronquica.com.br/medical/historia\\_da\\_asma.html](http://www.asma-bronquica.com.br/medical/historia_da_asma.html). pag. 1-20

**Rietveld S. 1998.** Sympton perception of their asthma: a multidisciplinary review. *J Asthma.* 35: 137-146

**Rojas William M. 2001.** Inmunología. Corporación para investigaciones Biológicas, Medellin Colombia. Duodecima edición: 313-321.

**Sampson A P, Siddiqui S, Buchanan D. et al. 2000.** Variant LTC<sub>4</sub> Synthase allele modifies Cysteinyl leukotriene synthesis in eosinophils and predicts clinical response to zafirlukast. *Thorax*. 55 (suppl 2): 28-31.

**Sanz C., Garcia M Isidro, Davila I., Moreno E., Laffond E., Lorente E. 2006.** Analysis of 927T>C CYSLTR1 and -444A>C LTC<sub>4</sub>S Polymorphisms in patients with Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 16 (6): 331-337.

**Sayers I-1, Barton S, Rorker S. et al. 2003.** Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leucotrienes C<sub>4</sub> synthase gene (LTC<sub>4</sub>) in asthma.

**Sayers I, Sampson AP, Ye S, Holgate ST. 2003.** Promoter polymorphism influences the effect of dexamethasone on transcriptional activation of the LTC<sub>4</sub> synthase gene. *European Journal of Human Genetics*. 11: 619-622.

**Van Sambeek Rachel, Stevenson Donald D, Baldasaro Mathew et al. 2000.** 5'Flanking region polymorphism of the gene encoding leukotriene C<sub>4</sub> synthase does not correlate with the aspirin intolerant asthma phenotype in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. 16(1): 72-76.

**Weiss T. Scott and Raby A. Benjamin. 2004.** Asthma genetics 2003. *Human Molecular Genetic*. 13: R84-R89.

**ANEXO 1**



**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Análisis de polimorfismos del Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico en  
pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística.**

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el instituto de Ciencias Básicas laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario con la participación de:

Heidi Mateus, Carlos Rodríguez y Lorena Sánchez

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas
- (d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada persona permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.
- (e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Heidi Mateus. Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

Instituto de Ciencias Básicas.

Facultad de Medicina.

Universidad del Rosario. Tel (57-1)3474570 (Ext 266)

## **A. EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

### **OBJETIVO:**

Identificar ciertas variaciones en un gen conocido como receptor beta2 adrenérgico en pacientes con Fibrosis Quística y personas sanas, para determinar si existen diferencias que puedan relacionarlas con la severidad de la enfermedad.

### **PROCEDIMIENTO:**

Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 10cc de sangre mediante punción en vena. La muestra de ADN obtenida a partir de la muestra de sangre será almacenada en el Banco de ADN de la Universidad del Rosario, la cual podrá ser empleada para posteriores estudios. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto.

**RIESGOS E INCOMODIDADES** La participación en este estudio representa un riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias estarán representadas solo por la toma de muestra; algunas molestias pueden ser: hematomas (morados), enrojecimiento y leve dolor en el lugar de donde se toma la muestra, sin embargo, estas molestias pasaran rápidamente.

### **BENEFICIOS ADICIONALES:**

Usted no obtendrá ningún beneficio de la participación en el estudio.

Este estudio nos ayudará a entender mejor porque se da la variación entre los diferentes pacientes con Fibrosis Quística.

---

## **RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES**

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

**El riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en la salud del paciente.**

### **MANEJO DE RESULTADOS**

No se entregaran resultados a las personas sanas analizadas, estos son confidenciales y solo

serán conocidos por los investigadores

Los resultados generales del estudio se informaran en una conferencia a la cual se invitaran a todos los participantes y a la comunidad en general.

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO : Análisis de polimorfismos del Gen del Receptor Beta 2 Adrenérgico en pacientes colombianos afectados por Fibrosis Quística.**

Habiendo sido enterada(o) del objetivo del presente estudio, informada(o) de los riesgos mínimos de la toma de muestra y habiendo resuelto todas mis dudas acerca de la investigación Yo, \_\_\_\_\_ con documento de identificación número: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, con el fin de realizar el análisis de variaciones en el gen del receptor beta-2 adrenérgico. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CC

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Relación Con el Voluntario \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Investigador

Bogotá, D.C. Fecha. \_\_\_\_\_

## ANEXO 2



Código del paciente:

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO TELEFONICO  
GUION PARA PACIENTES**

**Prevalencia del polimorfismos A(-444)C del gen LTC4 sintasa humano en  
controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos en una muestra de la  
ciudad de Bogotá**

Buenos días/ tardes. Mi nombre es Luz Miryam Siza, estudiante de la Universidad del Rosario, usted es tan amable de comunicarme con el padre o la madre del niño(a)\_\_\_\_\_gracias. Su nombre es Sr/Sra\_\_\_\_\_ (Representante del menor).

Mi llamada es con el fin de informarle que la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario va a empezar a desarrollar un nuevo estudio de investigación relacionado con el análisis de un polimorfismo sobre gen LTC4 sintasa humano, el cual podría estar involucrado con el curso y severidad del cuadro clínico de la enfermedad en pacientes con asma. Este estudio podría ayudar a entender un poco más el comportamiento variable de la entidad en las personas que padecen esta enfermedad y también podría ayudar a largo plazo a establecer terapias diferentes para cada paciente, mejorando su condición de vida.

Nosotros contamos con una muestra de ADN de su hijo(a)\_\_\_\_\_ (Nombre del paciente), y nos gustaría saber si usted nos da autorización y consentimiento para utilizar la muestra de ADN que se encuentra en el Banco de ADN de la Universidad del Rosario las cuales serán utilizadas en el estudio titulado Prevalencia del polimorfismo A(-444)C del gen LTC4 sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos en una muestra de la ciudad de Bogotá. SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

Adicionalmente, queremos que sepa que este estudio no genera ningún beneficio económico y tampoco ningún riesgo para usted o su hijo, y que una vez tengamos el resultado del presente estudio, se emitirá un resultado para el niño y se les

explicara el resultado en una consulta especial dirigida por el genetista de la Unidad de Genética de la Universidad. Está usted de acuerdo? SI \_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

De antemano agradezco la atención y colaboración, y estaré en contacto con usted para comentarle lo concerniente al estudio.

PERSONA RESPONSABLE DEL CONSENTIMIENTO:

CC.

Tel.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### ANEXO 3



**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**INFORMACION E INVITACION DE PARTICIPACION AL ESTUDIO  
*GUION PARA CONTROLES***

**Prevalencia del polimorfismos A(-444)C del gen LTC4 sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos en una muestra de la ciudad de Bogotá**

Buenos días/ tardes. Mi nombre es Luz Miryam Siza, estudiante de la Universidad del Rosario, usted es tan amable de comunicarme con el señor (a)\_\_\_\_\_gracias.

Mi llamada es con el fin de informarle que la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario va a empezar a desarrollar un nuevo estudio de investigación relacionado con el análisis de un polimorfismo sobre gen LTC4 sintasa humano, el cual podría estar involucrado con el curso y severidad del cuadro clínico de la enfermedad en pacientes con asma. Este estudio podría ayudar a entender un poco más el comportamiento variable de la entidad en las personas que padecen esta enfermedad y también podría ayudar a largo plazo a establecer terapias diferentes para cada paciente, mejorando su condición de vida. Como sabemos el asma es una enfermedad crónica común caracterizada por presentar síntomas como tos, disnea, sibilancias y dificultad para respirar. Adicionalmente es una enfermedad multifactorial donde el componente genético y ambiental juega papel importante en la detección de dicha entidad, por su frecuencia se constituye en una enfermedad de salud pública, se ha estimado que existen aproximadamente 300 millones de personas en el mundo que la padecen, afectando a personas de todas las edades, y grupos étnicos.

El presente estudio permitirá establecer las frecuencias alélicas y genotípicas para esta variante, este polimorfismos se ha relacionado con un aumento en la transcripción del gen y por tanto con elevación de la enzima sintasa LTC4 e incremento en la biosíntesis de cisteinil leucotrienos los cuales son potentes mediadores proinflamatorios que promueven la contracción del musculo liso, la hipersecreción de moco, el edema y el reclutamiento de eosinófilos en la vía aérea asociándose con una mayor severidad en el fenotipo asmático.

Nosotros contamos con una muestra de ADN que se encuentra en el Banco de ADN de la Universidad del Rosario y nos gustaría saber si usted nos da autorización y consentimiento para utilizar la muestra de ADN en el estudio titulado Prevalencia del polimorfismo A(-444)C del gen LTC4 sintasa humano en controles sanos y pacientes pediátricos asmáticos en una muestra de la ciudad de Bogotá. SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

Adicionalmente, queremos que sepa que este estudio no genera ningún beneficio económico y tampoco ningún riesgo para usted. Está usted de acuerdo? SI \_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

De antemano agradezco la atención y colaboración, y estaré en contacto con usted para comentarle lo concerniente al estudio.

PERSONA RESPONSABLE DEL CONSENTIMIENTO:

CC.

Tel.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_