

La ingeniería social: desde la acción científica hacia la reflexión pluripolar

Nancy E. Larocca, Dolores Moreno

Cátedra de Patología General y Fisiopatología
Escuela "Luis Razetti"

Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela

Jenny Garmendia

Instituto de Inmunología
Universidad Central de Venezuela

Félix Toro

Instituto de Inmunología
Universidad Central de Venezuela
.laroccanancy@gmail.com

Fecha de recepción: 22 - 05 - 2016 Fecha de aceptación: 14- 06- 2016

Resumen

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son enfermedades caracterizadas por la obstrucción al flujo de aire e inflamación crónica y que aparecen como resultado de la interacción de diferentes genes con múltiples elementos ambientales. Los glucocorticoides inhalados son utilizados en el manejo del asma y la EPOC, pero algunos pacientes muestran poca respuesta a estos medicamentos; esta variabilidad individual en la respuesta farmacológica pudiera tener una base

genética. Se han estudiado algunos polimorfismos en el gen del receptor de glucocorticoides que pudieran determinar la aparición de estas patologías y la respuesta al tratamiento. Objetivos: Determinar la asociación del polimorfismo BclI con el desarrollo de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Métodos: Se estudiaron 100 pacientes con asma, 100 pacientes con EPOC y 100 controles mestizos venezolanos. La caracterización genotípica del Receptor de Glucocorticoides +647 G/C se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

y posterior digestión de los amplicones mediante la enzima BclI. Resultados: Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes y los individuos controles, observándose una mayor frecuencia del genotipo homocigoto GG en los pacientes con asma con respecto a los pacientes con EPOC (OR=10,5238; IC95%:4,7801-23,1688) y los individuos controles (OR=16,3061; IC95%:6,5393-40,6601) y una menor frecuencia del genotipo heterocigoto GC en los pacientes con asma.

Palabras clave: EPOC ; asma ; glucocorticoides ; enfermedad pulmonar

Glucocorticoid receptor polymorphism in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease in Venezuela

Abstract

Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are diseases characterized by airflow obstruction and chronic inflammation and appear as a result of the interaction of different genes with multiple environmental elements. Inhaled glucocorticoids are used in the management of asthma and COPD, but some patients show little response to these medications; this individual variability in drug response may have a genetic basis. Some polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene

have been studied that could determine the appearance of these pathologies and the response to treatment. Objectives: To determine the association of BclI polymorphism with the development of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Methods: We studied 100 patients with asthma, 100 patients with COPD, and 100 Venezuelan mestizo controls. Genotypic characterization of Glucocorticoid Receptor +647 G/C was performed by Polymerase Chain Reaction technique and subsequent digestion of amplicons by BclI enzyme. Results: Significant differences were

found between the two groups of patients and the control individuals, being observed a higher frequency of the homozygous GG genotype in patients with asthma with respect to patients with COPD (OR=10,5238; IC95%:4,7801-23,1688) and the control individuals (OR=16,3061; IC95%:6,5393-40,6601) and a lower frequency of the heterozygous GG genotype in patients with asthma.

Keywords: COPD ; asthma ; glucocorticoids ; lung disease

Introducción

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son consideradas como enfermedades crónicas del tracto respiratorio, caracterizadas por la obstrucción al flujo de aire y por continuos procesos de inflamación crónica y con una alta prevalencia a nivel mundial.(1,2) A pesar de que ambas enfermedades se originan por un proceso inflamatorio de las vías aéreas lo cual conlleva a una patología pulmonar de tipo obstructivo, difieren en la naturaleza de los componentes que participan en el proceso inflamatorio representados por células, mediadores solubles y respuesta al tratamiento farmacológico. La expresión clínica de cada una de estas patologías, así como su gravedad y la respuesta a la terapia antiinflamatoria es el resultado de la interacción de diferentes genes con múltiples elementos ambientales, lo cual convierte a cada una de estas patologías en procesos complejos y multifactoriales. (2,3).

Características del asma:

El asma es considerada como una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas, caracterizada por hiperreactividad bronquial, inflamación eosinofílica crónica, episodios de broncoconstricción reversibles e hipersecreción mucosa. La inflamación eosinofílica asociada con asma está acompañada de un incremento de linfocitos CD4+ que a su vez producen un incremento de citosinas del patrón Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) y disminución del interferón gamma. (1,2).

En los últimos 30 años la prevalencia del asma se ha incrementado en los

países desarrollados, afectando aproximadamente a 300 millones de personas a nivel mundial. En los países latinoamericanos, la prevalencia del asma es elevada, variando de un 6,6 a un 32,1% según datos del International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), siendo similar a la encontrada en países desarrollados, incluyendo a EE. UU e Inglaterra. El asma es considerada la enfermedad crónica más común en niños. De manera similar a lo que ocurre en la EPOC, los factores ambientales en combinación con los factores enéticos contribuyen al desarrollo de una forma persistente de la enfermedad. La sensibilización en edades tempranas a diferentes aeroalergenos, presencia de dermatitis atópica y/o rinitis alérgica, tabaquismo materno durante el embarazo y exposición al humo del cigarrillo u otros contaminantes ambientales e infecciones respiratorias bajas incrementan el riesgo de desarrollar asma en forma crónica. (3,4)

Características de la EPOC:

La prevalencia de EPOC está directamente ligada a la del tabaquismo, y de acuerdo a la OMS y el Banco Mundial se estima una prevalencia mundial de 9,3/1000 en hombres y 7,3/1000 en mujeres de todas las edades. El Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (PLATINO) es el primer estudio de base poblacional de prevalencia de EPOC en Latinoamérica. Los resultados de este estudio realizado en 5 ciudades de América Latina (Ciudad de México, Montevideo, Santiago de Chile, San Pablo y Caracas) indican una prevalencia de EPOC entre 7,8% y 19,7%, con una prevalencia en

Caracas de 12,1%. (5) La exposición al humo del cigarrillo representa el principal factor de riesgo ambiental para el desarrollo de EPOC. Aunque un importante subgrupo de pacientes es no fumador, la gran mayoría de los pacientes con Bronquitis crónica son fumadores o ex-fumadores. Sin embargo, solamente el 15%-20% de los sujetos fumadores desarrolla EPOC; de aquí el auge de los estudios que intentan conseguir una asociación entre los diferentes genes candidatos y el desarrollo de la enfermedad. (1,2).

Similitudes y diferencias entre asma y EPOC:

El asma y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) comparan similitudes basadas en los elementos que participan en la respuesta inflamatoria y en la obstrucción de la vía aérea, lo cual origina en ocasiones una superposición de ambas patologías.

La patogenia y la historia natural de este solapamiento entre Asma y EPOC es en la actualidad motivo de debate. Entre los principales factores de riesgo involucrados en la pérdida de la función pulmonar y desarrollo de enfermedad obstructiva pulmonar se encuentran: la edad avanzada, la exposición al humo del cigarrillo (dependiente de la dosis) desde edades tempranas, historia de asma en la infancia, infecciones respiratorias a repetición y exacerbaciones de procesos pulmonares crónicos. (1,2,3).

Uso de los glucocorticoides en asma y EPOC:

Los glucocorticoides difunden a través de la membrana celular y se unen a

los receptores de glucocorticoides (GR) en el citoplasma. Tras su unión al ligando, los GR son activados, liberados de las proteínas chaperonas (proteínas de shock térmico-90 y otras) y trasladados rápidamente al núcleo donde ejercen sus efectos moleculares. (2,3).

La principal acción de los glucocorticoides es desactivar los múltiples genes inflamatorios activados, que codifican citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, enzimas y receptores inflamatorios. Estos genes son activados en la vía aérea de pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) por factores de transcripción pro-inflamatorios, como NF- κ B y activador de proteína 1 (AP-1). Debido a su acción antiinflamatoria e inmunomoduladora son utilizados como base del tratamiento farmacológico en estas dos patologías. (6)

Resistencia a los glucocorticoides:

Algunos pacientes con asma o EPOC severa y asmáticos fumadores tienen una pobre respuesta a glucocorticoides, por lo cual necesitan de altas dosis del mismo para responder, mientras que otros individuos son completamente resistentes. Diversos mecanismos bioquímicos que toman en cuenta la resistencia a glucocorticoides han sido identificados. En individuos fumadores y pacientes con asma severa existe una reducción en la actividad y expresión de la desacetilasa de histonas (HDAC2), lo cual evita que los glucocorticoides desactiven los genes inflamatorios activados. Esta reducción en la actividad de la HDAC2 puede ser secundaria al estrés

oxidativo y nitrativo y a la generación de peroxinitritos (como se observa en los pacientes con EPOC). (2,3).

Polimorfismos genéticos en el gen del receptor de glucocorticoides (GR):

La presencia de ciertas variaciones individuales o polimorfismos pueden alterar la sensibilidad del receptor a la acción de los glucocorticoides. En los últimos años se ha descrito un polimorfismo de tipo sustitución de nucleótido simple (SNP) en una región intrónica del gen que codifica para el receptor de glucocorticoide y que consiste en la sustitución de una guanina (G) por una citosina (C) en la posición +647 del gen; la variante G se ha asociado a una menor respuesta a los esteroides endógenos en linfocitos de sangre periférica y ha sido estudiada en diferentes patologías como obesidad y diabetes mellitus tipo 2.(7) El estudio de esta variabilidad genética en el receptor de glucocorticoides en enfermedades como el asma y la EPOC podría permitir un avance en el campo de la farmacogenética y la farmacogenómica, estableciendo las diferencias individuales en la respuesta a diferentes tratamientos antiinflamatorios, lo cual permitiría el desarrollo de una medicina personalizada en estos pacientes.(6)

El objetivo de este estudio fue determinar la asociación del polimorfismo BclI en el receptor de glucocorticoides con el desarrollo de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica en población venezolana.

Materiales y Métodos

Población de estudio:

Se realizó un estudio clínico de casos-controles, descriptivo, transversal prospectivo en el que se incluyeron 2 grupos de pacientes: 100 personas con diagnóstico de Asma y otras 100 con diagnóstico de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) de una población de pacientes ambulatorios vistos en la Consulta de Neumología del Hospital Universitario de Caracas de la Universidad Central de Venezuela. Así mismo se escogieron al azar 100 individuos sanos de la misma área geográfica, no fumadores, sin síntomas respiratorios o antecedentes de enfermedades respiratorias y con espirometría normal.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela.

Se realizó un consentimiento informado por escrito a cada uno de los pacientes y a los controles sanos para solicitar su aprobación y ser incluidos en el estudio.

Aislamiento y purificación del ADN genómico:

Se realizó el aislamiento del ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica de los dos grupos de pacientes con asma y EPOC y de los controles sanos utilizando el estuche de aislamiento QIAamp® DNA Mini Kit (Laboratorios Qiagen, Hilden, Germany). Este estuche se fundamenta en el tratamiento de cada una de las muestras con una solución tampón de lisis que contiene la enzima

Proteinasa K, y la posterior purificación del ADN mediante columnas de sílica gel.

Amplificación por PCR-RFLP del receptor de glucocorticoides:

La caracterización genotípica del receptor de glucocorticoide +647 (polimorfismo localizado entre el intrón 1 y el intrón 2 del gen ubicado en el cromosoma 5 y que consiste en la sustitución de una guanina por una citosina) se realizó según el protocolo descrito por (Fleury et al, 2003)(7) basados en la amplificación, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de la región genómica de interés utilizando las siguientes secuencias cebadoras y la posterior digestión de los productos amplificados con la enzima de restricción BclI:

Primer forward: 5' AAA TTG AAG CTT AAC AAT TTT GGC-3'

Primer reverse: 5' GCA GTG AAC AGT GTA CCA GAC C-3'

El control negativo para todos los casos de amplificación por PCR consistió en la sustitución del ADN en la mezcla de reacción por agua libre de nucleasas. Los productos de amplificación y de restricción enzimática fueron separados en geles de agarosa al 3% y visualizados en un transiluminador de luz UV, obteniéndose un amplificado por PCR de 206 pb y las siguientes variantes genotípicas posterior a la digestión enzimática (4 UI de la enzima de restricción en cada muestra) a 50°C durante 6 horas:

Genotipo GG: 206 pb.

Genotipo GC: 206 pb+ 116 pb+ 90 pb.

Genotipo CC: 116 pb+ 90 pb.

Analises Estadístico

Se construyó una base de datos electrónica utilizando el programa Excel para Windows XP. Se calculó la media y la desviación estándar de cada uno de los parámetros clínicos utilizando el software G-stat versión 2.0. Se compararon las medias obtenidas con el test de ANOVA. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas con el software SNPstats. Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Se utilizó el método chi cuadrado de Pearson (X²) para estudios de asociación entre la presencia del polimorfismo y la enfermedad (tablas 2x2), considerando un valor de P<0,05 para datos estadísticamente significativos. Se calculó el radio de probabilidad (Odds Ratio) con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el software SNPalyze. Se consideró un valor de P < 0,05 para datos estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

Características clínicas de los pacientes con asma y EPOC. La población bajo estudio consistió en 100 pacientes con diagnóstico definitivo de asma y 100 pacientes con diagnóstico definitivo de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) procedentes de la consulta de Neumología del Hospital Universitario de Caracas, Venezuela. El grupo control constó de 100 individuos sanos, no fumadores, sin síntomas respiratorios y espirometría normal procedentes de la misma área geográfica.

Las características principales de cada grupo se resumen en la tabla 1 en la que se muestran los datos clínicos y espirométricos. Amplificación por PCR del receptor de glucocorticoides (GR) La figura (1) muestra la separación mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% de los productos amplificados correspondientes al polimorfismo de tipo sustitución de nucleótido simple (SNP) en la posición +647 del gen que codifica para el receptor de glucocorticoides (GR) correspondiente a sustitución de una guanina (G) por una citosina (C), utilizando la enzima de restricción BclI la cual reconoce el alelo mutado (C). Las frecuencias genotípicas y alélicas en cada uno de los grupos de estudio (pacientes y controles) se muestran en la tabla 2.

El asma y la EPOC son enfermedades respiratorias de curso crónico con una alta prevalencia tanto a nivel mundial como en Venezuela, con mecanismos etiopatogénicos que muestran semejanzas y diferencias en los factores celulares y solubles que intervienen en ambas patologías y que conllevan a un proceso inflamatorio complejo y multifactorial, en donde participan diferentes elementos ambientales y marcadores genéticos y que finalmente determinan el tipo de respuesta inmunológica que se manifiesta en cada individuo, con diferentes grados de obstrucción al flujo de aire y respuesta al tratamiento farmacológico antiinflamatorio.(1,2)

Al analizar las características demográficas y clínicas de la población estudiada se encontraron diferencias significativas en relación a los promedios de edad entre los pacientes con asma

y los controles con respecto a los individuos con EPOC. Estas diferencias pueden atribuirse fundamentalmente a que el asma (principalmente el asma alérgica o extrínseca) aparece desde los primeros años de vida y en algunos casos los síntomas pueden persistir o reaparecer en la edad adulta;(4) lo contrario sucede con la EPOC, en la cual la aparición de los síntomas y el diagnóstico de la enfermedad se realiza generalmente después de la cuarta década de la vida. (1)

También se pudo observar que en este grupo de pacientes, el hábito tabáquico (medido como número de paquetes/año) fue significativamente mayor en relación a los individuos con asma y el grupo control, considerando que la exposición a elementos ambientales, principalmente el humo del cigarrillo, constituye uno de los principales factores de riesgo para la aparición y el desarrollo de esta enfermedad.(1,2) Igualmente observamos diferencias significativas en los promedios de los principales parámetros medidos en la espirometría, entre el grupo de pacientes con respecto a los controles, encontrando una disminución importante en la capacidad vital forzada (CVF), en el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) y en la relación VEF1/CVF, lo cual caracteriza a las patologías respiratorias de tipo obstructivo como el asma y la EPOC.(2,3).

El polimorfismo +647 G>C en el receptor de glucocorticoides de tipo SNP localizado entre el intrón 1 y el intrón 2 del gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 5, ha sido asociado con una alteración de la sensibilidad del receptor a la acción de los glucocorticoides y se ha relacionado con obesidad abdominal,

resistencia a la insulina y desarrollo de aterosclerosis. El alelo G es el más frecuente y es considerado el alelo salvaje. (6,7) En nuestro estudio las frecuencias genotípicas observadas en los grupos de pacientes y de controles fue similar a lo reportado para otras poblaciones.(7) Se observó una mayor frecuencia del genotipo homocigoto GG en los pacientes con Asma con respecto a los pacientes con EPOC ($p<0,0001$; OR=10,5238; IC95%:4,7801-23,1688) y los individuos controles ($p<0,0001$; OR=16,3061; IC95%:6,5393-40,6601), lo cual sugiere que este polimorfismo podría ser considerado como un factor genético de susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad. Un estudio de asociación de este polimorfismo en pacientes con fibrosis quística mostró relación entre el genotipo G/G con disminución importante en el VEF1 y la CVF en los pacientes en relación a los otros genotipos, sugiriendo que este polimorfismo pudiera modular la respuesta inflamatoria en el pulmón y la evolución de la función pulmonar (. Panek et al. (8) (9)), en un estudio realizado en polacos demostraron asociación del genotipo GG con la presencia de asma.(Rogausch et al(10)) en un estudio realizado en alemanes encontraron asociación del genotipo GG con hábito tabáquico acentuado, mientras que(Schwabe et al(11)) no encontraron asociación de este polimorfismo con la presencia o la severidad de EPOC.

Conclusiones

El Asma y la EPOC son enfermedades de alta prevalencia y que aparecen como resultado de la acción conjunta de múltiples genes que participan en la respuesta inflamatoria crónica característica de ambas patologías. Existen diferencias en los mecanismos moleculares que participan en la fisiopatología de cada entidad. Este estudio permitió realizar la caracterización clínica y genética de la población mestiza venezolana en dos modelos de enfermedades inflamatorias crónicas como lo son el asma y el EPOC. La variante GG para el polimorfismo BclI del receptor de glucocorticoide fue más frecuente en los pacientes con asma, pudiendo asociarse este genotipo con menor respuesta al tratamiento farmacológico (pacientes con asma moderada y severa). Estudios a futuro permitirán determinar la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

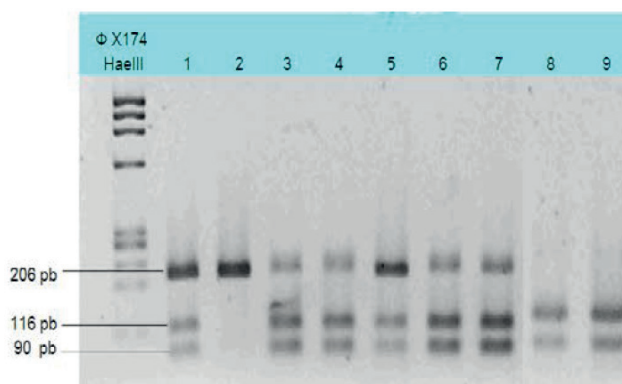
Tabla 1. Características generales de los grupos de pacientes y del grupo control

	Asma	EPOC	Controles	Valor de p
N° de individuos	100	100	100	-
Edad (años)	44,6±15	63,7±10	42,6±14	<0,001
Hombres/Mujeres	22/78	44/56	23/77	-
Paquetes/año	2,26±9	40±26	2,38±8,47	<0,001
No Fumadores	65	4	60	<0,001
Exfumadores	24	79	40	<0,001
Fumadores	6	12	0	-
Fumadores pasivos	5	5	0	-
CVF (L)	2,88±0,93	2,51±0,85	3,76±0,87	<0,001
VEF ₁ (L)	1,91±0,76	1,37±0,44	3,05±0,76	<0,001
VEF ₁ % predicción	69,0±19	58,7±24,8	108,4±14,8	<0,001
VEF ₁ /CVF	0,65±0,11	0,54±0,13	0,81±0,05	<0,001

CVF: capacidad vital forzada basal; VEF1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo basal.

Tabla 2. Distribución de las frecuencias geotípicas y alélicas para el polimorfismo + 647 en el gen receptor de glucocorticoides (GCR) en pacientes y controles

Genotipos	Asma (n=100)	EPOC (n=100)	Controles (n=100)
G/G	51	9	6
G/C	40	85	94
C/C	9	6	0
Alelos			
G	0,71	0,51	0,53
C	0,29	0,49	0,47

Figura 1. Análisis del polimorfismo del receptor de glucocorticoides + 647 G/C mediante ensayo de PCR-RFLP en una muestra de pacientes con asma

La mutación crea el sitio de corte de la enzima Bcl I

Carril M: Marcador de peso molecular Phi X174 Hae III. Carriles del 1 al 9: productos de PCR digeridos con la enzima de restricción BclI. Los pacientes 1,3,4,5,6 y 7 muestran un genotipo heterocigoto (G/C), el paciente 2 muestra un genotipo homocigoto para el alelo G (G/G) y los pacientes 8 y 9 muestran un genotipo homocigoto para el alelo C (C/C).

Referencias Bibliográficas

- Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* (2008) Mar;8(3):183-92.
- Guerra S. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* (2009) Oct;9(5):409-16.
- Cosío BG, Fiorentino F, Scrimini S. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Arch Bronconeumol.*(2010); 46 Suppl 8:2-7.
- Von Mutius E. Influences in allergy: epidemiology and the environment. *J Allergy Clin Immunol* (2004); 113:373-9
- Menezes AM, Pérez-Padilla R, Jardín J, Muiño A, López M, Valdivia G et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (The PLATINO study): a prevalence study. *Lancet.*(2005)Nov 26; 366(9500):1875-81. Marwick JA, Adcock IM, Chung KF. Overcoming reduced glucocorticoid sensitivity in airway disease: molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Drugs.*(2010) May 28; 70(:929-48.
- Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, Labuda D, Sinnett D, Krajinovic M. Characterization of the BclI Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene. *Clin Chemistry* (2003); 49(9):1528-31.
- Corvol H, Nathan N, Charlier C, Chadelat K, Le Rouzic P, Tabary O et al. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression of lung disease in young patients with cystic fibrosis. *Respir Res* (2007); 8:88-96.
- Panek M, Pietras T, Antczak A, Górski P, Kuna P, Szemraj J. The role of functional single nucleotide polymorphisms of the human glucocorticoid receptor gene NR3C1 in Polish patients with bronchial asthma. *Mol Biol Rep.* 2012 Apr; 39(4):4749-57.
- Rogausch A, Kochen MM, Meineke C, Hennig J. Association between the BclI glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in a sample of patients with obstructive airway disease. *Addict Biol.*2007 Mar; 12(1):93-9.
- Schwabe K, Vacca G, Dück R, Gillissen A. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and potential association to chronic obstructive pulmonary disease susceptibility and severity. *Eur J Med Res.* 2009 Dec 7; 14 Suppl 4:210-5.