



## TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para otorgar el título de:  
Magister en Ciencias Biológicas



**Caracterización de los polimorfismos Arg16Gly16 y Gln27Glu del  $\beta$ 2-adrenoreceptor en adultos Colombianos y su asociación con el asma**

Por:

**PAOLA ANDREA CADENA CASTILLO**

Director

Dr. IGNACIO BRICEÑO BACAZAR, MD.PhD  
Profesor Titular del Instituto de Genética Humana  
Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana

Esperanza Holguín. MD, MSc

Directora del Proyecto.  
Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana

Asesor científico

Paola Andrea Ayala  
Profesora Instituto de Genética Humana  
Facultad de Medicina Pontificia Universidad Javeriana

Erik Baltaxe, MD; Julián Palomino, MD; Darío Riascos, MD; Henry Aceros, MD; Iván Solarte, MD.

Miembros del Proyecto.

Bogotá, Colombia  
Enero de 2012

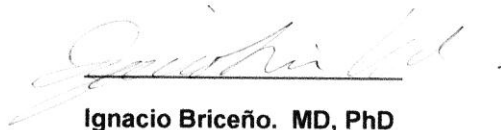
#### **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de La Resolución No 13 de Julio de 1996. “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado. Solo velara por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

**Caracterización de los Polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del  $\beta_2$ -  
adrenoreceptor en adultos Colombianos y su asociación con el asma**

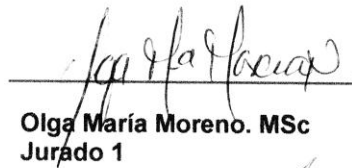
**PAOLA ANDREA CADENA CASTILLO**

**APROBADO**



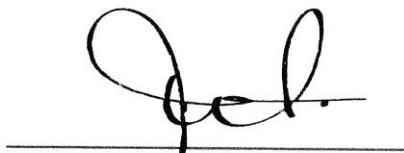
---

**Ignacio Briceño. MD, PhD  
Director**



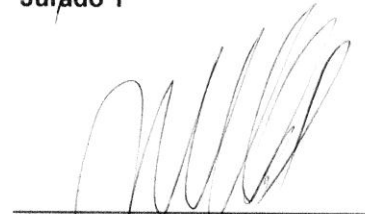
---

**Olga María Moreno. MSc  
Jurado 1**



---

**Jesús Armando Sánchez. MD, MSc  
Jurado 2**



---

**Walter Villalobos. MD, PhD  
Jurado 3**

---

**Manuel Antonio Franco. MD, PhD  
Director de Posgrado  
Facultad de Ciencias**

---

**Ingrid Schuler. Ph.D  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias**

## AGRADECIMIENTOS

- ✚ Al Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, por hacer parte de mi formación académica.
- ✚ Al Doctor Ignacio Briceño, por su orientación, conocimiento y por ser un ser humano tan amable y especial.
- ✚ A Paola Ayala por su ayuda, paciencia y calidez.
- ✚ A la Doctora Esperanza Holguín, por sus enseñanzas y conocimientos.
- ✚ A mis amigas que aportaron con su amabilidad y conocimiento para que se llevara a cabo este trabajo.
- ✚ Infinitas gracias doy a Dios, a la Virgen María y a toda la corte celestial que siempre me apoyo y siempre me dio una luz en momentos de desespero y angustia.
- ✚ A mi Mamita, muy especialmente por apoyarme y por su gran sabiduría recargada de amor y dulces enseñanzas.

Gracias a mi Madre y a mi Abuela puedo escribir estas palabras cargadas de amor y agradecimiento por su formación y enseñanzas

Este trabajo también se lo dedico a la vida, a Dios, a mi familia y a mi compañero de corazón.

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar si los polimorfismos del gen del receptor  $\beta$ 2-adrenergico (ADR $\beta$ 2), Arg16Gly y Gln27Glu se asocian con el asma en adultos que asisten al Hospital Universitario San Ignacio en la ciudad de Bogotá, Colombia. **Materiales y métodos:** Se caracterizaron 70 pacientes asmáticos y 59 no asmáticos para el aminoácido 16 y el 27 del ADR $\beta$ 2, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en ADN extraído de sangre periférica con el Kit de extracción Promega. El análisis de RFLPs se realizó con las enzimas de restricción *NcoI* y *BvuI*, y la visualización de estos polimorfismos se realizó en electroforesis con geles de poliacrilamida. La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del ADR $\beta$ 2 entre los dos grupos se realizó con un test de Chi-cuadrado. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los loci polimórficos, Arg16Gly y Gln27Glu entre el grupo de casos (0.70, 0.30, 0.59 y 0.41 respectivamente) y los controles (0.71, 0.29, 0.70 y 0.30), respectivamente. Las frecuencias genotípicas también fueron similares entre los casos y controles ( $p > 0.05$  para todos los genotipos). De los 4 posibles haplotipos resultantes de la combinación entre los distintos alelos, sólo se presentaron dos con mayor frecuencia en toda la población de estudio (Arg16Gln27 y Gly16Glu27). Una asociación significativa se encontró para el haplotipo Gly16Glu27 y el asma ( $p < 0.05$ ). **Conclusiones:** Estos resultados apoyan el papel de los polimorfismos Gly16 y Glu27 del gen ADR $\beta$ 2 en la susceptibilidad al desarrollo del asma en la población adulta asmática de la ciudad de Bogotá.

## ABSTRACT

**Background:** Several polymorphisms of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor ADR $\beta$ 2 gene associated with asthma have been identified, but the results are not conclusive. **Objective:** To determine whether single nucleotide polymorphisms found in the sequence of the ADR $\beta$ 2 adrenergic receptor are associated with asthma in adults who attend San Ignacio Hospital in the city of Bogotá, Colombia. **Methods and materials:** 70 patients with asthma and 59 controls were studied for amino acid 16 and amino acid 27 of the ADR $\beta$ 2 receptor, through the polymerase Chain Reaction (PCR) in DNA extracted from peripheral blood using Promega extraction Kit and RFLP analysis with restriction enzymes *NcoI* and *BbvI*, and finally visualized with polyacrilamide gel electrophoresis. Comparisons of the ADR $\beta$ 2 genotypes or alleles between different groups were performed using chi-square test. **Results:** No significant differences for the allele frequencies were found for polymorphic loci Arg16Gly and Gln27Glu between the cases group (0.70, 0.30, 0.59 and 0.41 respectively) and the control group (0.71, 0.29, 0.70 and 0.30, respectively). The genotype frequencies were also similar between cases and the controls ( $p > 0.05$  for all the genotypes). Only two of the 4 possible haplotypes, from the combination between different alleles, were frequent in the participants of this study (Arg16Gln27 and Gly16Glu27). Significant association between the Gly16Glu27 haplotype and asthma ( $p < 0.05$ ) was found. **Conclusion:** Our results imply that the existence of the haplotype Gly16Glu27 may confer susceptibility to asthma in Bogotá, Colombia.



## Contenido

1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	15
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Genética del asma .....	17
2.1.1. Influencias ambientales interactivas.....	18
2.1.2. Influencias interactivas de los sistemas biológicos .....	19
2.1.3. Momento oportuno .....	19
2.2. Definición del asma .....	23
2.2.1. Mecanismos del asma.....	23
2.2.2. Remodelamiento de la vía aérea.....	24
2.3. Epidemiología.....	25
2.4. Diagnóstico .....	27
2.4.1. Síntomas .....	27
2.4.2. La Espirometría .....	27
2.5. Terapia del Asma.....	27
2.5.1. Medicamentos de alivio o rescate.....	28
2.5.2. Agonista $\beta_2$ adrenérgicos de Acción prolongada inhalados: (formoterol y salmeterol).....	28
2.5.3. Los $\beta_2$ -agonistas de acción rápida.....	28
2.5.4. Antimuscarínicos (Bromuro de Ipratropium).....	28
2.6. Receptores de broncoconstrictores .....	29
2.7. Receptores de broncodilatadores. ....	31
2.8. Polimorfismos en el gen ADR $\beta_2$ .....	33
2.8.1. Relación entre los polimorfismos del gen ADR $\beta_2$ y asma.....	37
2.9. Regulación de la actividad del $\beta_2$ -adrenoreceptor.....	44
2.9.1. Desacoplamiento del $\beta_2$ adrenoreceptor de la proteína G $\alpha$ S .....	44
2.9.2. Mecanismo de Endocitosis .....	44
2.9.3. Proceso de resensibilización.....	45
2.9.4. Efectos funcionales in vitro de los polimorfismos del $\beta_2$ adrenoreceptor. ....	46
2.9.5. Relación entre estudios In Vitro e In Vivo:.....	47
2.9.6. Respuestas In Vivo de los agonistas de $\beta_2$ : Efectos del Genotipo y el Haplotipo .....	48
2.9.7. Efectos agudos.....	48

2.9.8.	Dosificación crónica.....	50
2.9.9.	Tolerancia.....	51
3.	HIPÓTESIS .....	53
3.1.	Hipótesis Nula.....	53
4.	OBJETIVOS.....	53
4.1.	Objetivo General.....	53
4.2.	Objetivos Específicos .....	53
5.	METODOLOGIA.....	54
5.1.	Población de Estudio y Muestra .....	54
5.2.	Variables de Estudio .....	54
5.3.	Criterios y Definiciones .....	55
5.3.1.	Casos.....	55
5.3.2.	Criterios de inclusión.....	55
5.3.3.	Criterios de exclusión.....	55
5.3.4.	Controles.....	56
5.3.5.	Criterios de inclusión.....	56
5.3.6.	Criterios de exclusión.....	56
5.3.7.	Criterios de severidad .....	56
5.4.	Recolección y manejo de la Información.....	56
5.4.1.	Datos demográficos, clínicos y paraclínicos .....	56
5.5.	Trabajo molecular .....	57
5.5.1.	Obtención de muestras.....	57
5.5.2.	Extracción de DNA .....	57
5.5.3.	Evaluación del rendimiento de la extracción de ADN .....	57
5.5.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	57
5.5.5.	Visualización de los resultados .....	58
5.5.6.	Digestión enzimática de productos amplificados (RFLPs) .....	60
5.5.7.	Presencia del polimorfismo Arg16Gly .....	61
5.5.8.	Verificación de genotipos Arg16Gly.....	61
5.5.9.	Presencia del polimorfismo Gln27Glu .....	61
5.5.10.	Verificación de genotipos Gln27Glu .....	61
5.6.	Análisis estadístico. ....	62
6.	RESULTADOS .....	63
6.1.	Descripción demográfica de la población.....	63

6.2.	Descripción de las características clínicas de los individuos asmáticos.....	64
6.3.	Descripción de resultados moleculares.....	65
6.4.	Presencia del Polimorfismo Arg16Gly del ADR $\beta$ 2.....	66
6.5.	Presencia del polimorfismo Gln27Glu del ADR $\beta$ 2.....	66
6.6.	Estimación del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	66
6.6.1.	Inferencias de los polimorfismos Gly16 y Glu27.....	67
6.7.	Frecuencias alélicas y genotípicas del ADR $\beta$ 2 en otras poblaciones.....	68
6.8.	Asociación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu entre casos y controles.....	69
6.9.	Asociación de las frecuencias Genotípicas del polimorfismo Arg16Gly del ADR $\beta$ 2, entre casos y controles.....	69
6.10.	Asociación de las Frecuencias Genotípicas del polimorfismo Gln27Glu del ADR $\beta$ 2, entre casos y controles.....	70
6.11.	Distribucion Alelo- haplotipo en casos con asma.....	70
6.12.	Distribucion Alelo- haplotipo en controles.....	71
6.12.1.	Relación de haplotipos entre casos y controles.....	71
6.12.2.	Comparación de haplotipos por genotipos de los polimorfismos Gly16 y Glu27 del ADR $\beta$ 2 entre casos y controles.....	72
6.12.3.	Análisis de haplotipos del ADR $\beta$ 2 en la población de afectados.....	73
6.12.4.	Relación de los alelos Arg16-Gly16 y el fenotipo.....	73
6.13.	Relación de los alelos Gln27-Glu27 y el fenotipo.....	73
6.14.	Relación entre el fenotipo y el polimorfismo Arg16Gly.....	74
6.15.	Relación entre el fenotipo y el polimorfismo Gln27Glu.....	74
6.16.	Distribucion Alelo-haplotipo-Fenotipo de severidad.....	75
6.16.1.	Distribucion Alelo-haplotipo-Fenotipo de no severidad.....	75
6.17.	Relación haplotipo-Fenotipo.....	76
6.17.1.	Distribución Haplotipo-fenotipo en el gen ADR $\beta$ 2.....	76
7.	DISCUSIÓN.....	78
7.1.	Frecuencias alélicas y genotípicas del gen ADR $\beta$ 2 en otras poblaciones y su asociación con el asma.....	84
8.	CONCLUSIONES.....	86
9.	PERSPECTIVAS Y APLICACIONES.....	87
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	88
11.	ANEXOS.....	94
11.1.	Anexo 1. Manual de Códigos.....	94
11.2.	Anexo 2 Protocolo de extraccion de DNA por kit wizard Promega.....	95

11.3. Anexo 3. Consentimiento Informado ..... 96

## Índice de tablas:

Tabla 1 Asociaciones del ADR $\beta$ 2 con fenotipos de asma .....	43
Tabla 2 Polimorfismos identificados por análisis de RFLP .....	60
Tabla 3 Condiciones para la detección de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del ADR $\beta$ 2 (PCR- RFLPs).....	62
Tabla 4 Distribución de las variables demográficas de la población estudiada ....	63
Tabla 5 Características de los individuos asmáticos en el estudio .....	64
Tabla 6 Distribución del polimorfismo Arg16Gly16 en la población asmática y no asmática.....	67
Tabla 7 Distribución del polimorfismo Gln27Glu en la población asmática y no asmática.....	67
Tabla 8 Poblaciones en las cuales han sido reportadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Arg16Gly en adultos sin asma. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 9 Grupos étnicos en los cuales han sido reportadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Gln27Glu. ....	68
Tabla 10 Asociación de las Frecuencias alélicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu entre casos y controles. ....	69
Tabla 11 Asociación del polimorfismo Arg16Gly entre casos y controles. ....	70
Tabla 12 Asociación del polimorfismo Gln27Glu entre casos y controles. ....	70
Tabla 13 Distribución Alelo- haplotipo en casos con asma .....	71
Tabla 14 Distribución Alelo- haplotipo en controles.....	71
Tabla 15 Relación de haplotipo entre casos y controles .....	72
Tabla 16 Relación de Haplotipos del $\beta$ 2 -adrenoreceptor entre casos y controles	72
Tabla 17 Distribución de los genotipos de las variantes Gly16 y Glu27 en el grupo de los casos. ....	73
Tabla 18 Distribución de las frecuencias alelos Arg16 y Gly16 en individuos con asma severa y no severa. ....	73
Tabla 19 Distribución de las frecuencias alelos Gln27 y Glu27 en individuos con asma severa y no severa. ....	74
Tabla 20 Distribución del polimorfismo Arg16Gly de acuerdo al fenotipo de severidad.....	74
Tabla 21 Distribución del polimorfismo Gln27Glu de acuerdo al fenotipo de severidad.....	75
Tabla 22 Distribución de alelos y Haplotipos de acuerdo al fenotipo de severidad	75
Tabla 23 Distribución de alelos y Haplotipos de acuerdo al fenotipo de no severidad.....	75
Tabla 24 Relación haplotipo-Fenotipo.....	76
Tabla 25 Distribución de Haplotipos de acuerdo al grado de severidad.....	76
Tabla 26 Relación de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu y el asma en otras poblaciones de América latina.....	85

## Índice de figuras:

Figura 1. Genes asociados con el asma .....	21
Figura 2. Dos enfoques diferentes en el estudio de los componentes genéticos en las enfermedades humanas como el asma.....	22
Figura 3 Fisiopatología del asma. ....	25
Figura 4. Esquema de los mecanismos de la bronco relajación y bronco constricción del musculo liso aéreo.....	31
Figura 5. Esquema de las funciones del $\beta$ 2-adrenoreceptor .....	33
Figura 6 Gen ADR $\beta$ 2.....	36
Figura 7 . Posiciones relativas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu .....	37
Figura 8. Regulación del $\beta$ 2-adrenoreceptor (desensibilización y Downregulation): .....	46
Figura 9. Comparación de los fenotipos en el modelo estático vs el dinámico de la regulación del receptor.....	48
Figura 10 Prevalencia del asma en el mundo .....	26
Figura 11 Patogenia y acción de los fármacos en el asma (FDE, fosfodiesterasa;LT-Rc, receptor de leucotrienos.....	29
Figura 12 Polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2. (RFLPs).....	60
Figura 13 Electroforesis de la amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo Arg16Gly del gen ADR $\beta$ 2 .....	65
Figura 14 Electroforesis de la amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo Gln27Glu del gen ADRB2. ....	65

## 1. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Según el documento del “Global Initiative for Asthma”[1], el asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, en la cual diversos elementos celulares desempeñan un papel importante. La inflamación crónica induce a un aumento en la hiperreactividad de la vía aérea que provoca los episodios recurrentes de sibilancias, disnea, dificultad respiratoria y tos. Estos episodios se asocian generalmente a una obstrucción extensa y variable del flujo aéreo pulmonar [1].

El asma es una importante preocupación a escala mundial, debido a que afecta a millones de pacientes, familias y sistemas de salud de todo el mundo. Las investigaciones de las directrices internacionales, como GINA, y el Estudio Internacional del Asma y las Alergias en la Infancia (ISAAC) [1, 2], entre otros, estiman que el asma afecta a 300 millones de individuos en el mundo y que la prevalencia global de esta enfermedad está entre 1–20%, con una mortalidad anual de 250.000 personas/año [1]. En Colombia se estima que la prevalencia es cercana al 10,4% y se ha ido observando un aumento en la consulta con casos de asma severa y asma refractaria al tratamiento [2, 3].

En cuanto a la genética, algunos estudios de la segregación familiar del asma han demostrado que no es un solo gen el responsable de la expresión total de la enfermedad, sino que es probable que un conjunto de genes ligados al asma puedan controlar la expresión total de la enfermedad, pero en la actualidad se plantea que las influencias ambientales también controlan la expresión de los diferentes factores de riesgo para la enfermedad y que además pueden influir considerablemente en la penetrancia de los genes. Dentro de este marco, la terapia para el manejo de la enfermedad representa una parte de la exposición ambiental, que se considera como un tipo especial de interacción de gen-por-ambiente. De esta manera, si los mecanismos involucrados en la aparición del asma difieren de aquellos involucrados en sus manifestaciones clínicas, es importante reconocer los genes que participan en la susceptibilidad de los fenotipos de la enfermedad y de esta manera asociarlos con la severidad de la enfermedad aún en ausencia del efecto perjudicial [4]. Debido a esto, la interacción de gen-por-ambiente y la estabilidad de las variaciones genéticas a través de la vida, es coherente con que la herencia es determinante en la respuesta a un medicamento.

A nivel investigativo, el gen que codifica para el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico, el cual tiene como función la respuesta broncodilatadora de las vías aéreas del pulmón, ha sido ampliamente estudiado en el asma por diferentes razones. Primero, está localizado en la región cromosómica 5q que está ampliamente ligada con la enfermedad. Segundo, de los múltiples polimorfismos que existen en su gen, uno en el nucleótido 46 en donde se encuentra un cambio de adenina por guanina (A46G), que produce la sustitución de una arginina por una glicina en el aminoácido 16 (Arg16Gly) y la variante en el nucleótido 79, que da un cambio de citosina por guanina (C79G), y a nivel del aminoácido en la posición 27, produce un cambio de glutamina por ácido glutámico (Gln27Glu) [5, 6]. Estos polimorfismos en estudios in vitro y clínicos se han relacionado con alteraciones en la expresión y función del receptor, representadas como “Downregulation”- degradación del receptor o desacoplamiento del receptor-“desensibilización” que influyen en la respuesta a los agonistas del receptor [7]. Tercero, las proteínas que codifica se expresan en varias clases de células pulmonares, que juegan un papel importante en el control del tono bronquial y en la respuesta a los medicamentos más comúnmente usados para el tratamiento del asma [8].

Actualmente se sabe que la respuesta a los  $\beta$ -agonistas o el tratamiento broncodilatador es diferente en cada individuo y algunos estudios afirman que estos cambios se relacionan con el comportamiento de la enfermedad y se cree que son dados por las variaciones en los sitios diana del receptor, generados por los polimorfismos en la secuencia de DNA que codifica para el  $\beta$ 2-adrenoreceptor. A diferencia de otros factores que influyen en la respuesta a un medicamento, los que son determinados por variaciones genéticas generalmente se mantienen estables a través de la vida del individuo [5, 6].

La alteración en la función del receptor podría explicar diferentes grados de severidad del fenotipo asmático, hiperreactividad bronquial y asma nocturna [7]. Sin embargo, hay gran controversia en cuanto al papel que juega el gen en la enfermedad, ya que hay datos que sugieren una relación con el asma, pero al realizar comparaciones de la presencia de estos polimorfismos en pacientes asmáticos y controles, los resultados han sido inconsistentes y los polimorfismos que resultan informativos en una población pueden no serlo en otra. Así, el descubrimiento de factores genéticos asociados a asma y aquellos que son propios de cada población podrían tener un gran impacto en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y de tratamiento. Por lo tanto, es importante realizar estudios en nuestro medio que nos proporcionen una medida de la variabilidad genética del receptor en nuestra población.

Teniendo en cuenta que en Colombia hay una prevalencia del 10,4% de individuos con asma y el poco conocimiento que tenemos de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del gen del  $\beta$ 2-adrenoreceptor en nuestra población de adultos [3], se hace necesario caracterizar si la frecuencia de los alelos, los genotipos o haplotipos está alterada, es menor o influye entre asmáticos y no asmáticos y determinar sus implicaciones; si las tiene, para el desarrollo de diagnósticos específicos y sensibles para prevenir y mejorar el pronóstico de un individuo con asma.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Genética del asma*

La activación de diferentes tipos celulares (células B y T, eosinófilos, macrófagos) y moléculas (mediadores intracelulares, citocinas) en un espacio y tiempo dado (fase temprana, remodelación), reflejan la gran complejidad genética del asma. De esta manera dado que muchos de los resultados derivados de los estudios de asociación no son fácilmente replicados entre las poblaciones, se sugiere que esta complejidad también está dada por una contribución genética diferencial intrínseca a cada población. Sin embargo, aún con estas limitaciones, a la fecha se han reportado más de 100 genes candidatos en asma, de los cuales cerca de 25 de ellos muestran resultados consistentes en varias poblaciones. Tamizajes genómicos han ligado las características relacionadas con el asma a varias regiones cromosómicas, incluyendo 2q, 5q, 6p, 12q, y 13q, estos incluyen genes que codifican para citocinas y sus receptores, receptores nucleares, receptores transmembranales, receptores acoplados a proteínas G, fosfatasa, transportadores, canales iónicos, factores de transcripción, enzimas, etc. Dentro de éstos se encuentran: IL-4, IL-13, receptor  $\beta$ 2-adrenérgico (ADR $\beta$ 2), HLA-DRB1, HLADQB1, TNF $\alpha$ , subunidad  $\beta$  del receptor Fc de alta afinidad a IgE (FCER1 $\beta$ ), IL4R, metaloproteasa y desintegradora 33 (ADAM33), IL-10, STAT6, receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), RANTES, filagrina (FGL), IL-17F, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), antígeno 14 de diferenciación de monocitos (CD14), glutatión S-transferasa T1 (GSTT1), glutatión S-transferasa P1 (GSTP1), entre otros. [9]

La mayoría de los polimorfismos de susceptibilidad para el asma se encuentran en genes que codifican para proteínas involucradas en los procesos inflamatorios; en la síntesis de IgE y en la respuesta inmune. Entre los más importantes están las citosinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y sus receptores, HLA y TNF $\alpha$ . Los polimorfismos modificadores, como su nombre lo indica, modifican el curso de la enfermedad y por lo tanto están relacionados con la gravedad de la misma. Los principales genes asignados a este grupo son el ADR $\beta$ 2 y la metaloproteasa ADAM33 [9].

Por su parte los polimorfismos asociados a respuesta al tratamiento se localizan en genes que codifican para proteínas que participan en el transporte y metabolismo de los fármacos. Dentro de este grupo se ubican a los genes ADR $\beta$ 2, ALOX5 (5-lipoxigenasa), LTCC4S (leucotrieno sintetasa C4) y GCCR (receptor de glucocorticosteroides) [9].

Pero para entender la complejidad del asma, es importante mostrar una aproximación integrada del asma, ligando la variación en la secuencia de DNA a manifestaciones fenotípicas específicas de la enfermedad, teniendo en cuenta las influencias de los sistemas biológicos y los factores ambientales que interactúan en un momento oportuno e influyen en el desarrollo de la enfermedad. Una suposición a lo descrito anteriormente es que el principal efecto genético en el riesgo del asma sea homogéneo entre las diferentes poblaciones. Sin embargo; esta suposición no es fiable si los efectos de las variantes genéticas dependen de la presencia de (y la interacción con) otros factores cuya frecuencia y distribución varía entre individuos y poblaciones [10]. Para este caso se puede plantear un modelo con tres factores modificadores para tal aproximación:

1. Influencias que interactúan desde el ambiente. (Geografía-Terapia)
2. Influencias que interactúan desde los sistemas biológicos. (músculo liso bronquial: receptores, células y señales)
3. Procesos del desarrollo (es decir: momentos de oportunidad, Tiempo-espacio).

De esta manera el asma es una enfermedad que muestra una heterogeneidad extrema. La heterogeneidad se manifiesta de muchas maneras: edad de aparición, severidad, respuesta al tratamiento, fenotipos intermedios, historia natural, entre otros. Su aparición puede ser a cualquier edad, esta reconoce un gran número de factores desencadenantes específicos y no específicos. Puede tener un fenotipo desde leve hasta ser una enfermedad que pone en riesgo la vida. Está asociada a un gran número de fenotipos intermedios tales como la atopia, hiperreactividad bronquial, eosinofilia entre otras, que pueden presentarse en cualquier combinación. Por ejemplo en el caso de ADAM33, localizado en el cromosoma 20p13 es ilustrativo con respecto a la caracterización fenotípica. La indicación original de ligamiento detectado entre el asma (confirmada clínicamente) y 20p13 comenzó a ser mucho más evidente cuando el fenotipo fue caracterizado por la presencia de la hiperreactividad bronquial (BHR), pero no lo fue con el fenotipo mixto de asma más Ig-E total elevada. También se han asociaciones a partir de análisis de ligamiento multipunto de regiones ligadas al asma, por ejemplo; en el cromosoma 12q, se encontró que tenía tres *loci* distintos que por separado estaban ligados al asma, BHR y al volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), este hallazgo se encontró en un grupo de familias identificadas a través del Programa para el Manejo del Asma en la Infancia [11].

Se ha sugerido que la exposición a la endotoxina y a mascotas podría tener efectos protectores contra las características relacionadas con el asma durante la infancia; mientras que la misma exposición desencadena síntomas e inflamación de las vías aéreas cuando la enfermedad ya se ha desarrollado [12]

### 2.1.1. Influencias ambientales interactivas

La interacción se define con base en las modificaciones a un efecto, y está presente cuando el efecto principal o factor A en el riesgo de una enfermedad, difiere significativamente a través de los distintos niveles de exposición al factor B. Esta interacción se define como una interacción gen-por-ambiente si A es el factor genético y B es el factor ambiental (o viceversa). Recientes trabajos en dos genes de inmunidad innata (TLR2 y CD14) han proporcionado evidencia de interacciones cualitativas y cuantitativas en el asma [13].

Dentro de este marco de influencias ambientales, CD14 eventualmente podría representarse como el ejemplo más interesante de la interacción cualitativa en la genética del asma. Por ejemplo, de acuerdo con el reporte original de CD14, en una población urbana de Dinamarca, en donde los adultos portadores del alelo T tenían en promedio un número más bajo de positivos para pruebas en piel, que los individuos homocigotos para el alelo C. Sin embargo; dos grandes estudios epidemiológicos en Alemania no pudieron encontrar ninguna asociación entre CD14/-159 y los niveles de Ig-E o la prevalencia de las enfermedades atópicas. Hay reportes relacionados con individuos que se suponen que

han estado fuertemente expuestos a endotoxinas que cuestionan el enfoque de la asociación entre CD14/-159 y la atopia. Estos estudios sugieren un papel protector para el alelo C más que para el alelo T. Estos hallazgos conflictivos apoyan la existencia de la interacción cualitativa gen-por –ambiente y sugieren que el mismo alelo puede proveer protección o aumentar el riesgo de las características relacionadas con el asma dependiendo de la población de estudio y su nivel de exposición a endotoxinas [14-17].

### 2.1.2. Influencias interactivas de los sistemas biológicos

Según Guerra y Martínez [18], el ambiente se concibe como la totalidad de circunstancias que rodean y/o con las cuales el cuerpo interactúa. El ejemplo más simple está representado por la interacción entre polimorfismos en diferentes *loci*. En las investigaciones sobre el asma también se encuentran ejemplos de interacciones entre genes que están involucrados en rutas moleculares similares. Como es el caso del receptor alfa (IL-4R $\alpha$ ) que juega un papel fundamental en la modulación de los receptores de unión IL-4 y IL-13 [19]. Ambas citoquinas son producidas por las células Th2 y están involucradas en la producción de Ig-E, que es un fenotipo importante relacionado con el asma, en cuanto a esto, es interesante saber que en la población danesa la combinación de los genotipos de riesgo para SNPs en los genes IL-4R $\alpha$  y IL-13 confiera un riesgo para el asma significativamente mayor que el esperado bajo un modelo simple [20].

Las interacciones de SNP-por-SNP y de gen-por-gen son solamente dos de los múltiples posibles tipos de efectos interactivos que se presentan en los sistemas biológicos. Todavía se sabe muy poco sobre la posible influencia de la epigenética en la susceptibilidad a una enfermedad compleja, pero también es posible que los procesos de la regulación génica modulen el impacto funcional de la variación en la secuencia del DNA, y su medición debe ser considerada en futuros estudios funcionales y de asociación [18].

### 2.1.3. Momento oportuno

El inicio de muchas enfermedades complejas ocurre casi siempre dentro de un momento oportuno, esto es, dentro de intervalos limitados de tiempo y/o de desarrollo, durante los cuales las exposiciones genéticas y ambientales ejercen su máximo efecto sobre el riesgo de una enfermedad. Por ejemplo, muchos niños que desarrollan asma muestran marcadores tempranos de alergia y polarización Th2 que parecen estar relacionados con alteraciones en los procesos del desarrollo del sistema inmune durante los primeros años de vida. Dado que estas alteraciones están probablemente relacionadas con la presencia o ausencia de algún tipo específico de exposición ambiental, se concluye que, para poder entender el impacto de las variantes genéticas sobre la susceptibilidad al asma, no solo se debe tener en cuenta el nivel, sino también el tiempo de exposición al estímulo ambiental. Una vez más, este concepto puede estar mejor ilustrado en los estudios de CD14 [15].

De acuerdo con la hipótesis de la higiene, se ha sugerido que la exposición a microbios durante los primeros años de vida puede reducir el riesgo de sensibilización a la atopia y al asma. Estudios en animales han demostrado que la exposición a endotoxinas antes de (pero no después de) la sensibilización, elimina la respuesta tipo Th2 ligada a algunos fenotipos de asma. Además, los niveles plasmáticos de sCD14 que se encuentran en el

momento del nacimiento se correlacionan directamente con la producción temprana de IFN- $\gamma$  e inversamente con el riesgo de sibilancias recurrentes antes del primer año de edad, indicando la importancia de la respuesta adecuada de CD14 durante la vida temprana, para la maduración y protección del sistema inmune contra los posibles fenotipos del asma. Sin embargo, una vez que se presenta un episodio de asma, está establecido que la exposición a endotoxinas desencadena los síntomas de la enfermedad y es un factor agravante de su severidad. Estos resultados sugieren que la activación de los sistemas receptores de endotoxinas debe ocurrir en el momento adecuado durante el proceso de sensibilización para que puedan ejercer su efecto protector sobre el riesgo del asma. De acuerdo con este escenario, en una cohorte longitudinal de Belmont, New South Wales, se encontró que CD14/-159 (alelo asociado con el aumento en la expresión del gen) ejercía un efecto protector contra la atopia durante la edad escolar, pero esta protección desaparecía cuando los niños entran en la adultez. De hecho, entre los granjeros adultos que por su ocupación están expuestos a niveles elevados de endotoxinas, el mismo alelo estuvo asociado con el incremento en el riesgo de sibilancias y de reducción en la función pulmonar [6].

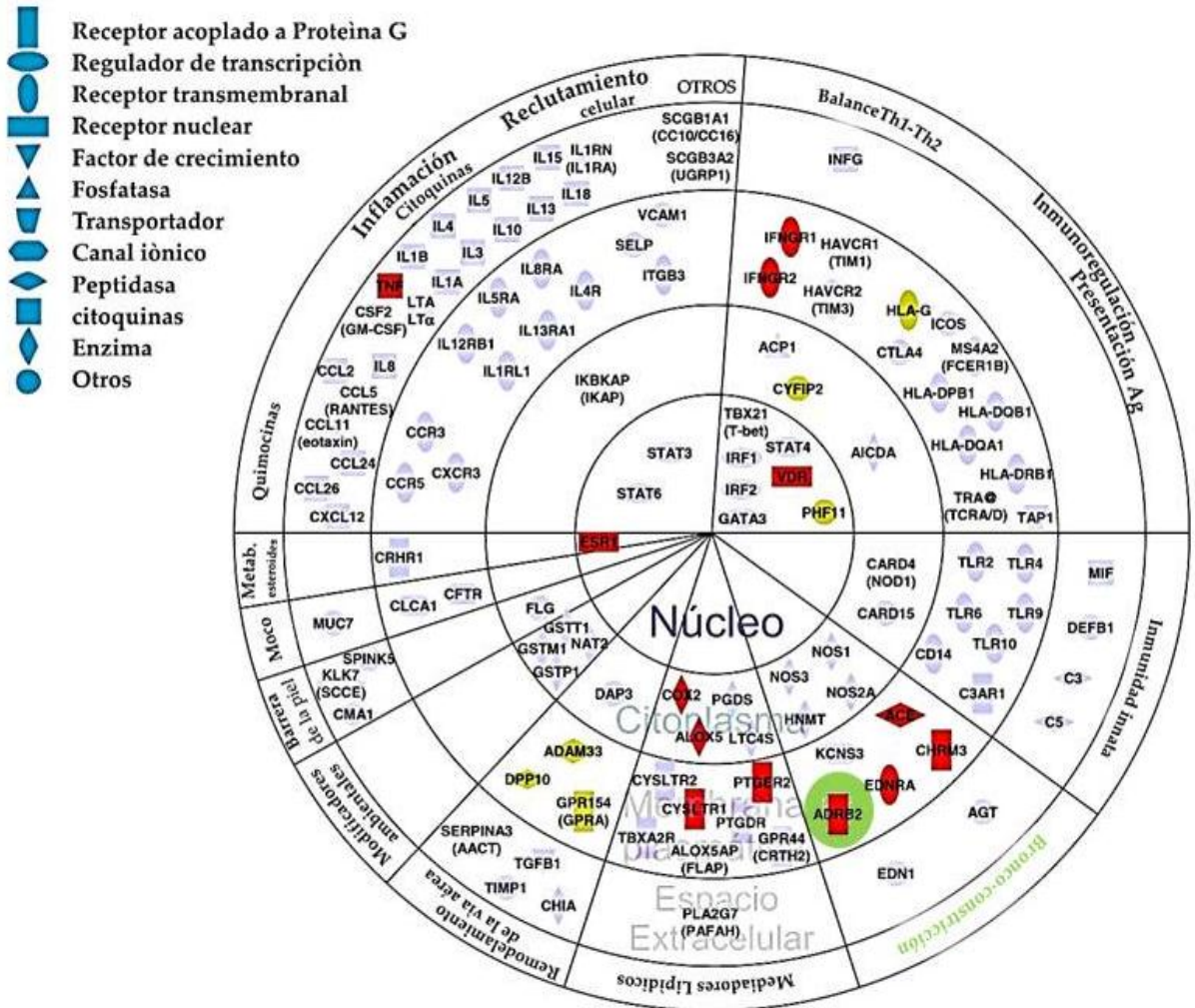
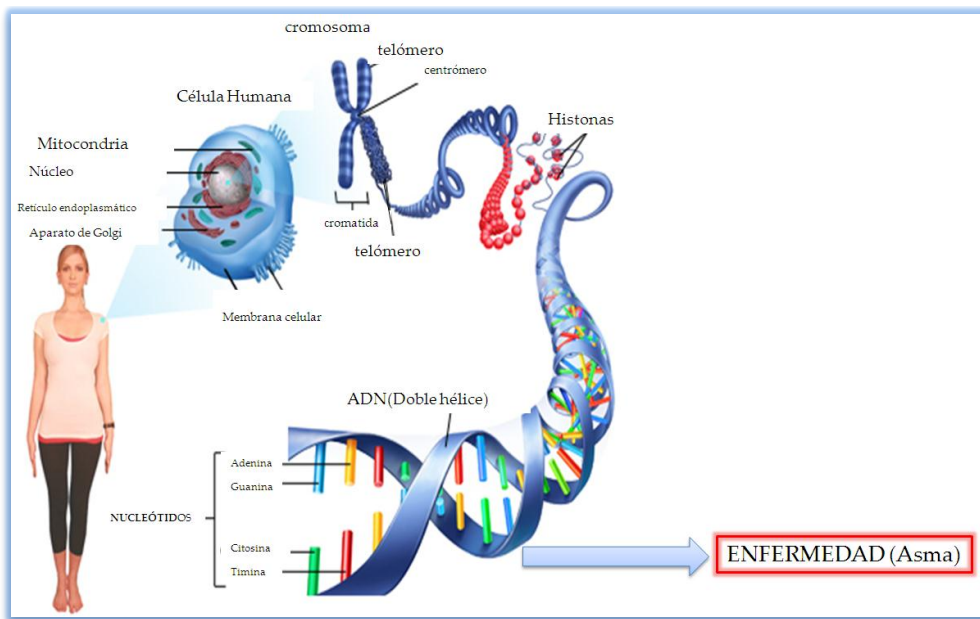


Figura 1. Genes asociados con el asma

La activación de diferentes tipos celulares (células B y T, eosinófilos, macrófagos) y moléculas (mediadores intracelulares, citocinas) en un espacio y tiempo dado (fase temprana, remodelación), reflejan la gran complejidad genética del asma. En un esfuerzo por eludir estos obstáculos, se han realizado estudios de vinculación para los genes que controlan fenotipos aparentemente más simples, la función y localización subcelular de estos genes son categorizadas por el fenotipo del asma. Dentro de éstos se encuentran: IL-4, IL-13, receptor  $\beta$  2-adrenérgico (ADR $\beta$ 2), HLA-DRB1, HLADQB1, TNF $\alpha$ , subunidad  $\beta$  del receptor Fc de alta afinidad a IgE (FCER1 $\beta$ ), IL4R, metaloproteasa y desintegradora 33 (ADAM33), IL-10, STAT6, receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), RANTES, filagrina (FGL), IL17F, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4), antígeno 14 de diferenciación de monocitos (CD14), glutation S-transferasa T1 (GSTT1), glutation S-transferasa P1 (GSTP1), entre otros [9]. (Imagen tomada de Bossé *et al.*, 2007[9])



b)

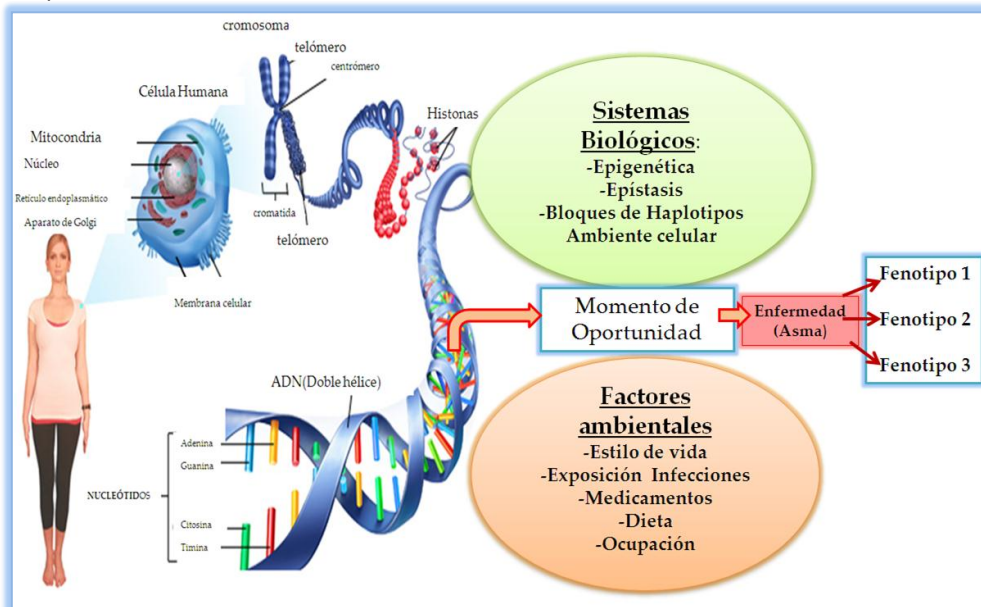


Figura 2. Dos enfoques diferentes en el estudio de los componentes genéticos en las enfermedades humanas como el asma.

(a) En un modelo lineal simple o estático, la secuencia de DNA es asociada con el riesgo de padecer una enfermedad. (b) En una aproximación integral se involucra las variaciones en la secuencia con manifestaciones fenotípicas específicas de una enfermedad teniendo en cuenta influencias que confluyen desde los sistemas biológicos y factores ambientales que interactúan dentro de un momento oportuno [18]. (Figuras tomadas de Martínez *et al.*, [18])



## 2.2. **Definición del asma**

El asma debe ser considerada como una enfermedad caracterizada por: la *inflamación, obstrucción bronquial y la hiperreactividad de la vía aérea.*

### 2.2.1. **Mecanismos del asma**

En el asma se observa que la exposición repetida a un alérgeno, puede conducir al desarrollo de la inflamación y la hiperreactividad de la vía aérea. En individuos asmáticos sensibilizados, la respuesta alérgica se caracteriza por una respuesta temprana o precoz, resuelta dentro de 1 a 2 horas. En la respuesta temprana los alérgenos forman complejos con IgE en la superficie de los mastocitos y los activan, esto permite la liberación de mediadores preformados como los leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>) y prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α) por la vía del ácido araquidónico que se activa dentro del mastocito. El factor activador de plaqueta, factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos, factor de necrosis tumoral, IL-4, IL-5 e IL-6 relacionan al mastocito también con la respuesta tardía del asma, este episodio se caracteriza por la producción de moco y broncoconstricción. El efecto de la contracción del músculo liso bronquial es exagerada por el engrosamiento de la pared de las vías respiratorias debido al edema agudo, la infiltración de diferentes células [1], la hiperplasia crónica, la secreción de células vasculares (remodelación) y la deposición de proteínas de la matriz en la pared de la vía aérea. Debido a todos los mecanismos anteriormente descritos, la limitación del flujo de aire se observa cuando el lumen de las vías respiratorias se llena de secreciones viscosas producidas por las células caliciformes, glándulas sub mucosales, proteínas plasmáticas de la microvasculatura bronquial y restos celulares. Como consecuencia del estrechamiento de las vías respiratorias la resistencia de la vía aérea se incrementa y el máximo flujo espiratorio se reduce [21, 22].

Los mastocitos residentes en la pared del bronquio constituyen los principales efectores de la respuesta temprana debido a la gran cantidad de citocinas neoformadas que liberan como la IL-4 e IL-13, que son claves para la inducción de síntesis de Ig-E. El mastocito también libera heparina, triptasa y proteasas neutras; en el lavado broncoalveolar, se ha mostrado que la triptasa es un marcador específico de la activación del mastocito, esta proteasa degrada el fibrinógeno y activa la colagenasa, estimula la angiogénesis, la proliferación epitelial, la producción de colágeno tipo 1 por fibroblastos y la proliferación tisular bronquial. La quimasa en los mastocitos, puede convertir la angiotensina I en angiotensina II, esto permite degradar la membrana basal de la epidermis y estimular la secreción de moco [22].

Algunos individuos asmáticos presentan una respuesta alérgica tardía (RAT) y el hallazgo característico de (RAT), es la infiltración de células inflamatorias sobre todo de eosinófilos, que liberan quimiocinas y citoquinas tras la activación dependiente de Ig-E de los mastocitos, posteriormente si los alérgenos se entrecruzan con los mastocitos activados a través de receptores Ig-E de alta afinidad (FcεRI), aumentará la liberación de citocinas de los mastocitos y basófilos, promoviendo de este modo la presentación de antígeno a las células T. El papel efector y potente de los eosinófilos es la capacidad que tienen para degradar la matriz conectiva del tejido y dañar las estructuras del epitelio bronquial; pero esta capacidad del eosinófilo se da porque el libera proteínas tóxicas de sus gránulos como: la proteína básica mayor (MBP), proteína catiónica del eosinófilo (ECP), peroxidasa del eosinófilo (EPO), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN), leucotrienos,

prostaglandinas y el factor activador de plaquetas(PAF), causando así la broncoconstricción, hiperreactividad y daño epitelial en la vía respiratoria . Las MBP producen inflamación, daño epitelial e hiperreactividad bronquial, lo que sugiere que tiene un papel crítico en la patogénesis del asma. Su mecanismo de acción parece depender de su capacidad de reaccionar con los liposomas de las membranas celulares, al producir agregación de los mismos, fusión y lisis. Las proteínas ECP son ricas en arginina, y producen daño en las membranas celulares con formación de poros [22].

La diferenciación de los linfocitos Th2 son los que contribuyen al desarrollo de la inflamación de la vía aérea y debido a que estos linfocitos Th2, secretan citocinas como: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16, que son mediadoras del desarrollo de la reacción tardía, por la acción de síntesis de Ig-E y de la activación de los mastocitos y eosinófilos. Este evento se ha observado en lavados broncoalveolares y biopsias bronquiales de pacientes con asma, donde los niveles de expresión de la IL-4, IL-5 e IL-13 están aumentados en comparación con los controles sanos [21-25]. La acción de la IL-4 y la IL-13 es la diferenciación, proliferación y cambio de isotipo, hacia la síntesis de Ig-E de las células B [26, 27]. El papel de la IL-13 está relacionado con la producción aumentada de moco, eosinofilia y la hiperreactividad de las vías respiratorias [25].

De este modo un episodio de asma se resume así: en la fase temprana la interacción del alérgeno con la Ig-E ligada al mastocito, conduce a la liberación de mediadores inflamatorios que producen el broncoespasmo inicial (Obstrucción bronquial aguda) que ocurre al poco tiempo de la exposición al alérgeno específico. Las células dendríticas de la mucosa fagocitan estos alérgenos y los presentan a los linfocitos T en el contexto de moléculas HLA-2, con lo cual surgen clones de linfocitos TH<sub>2</sub> que producen IL-4 e IL-13, que posteriormente activan la proliferación de Ig-E por las células B. La estimulación de la IL-5, atrae y activa los eosinófilos de la médula ósea al sitio de la inflamación [1]. Estos eosinófilos que migran al bronquio, liberan proteínas catiónicas que producen daño epitelial e inflamación. La IL-13 y el GM-CSF liberados por las células colaboran en la amplificación y perpetuación de la inflamación crónica del asma. Por otro lado los factores que contribuyen a la metaplasia de las células caliciformes, incluyen la activación de receptores para el factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), cuya producción es inducida por la IL-4 e IL-13 durante el proceso de inflamación crónica mediada por células Th2. Las consecuencias de la inflamación durante las fases temprana y tardía de la respuesta asmática son la obstrucción del flujo de aire y la hiperreactividad, que darán lugar a la aparición de los síntomas característicos del asma. La compleja interacción que se produce entre las células inflamatorias, los mediadores y los componentes constitutivos de la mucosa respiratoria provoca una disfunción de la función pulmonar, tal como demuestran los descensos en el PEF y en el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1)[1].

### 2.2.2. Remodelamiento de la vía aérea

La reacción inflamatoria estimula la descarga de moco que afecta significativamente la estructura de la pared bronquial, los vasos sanguíneos y la membrana basal, si este daño es permanente ocasiona la *remodelación de la vía aérea* por medio del factor transformador de crecimiento (TGF  $\beta$ ) [26]. El proceso de remodelación de la vía aérea en el asma se lleva a cabo por medio de distintos mecanismos: 1. Cambios epiteliales, 2. Cambios en la membrana basal, 3. Cambios en unidades secretoras de moco (células



caliciformes y glándulas mucosas) ,4. Cambios en la musculatura lisa bronquial, 5. Cambios en la vasculatura bronquial [26, 28].

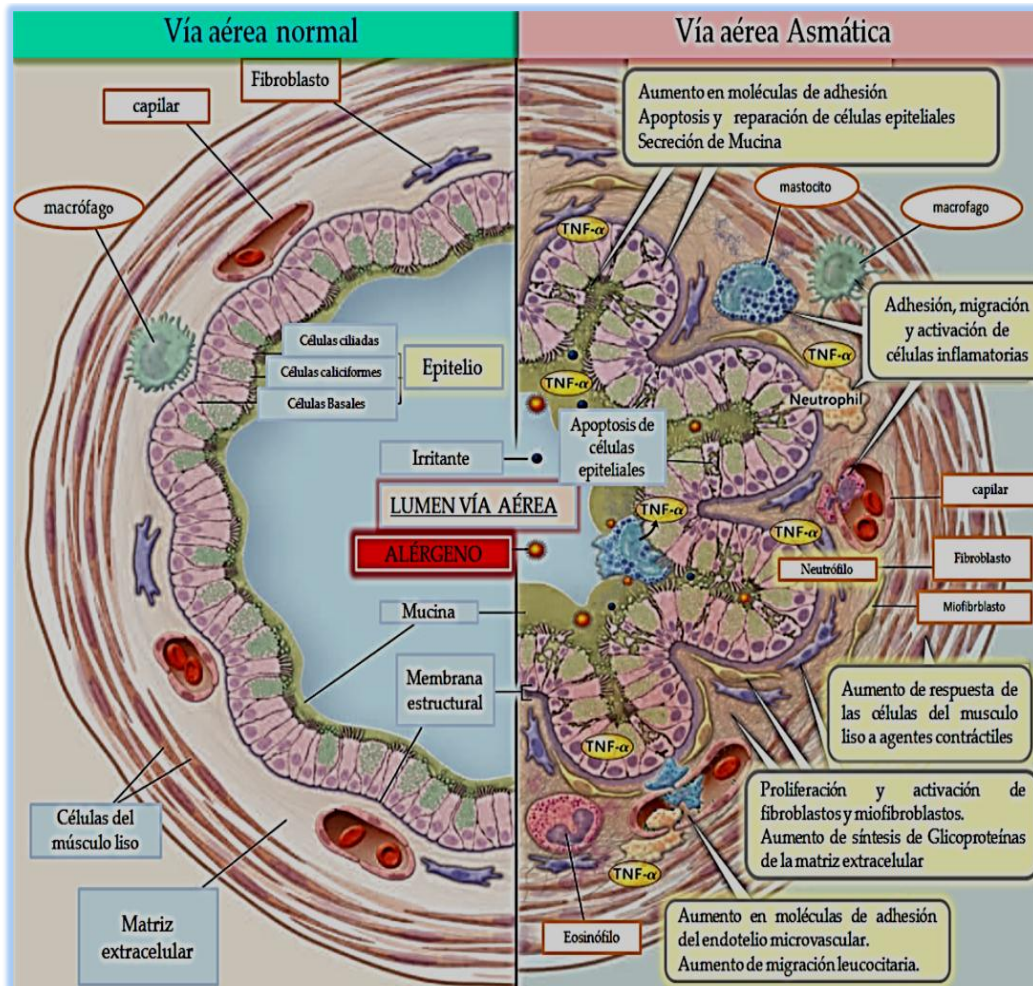


Figura 3 Fisiopatología del asma.

La contracción del músculo liso de la vía aérea como respuesta a los múltiples mediadores y a los neurotransmisores broncos constrictores es el mecanismo predominante del estrechamiento de la vía aérea que se revierte con los broncodilatadores. El edema de la vía aérea es debido al exudado microvascular en respuesta a mediadores inflamatorios. Esto puede ser particularmente importante durante las exacerbaciones agudas. El engrosamiento de las vías aéreas es debido a cambios estructurales descritos como remodelamiento [28]. (Imagen tomada de Erzurum et., 2006[28])

### 2.3. Epidemiología

Se estima que el asma afecta aproximadamente a 300 millones de individuos de todas las edades y grupos étnicos a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que al año se producen unas 250.000 muertes debidas al asma, lo que supone un 1% del total de muertes por enfermedad [1], en Colombia mueren 1,6 por 100.000 habitantes por crisis asmática[3]. El asma es frecuente en casi todos los países del mundo, pero su prevalencia no es igual en todos los países. La enfermedad es más frecuente en Europa

Occidental, Gran Bretaña y Norteamérica, donde casi el 10% del total de la población tiene asma. Además se ha observado que el asma es más común en zonas urbanas que en las rurales [89] el aumento de la prevalencia de asma a escala mundial ha ido aumentando, esto puede ser por una serie de factores ambientales, como la industrialización, la urbanización, la contaminación del aire y el consumo de cigarrillo. Los aumentos de la morbilidad, y la mortalidad en algunos países, también pueden atribuirse a barreras culturales y sociales como la pobreza, la falta de educación e infraestructuras [1]. Aunque el costo para controlar el asma desde la perspectiva del paciente y la sociedad es alto, el costo de no tratar el asma correctamente es más alto. Esta medida es necesaria para obtener y destinar los recursos que permitan disminuir el impacto negativo de la enfermedad [57].

En los últimos años, la prevalencia del asma en países de altos ingresos se ha estabilizado o disminuido; en países de bajos ingresos la enfermedad parece aumentar. En Colombia, 10.4% de la población sufre de asma; la enfermedad es mucho más frecuente en los niños (23.2% en el grupo de 1 a 4 años, 11.6% en el grupo 5 a 11 años y 10.3% en el grupo de 12 a 18 años) que en los adultos (7.5%). En Bogotá, la prevalencia general es de 9.4% con una distribución por edades similar a la del país. Cerca del 40% de estos niños ha tenido al menos una consulta a urgencias o una hospitalización al año [3, 57]. A diferencia de otros países el asma en nuestro país puede estar aumentando, se requieren análisis exploratorios adicionales para identificar variaciones en factores ambientales y socio demográficos que puedan explicar este aumento

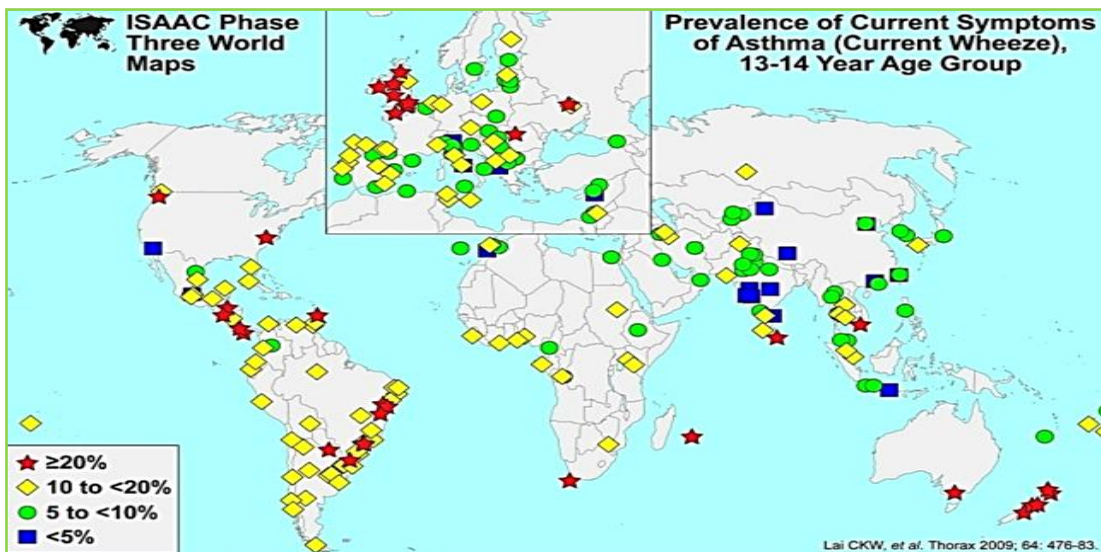


Figura 4 Prevalencia del asma en el mundo

Basándose en el uso de métodos estandarizados para medir la prevalencia del asma y enfermedad sibilante en niños y adultos, se estima que la prevalencia global del asma varía entre el 1% y el 20% de la población en diferentes países [57].

## 2.4. **Diagnóstico**

### 2.4.1. **Síntomas**

El asma bronquial se caracteriza por presentar episodios recurrentes de la limitación del flujo del aire, los cuales suelen ser reversibles espontáneamente o con tratamiento. Cuando las vías respiratorias se ponen en contacto con una serie de factores de riesgo como alérgenos (ácaros en el polvo, animales, cucarachas, polen y moho), irritantes ocupacionales o químicos, infecciones respiratorias virales, ejercicio, estados emocionales, irritantes químicos y medicamentos (tales como aspirina y beta bloqueadores) se pueden manifestar los síntomas de asma, acompañados de disnea, esputo algunas veces, sibilancias, opresión torácica y tos, particularmente en la noche o temprano en la mañana. Las exacerbaciones del asma incluyen ataques graves o empeoramiento de los síntomas que se pueden desarrollar gradualmente o rápidamente causando la muerte en ausencia de un tratamiento adecuado. La limitación del flujo del aire es el resultado de la bronco constricción aguda, inflamación; formación crónica de moco y la remodelación de la pared de las vías respiratoria [20]. La variabilidad estacional de los síntomas y los antecedentes familiares positivos del asma y de una enfermedad atópica son también guías de diagnóstico.

### 2.4.2. **La Espirometría**

Método recomendado para medir la limitación al flujo de aire y reversibilidad para establecer el diagnóstico del asma. La medición del volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) y de la capacidad vital forzada (FVC), al igual que el pico flujo durante la espiración (PFE), se realiza durante una maniobra espiratoria usando un espirómetro. Los valores predichos de FEV1, FVC y PEF se basan en la edad, género, y talla, han sido obtenidos de estudios poblacionales, y son continuamente revisados, siendo de gran ayuda para determinar si un valor es válido o no, excepto el PEF, cuyos valores predichos tienen un rango muy amplio. Los términos de variabilidad y reversibilidad se refieren a cambios en los síntomas acompañados de cambios en la limitación del flujo de aire que ocurre espontáneamente o en respuesta al tratamiento. El término reversibilidad es generalmente aplicado a las mejoras en FEV1 (o PEF), medido en los minutos después de la inhalación de un broncodilatador de rápida acción por ejemplo después de 200-400 microgramos de salbutamol (albuterol), o una mejora sostenida días o semanas después de la introducción de un tratamiento controlador efectivo como los glucocorticosteroides inhalados [1].

## 2.5. **Terapia del Asma**

El objetivo del tratamiento del asma consiste en lograr y mantener el control clínico. La terapia empleada en el asma, incluye los fármacos controladores (tratamiento de mantenimiento), aliviadores o de rescate (sintomáticos). Los controladores o preventivos son medicamentos tomados diariamente por un período prolongado de tiempo para mantener el asma bajo control clínico a través de sus efectos antiinflamatorios. Estos incluyen glucocorticosteroides inhalados o sistémicos, los modificadores de leucotrienos, los  $\beta$ 2-agonistas inhalados de acción prolongada en combinación con glucocorticosteroides inhalados, teofilina de acción prolongada, cromonas, anti-IgE, y otras terapias de esteroides sistémicos [1].

### 2.5.1. **Medicamentos de alivio o rescate**

### 2.5.2. **Agonista $\beta_2$ adrenérgicos de Acción prolongada inhalados: (formoterol y salmeterol).**

Los agonistas  $\beta_2$  no deben ser utilizados como monoterapia en el asma dado que estos medicamentos no parecen influir en la inflamación de las vías aéreas, estos agonistas son más eficaces cuando están combinadas con los glucocorticosteroides inhalados. Los agonistas  $\beta_2$  tienen la función de relajar las vías respiratorias del músculo liso bronquial, también mejoran la depuración mucociliar, disminuyen la permeabilidad vascular y pueden modular la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos. El salmeterol y el formoterol, proporcionan protección a largo plazo frente a estímulos broncoconstrictores [1].

### 2.5.3. **Los $\beta_2$ -agonistas de acción rápida**

Son los medicamentos de elección para el alivio del broncoespasmo durante las exacerbaciones agudas del asma y para el tratamiento previo del asma inducida por el ejercicio. Se incluyen el salbutamol (albuterol), la terbutalina, el fenoterol, el reproterol, y el pirbuterol.

### 2.5.4. **Antimuscarínicos (Bromuro de Ipratropium)**

Agentes anticolinérgicos bloquean los receptores muscarínicos en el músculo liso bronquial, bloqueando el reflejo colinérgico broncoconstrictor y produciendo así broncodilatación. En las vías aéreas predominan los receptores muscarínicos M3 [29]. Los fármacos anticolinérgicos bloquean de forma competitiva el efecto de señalización de la acetilcolina sobre los receptores muscarínicos acoplados a la proteína G $\alpha_q$ , que tienen una predominante distribución en la musculatura lisa del árbol bronquial, en este sentido la eficacia broncodilatadora va a depender del grado de control del efecto colinérgico. La mayoría de antagonistas de los receptores G $\alpha_q$ , son mínimamente eficaces como monoterapia, debido a que el tratamiento enfocado solo a una de las muchas vías de señalización contráctil, puede hacer que falle la buena respuesta a la terapia. En este hecho se toma en cuenta porque el estado contráctil bronquial representa la acción colectiva de múltiples agonistas contráctiles [29]. Los Antagonistas CysLT1R, no son un tratamiento de rescate, ya que su inicio de acción no es rápido. Además son prescritos como complemento o cuando la terapia con beta-agonistas es complicada (por ejemplo, complicaciones cardiovasculares) [29].



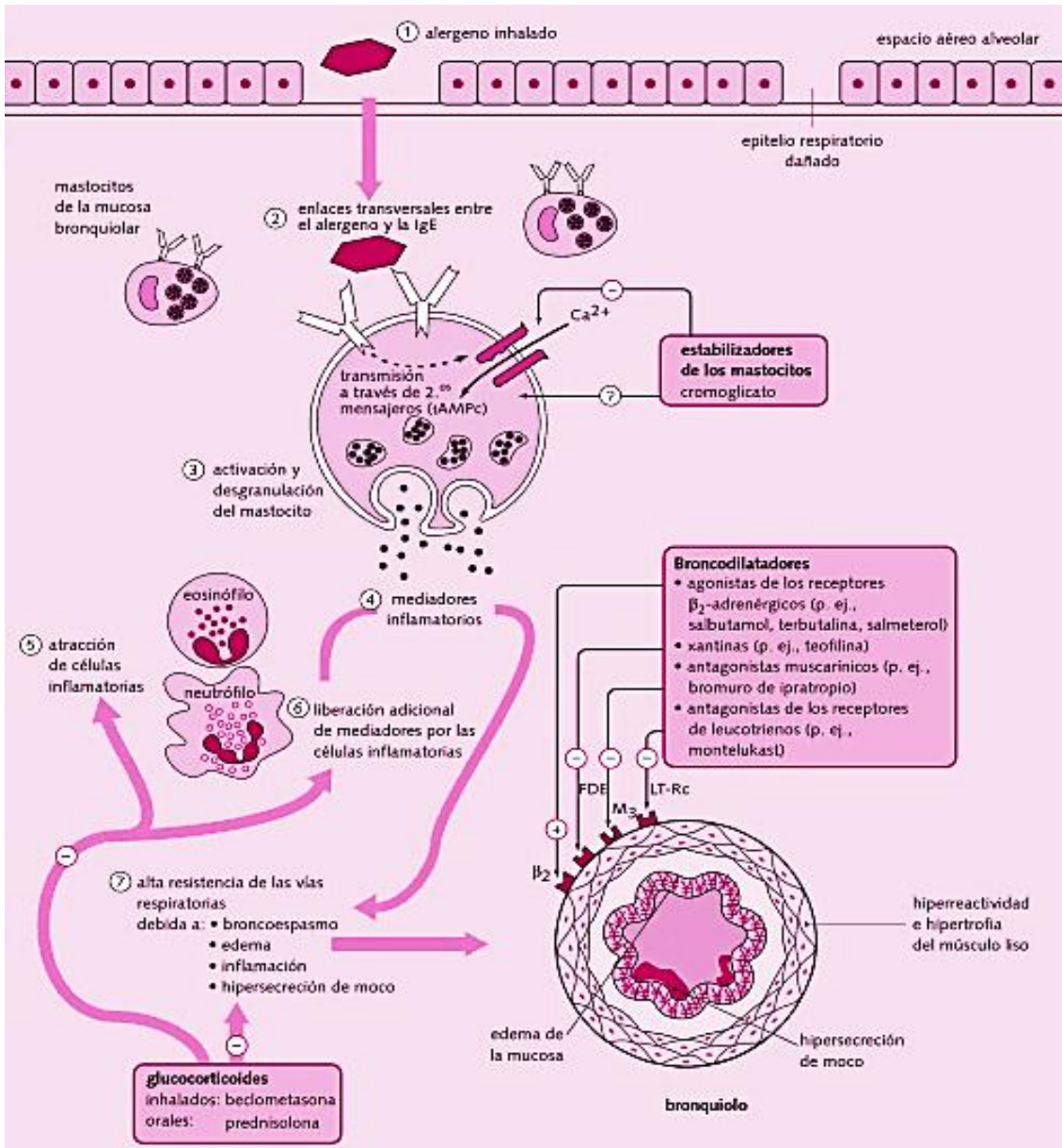


Figura 5 Patogenia y acción de los fármacos en el asma (FDE, fosfodiesterasa;LT-Rc, receptor de leucotrienos..

Los alérgenos interactúan con la mucosa respiratoria (1) y desencadenan una respuesta de los mastocitos mediada por la IgE (2). La activación de los mastocitos provoca su desgranulación (3) con liberación de diversos mediadores pro inflamatorios (4) que atraen más células relacionadas con la inflamación (5) estas células también segregan mediadores, con la consiguiente amplificación de la respuesta inflamatoria (6) El efecto global es el estrechamiento de las vías aéreas (7) por el broncoespasmo, edema y el aumento de las secreciones [90].

## 2.6. Receptores de broncoconstrictores

En un individuo normal, el tono y la permeabilidad de las vías aéreas son el resultado del equilibrio entre las fuerzas bronco relajantes inducidas por estímulos  $\beta$ -adrenérgicos y las tendencias bronco constrictoras causadas por impulsos vágales y mediadores inflamatorios como la acetilcolina (ACh), la histamina, los cysteinil-leucotrienos,

tromboxano, neuropéptidos entre otros. Todos estos mediadores son capaces de activar los receptores de membrana acoplados a proteínas Gαq, poniendo en marcha la acción de la maquinaria contráctil pero esto se contrarresta con la vía que conduce a la relajación, la que implica los β<sub>2</sub>-adrenoreceptores que están acoplados a la proteína Gαs a través del sistema AMPc-Adenil ciclasa (AC) [29].

Los GPCRs son la diana terapéutica de la mayoría de los medicamentos comercializados en la actualidad para el manejo del asma. En individuos asmáticos la inflamación de la vía aérea genera la fase "aguda" y la fase "tardía". En la fase aguda, los antígenos por medio de la activación de los mastocitos en las vías respiratorias, provocan la liberación de numerosos mediadores/agonistas como la histamina H<sub>1</sub>, en donde su activación está mediada por los receptores H<sub>1</sub>; los leucotrienos B<sub>4</sub>/C<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> que actúan a través un receptor común, el cisteinil-leucotrienos 1 (CysLT1); el Factor activador de plaquetas, las prostaglandinas PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>α y los tromboxanos que actúan a través del receptor TP<sub>1</sub>, que están acoplados a la proteína Gαq. Del mismo modo en la fase tardía, después de la exposición al antígeno, hay una afluencia significativa de eosinófilos y una amplia liberación de mediadores inflamatorios que de nuevo incluyen numerosos agonistas que se van a unir a receptores acoplados a Gαq, entre ellos los más prominentes son los leucotrienos.

El sistema nervioso parasimpático es el principal bronco constrictor neuronal de las vías respiratorias. Los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> están presentes en los nervios pos ganglionares y controlan la liberación de neurotransmisores; los receptores M<sub>3</sub> se encuentran principalmente en el músculo liso bronquial y son mediadores de la bronco constricción debido a que se acoplan a un estimulador como la proteína Gαq, que cuando se activa genera un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la actividad del aparato contráctil. El receptor M<sub>2</sub> se encuentra acoplado a través de una proteína Gαi para inhibir la adenil ciclasa (AC) lo que podrá generar un efecto de bronco constricción [30, 31].

La regulación del estado contráctil del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) es sin duda la característica más importante del asma, pero también se toma en cuenta la remodelación tisular de la vía aérea, en la cual el aumento de la masa celular contribuye a la enfermedad. Demostrando de esta manera que las combinaciones de factores de crecimiento polipeptídicos y agonistas GPCR pueden combinarse para aumentar el sinergismo y la proliferación de células del MLVA. Numerosos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento transformante-β, pueden promover la proliferación del MLVA en cultivo. Otros agonistas GPCRs, como la trombina, el ácido lisofosfatídico (LPA), la esfingosina 1 fosfato (S1P), son fuertes mitógenos in vitro. Además agonistas como el tromboxano, la metacolina, los CysLTs, histamina, endotelina, y 5-HT, son por sí mismos agonistas débiles, pero tienen la capacidad de aumentar el efecto mitogénico de los factores de crecimiento polipeptídicos [32].

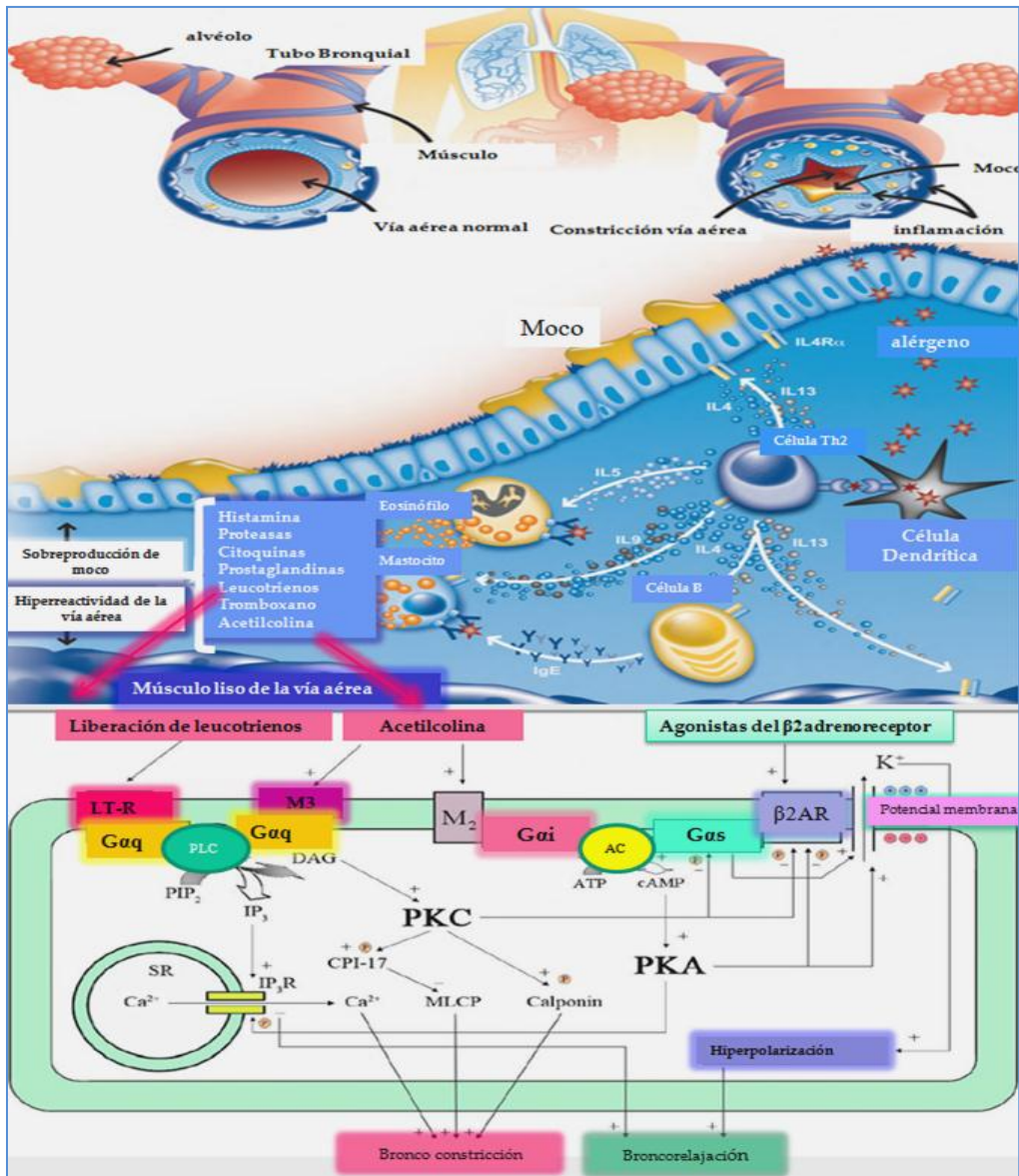


Figura 6. Esquema de los mecanismos de la bronco relajación y bronco constricción del músculo liso aéreo.

Los receptores M<sub>3</sub> se encuentran en el músculo liso bronquial y son mediadores de la broncoconstricción debido a que se acoplan a un estimulador como la proteína Gαq, que cuando se activa genera un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la actividad del aparato contráctil. Los receptores M<sub>2</sub> se encuentran acoplados a una proteína Gαi para inhibir la adenil ciclasa(AC), generando un efecto de broncoconstricción.(48,49) La bronco constricción es el efecto de la unión de los agonistas o mediadores inflamatorios a los receptores acoplados a la proteína Gαq, que genera la activación de la fosfolipasa C (vía PLCβ), que a partir de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato genera IP3 y diacilglicerol (DG), el IP3 se une a su receptor situado en el retículo sarcoplásmico y provoca la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde ese depósito [33]. (Imagen tomada de Holgate 2010 [33])

## 2.7. Receptores de broncodilatadores.

Las vías aéreas están inervadas por el sistema simpático y parasimpático, lo cual implica la activación de receptores β-adrenérgicos y muscarínicos respectivamente. Ambos receptores, están acoplados a proteínas G y tienen muchas similitudes en sus

mecanismos de acción. Por ejemplo, los receptores muscarínicos tipo 2 están unidos a proteínas G inhibitoras (Gi/o) y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están ligados a proteínas G estimuladoras (Gs).

Cuando un  $\beta$ -agonista ocupa su sitio de reconocimiento acoplado a una proteína G $\alpha$ s, inicia un proceso que termina en la activación de la adenilciclase, enzima que estimula la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) y la consiguiente activación de la proteína-quinasa AMPc-dependiente (proteín-quinasa A, PKA), la cual se encargará de fosforilar otras proteínas intracelulares, unas de naturaleza enzimática y otras de naturaleza estructural. La PKA puede fosforilar receptores acoplados a proteínas G $\alpha$ q que previenen y revierten los efectos de todas las sustancias bronco constrictoras, incluyendo el leucotrieno D<sub>4</sub>, la acetilcolina, la bradicinina, las prostaglandinas, la histamina y las endotelinas y a la Fosfolipasa C (PLC), y de esta manera inhibir la generación de IP<sub>3</sub> y el flujo de calcio. La fosforilación por la PKA, se realiza en proteínas que regulan el movimiento de Ca<sup>2+</sup>, tanto a través de la membrana celular como entre los diversos compartimientos intracelulares, afectando un rango de funciones celulares en las vías aéreas, incluida la relajación del músculo liso.

En resumen los efectos de la activación de PKA, se da por medio de las respuestas fisiológicas a los fármacos agonistas- $\beta$ , fosforilando y cambiando la actividad de los substratos clave (como enzimas y sistemas de transporte de iones) implicados en la inflamación y en la regulación del tono contráctil del músculo liso, de lo que resultan las correspondientes acciones anti-inflamatorias y broncodilatadoras y estas acciones se realizan a través de la modulación de la expresión génica de la activación del elemento de respuesta a AMPc (CREB).

Varios agentes endógenos actúan como broncodilatadores, ya sea mediante la activación de los receptores de broncodilatación o por la liberación endógena de óxido nítrico (NO), PGE<sub>2</sub> y VP [97]. En el caso de la prostaglandina PGE<sub>2</sub>, esta puede actuar como un importante regulador del tono del músculo liso bronquial, a través de los receptores EP. La activación de dichos receptores por la PGE<sub>2</sub> incrementa los niveles de AMPc mediante la activación de la adenil- ciclase acoplada a G $\alpha$ s, causando una reducción en la concentración de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la relajación del músculo liso [36].



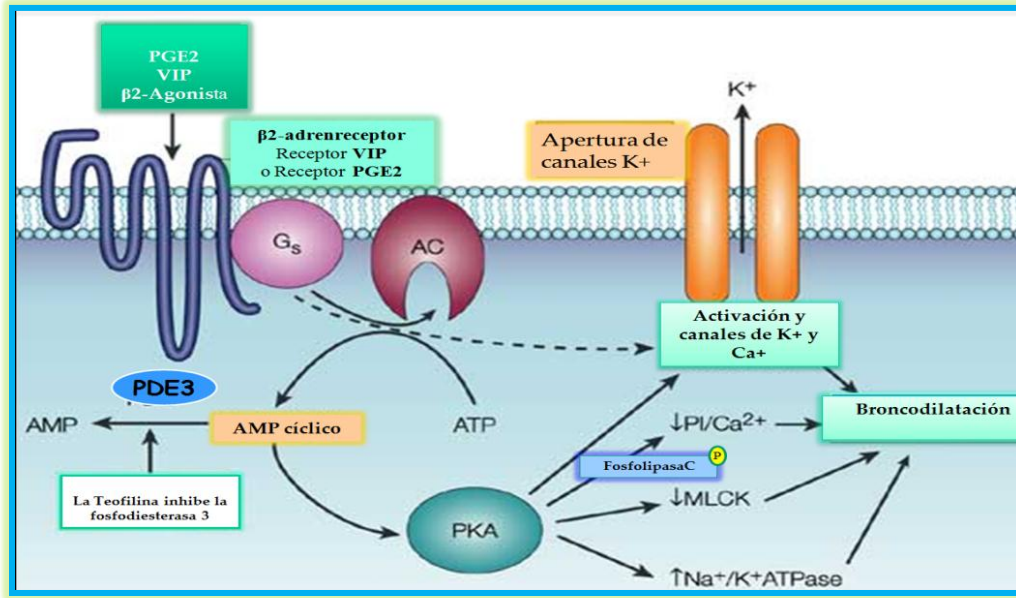


Figura 7. Esquema de las funciones del  $\beta_2$ -adrenoreceptor

La unión al receptor  $ADR\beta_2$  de las catecolaminas endógenas, así como de las drogas  $\beta_2$ -agonistas da inicio al acoplamiento entre la proteína receptora y la proteína G estimuladora (Gs). Esto activa la adenil ciclasa, causando posteriormente un incremento en la concentración de adenosin monofosfato cíclico intracelular (AMPc). La activación del AMPc permite la actividad de la protein quinasa A (PKA), que participa en la relajación del músculo liso [37].

## 2.8. Polimorfismos en el gen $ADR\beta_2$

El gen que codifica para el  $\beta_2$ -adrenoreceptor, gen  $ADR\beta_2$ , ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31- 33), carece de intrones y consta de un bloque codificante de 5.2 KB.

Hay dos alelos para el  $\beta_2$ -adrenoreceptor, con lo cual un individuo puede ser homocigoto o heterocigoto para un polimorfismo dado. Se han identificado aproximadamente, más de 20 polimorfismos en el gen  $ADR\beta_2$ , nueve en la región codificante y 10 en la región promotora 5', sin embargo, cuatro resultan en cambios de la secuencia de aminoácidos en el receptor. Tres de estos polimorfismos parecen afectar las propiedades funcionales del receptor de los individuos con estos polimorfismos llevando a un comportamiento diferente de la vía aérea cuando se exponen a catecolaminas exógenas [7].

En la especie humana, la actividad reguladora transcripcional principal del gen  $ADR\beta_2$  se encuentra cerca al codón de inicio 5'. Esta región también contiene la secuencia de codificación de una proteína de 19 aminoácidos conocida como Péptido Beta Upstream (BUP) que se piensa influye en la expresión del gen del  $\beta_2$ -adrenoreceptor a nivel translocacional. El último residuo de este oligopéptido es polimórfico (Arg19Cys), generando una menor expresión basal del  $ADR\beta_2$  *in vitro* [38].

En la región codificante, los dos polimorfismos que ocurren con alta frecuencia alélica en la población en general son sustituciones de nucleótidos individuales en las posiciones 46 ( $ADR\beta_2+46G-A$ ) y 79 ( $ADR\beta_2+79C-G$ ), correspondientes a las sustituciones de Arginina

por Glicina en la posición del aminoácido 16 y glutamina por glutamato en la posición del aminoácido 27. Las frecuencias de los alelos para el Arg16Gly y Gln27Glu varían según el grupo étnico [38, 39]. Las frecuencias alélicas reportadas para Arg16 en caucásicos, afroamericanos y las poblaciones de Asia son de 0,39, 0,50 y 0,40, respectivamente; mientras que para Gln27 son de 0.57, 0.73 y 0.80. El SNP Thr164Ile es raro y la frecuencia en heterocigotos es entre el 3 y el 5% en toda la población. Las frecuencias alélicas de los polimorfismos funcionales del  $\beta$ 2-adrenoceptor se encuentran similares en los asmáticos y no asmáticos [38], por lo que no determinan el desarrollo de la enfermedad, pero sí podrían modificar las manifestaciones clínicas de esta [40]. Con respecto a las frecuencias de los polimorfismos del gen, estas observaciones han motivado a su estudio en diferentes poblaciones, encontrando contradicciones en los hallazgos con respecto a la relación de los polimorfismos y la severidad de la enfermedad. En algunos reportes el polimorfismo Gly en la posición 16 se ha asociado a una mayor severidad de la enfermedad, sin embargo, en otros estudios la asociación no ha sido relevante. De la misma manera, esta variación se ha correlacionado con una mayor frecuencia en casos de asma nocturna y con hiperreactividad bronquial [34].

Recientemente, un análisis completo del gen ADR $\beta$ 2 identificó otras variantes genéticas dentro de una región del gen de 5,2 kb. Un total de 49 polimorfismos fueron identificados, 21 de ellos fueron nuevos. El análisis también mostró que la región 3'-UTR contiene una longitud variable de repeticiones poli-C (11, 12, 13 o muy rara vez 14C), que son interrumpidas por polimorfismos en dos posiciones diferentes, dando lugar a una variación genética adicional. La importancia de estos nuevos SNPs en la determinación de los fenotipos del asma y la respuesta terapéutica a los agonistas del  $\beta$ 2- adrenoceptor se desconoce [7].

Dentro del contexto genético hay un alto desequilibrio de ligamiento en el gen ADR $\beta$ 2, como resultado de esto, los individuos homocigotos para Arg16 casi siempre son homocigotos para Gln27. El haplotipo Arg16/Glu27 es poco frecuente, ocurriendo en el 1% de la población caucásica. Además, los individuos homocigotos para Arg16 y Gln27 casi siempre son homocigotos para el alelo Cys19 del polimorfismo BUP Cys19Arg. Como consecuencia del fuerte desequilibrio de ligamiento, los polimorfismos de la región promotora y las regiones codificantes del gen ADR $\beta$ 2 fueron organizadas por Drysdale y cols, en 12 haplotipos, que son expresados diferencialmente entre los grupos étnicos [41].

De hecho, los estudios que han utilizado haplotipos han demostrado un poder más fuerte en definir fenotipos clínicos y moleculares [42], así como en el riesgo de una enfermedad, comparados con análisis de SNP, aunque estos últimos en algunas ocasiones puedan ofrecer ventajas estadísticas. Estas interacciones también pueden ocurrir entre variantes que están localizadas en distintos genes (epistaxis). Es decir, un alelo en un locus puede tener efectos opuestos en el fenotipo que se está estudiando dependiendo de cual alelo está presente en el otro locus [43]. Por lo tanto, en el caso de las interacciones epistáticas, los efectos genéticos principales podrían perderse completamente o ser interpretados de forma errónea si los efectos de un locus se consideran por separado de los efectos que ocurren en el otro. Esto quiere decir que sólo los portadores de los genotipos de riesgo en ambos genes (no portadores del genotipo de riesgo en un solo gen) tendrían un riesgo incrementado de asma en comparación con los portadores del genotipo de no-riesgo [19].

La transcripción y posterior traducción del gen  $ADR\beta 2$  genera una proteína de 413 aminoácidos cuya estructura terciaria está organizada en siete dominios transmembrana, que es la típica disposición de la familia de proteínas GPCR, los cuales son caracterizados por tener siete dominios transmembranales, cuya estructura corresponde a hélices alfa. Su dominio extracelular corresponde al extremo amino terminal y el dominio intracelular corresponde al extremo carboxilo terminal [34, 35].

La expresión de este receptor se da en el músculo liso de la vía respiratoria, en las células endoteliales y epiteliales del pulmón, células tipo II y mastocitos, funcionando como un aceptor de agonistas que permiten la broncodilatación del pulmón.

Las peculiaridades esenciales de este receptor en su funcionamiento son:

1. La doble glicosilación de su extremo amino terminal, que interviene en la orientación y movilidad del receptor.
2. La recepción de los agonistas en un espacio interno de alrededor de  $11\text{\AA}$ , formado entre las porciones hidrofóbicas de las hélices transmembrana  $3^a$  a  $6^a$ .
3. Actúan a través de proteínas reguladoras y enzimas intracelulares, los receptores  $\beta 2$ , se unen a la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gas por medio de las asas intracelulares  $2^a$  y  $3^a$ .

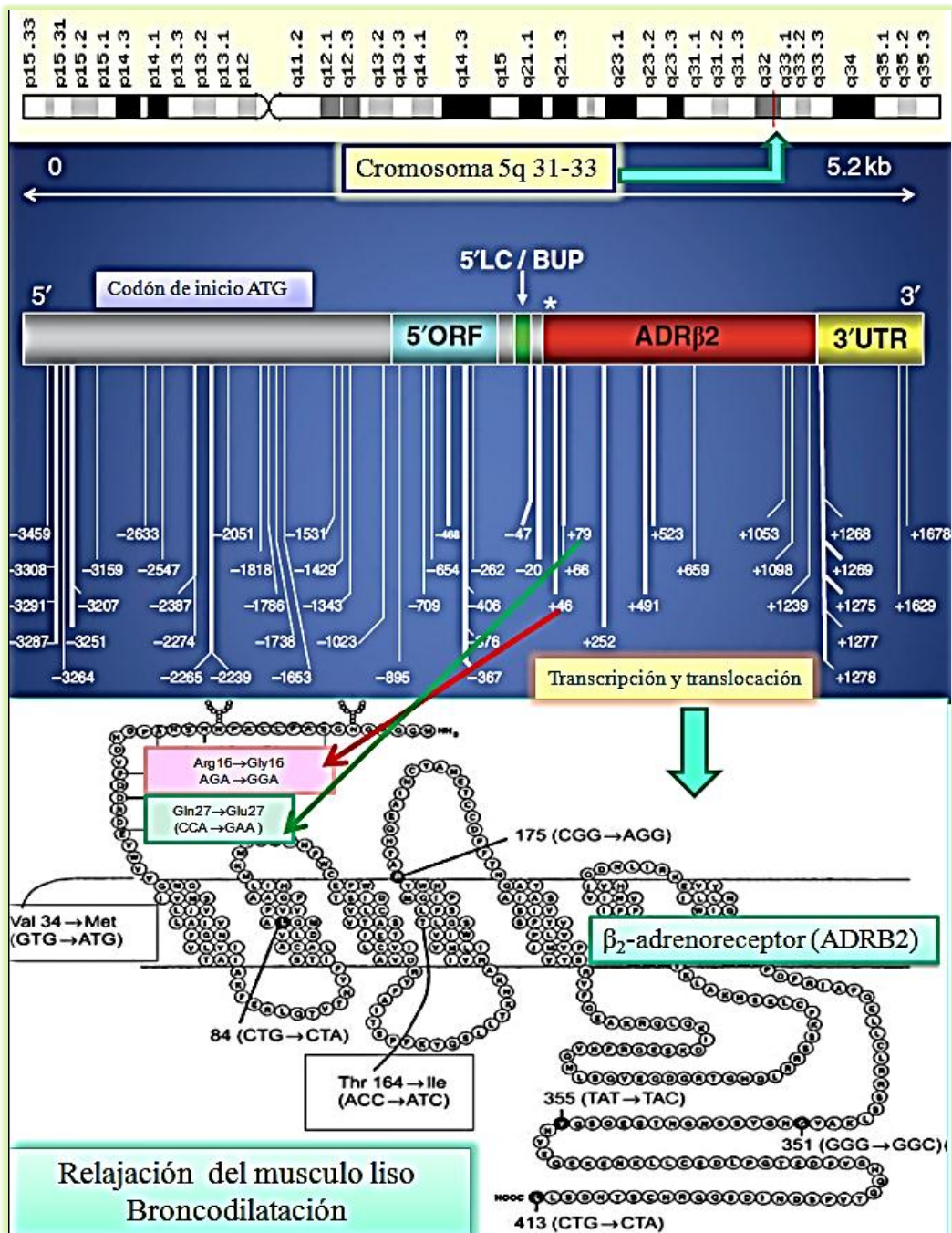


Figura 8 Gen ADR $\beta$ 2

El gen que codifica para el receptor  $\beta_2$ -adrenergico ADRB2, ha sido ampliamente estudiado en el asma por diferentes razones. Primero, está localizado en la región cromosómica del brazo largo del cromosoma 5 (5q31-33) que está repetidamente ligada con el asma. Segundo, sus dos polimorfismos mejor caracterizados son mutaciones missense en el codón 16 y 27 (Arg16Gly y Gln27Glu), que son funcionalmente muy importantes porque se encuentran en la parte extracelular de la membrana. Tercero, la expresión del receptor se encuentra en varias clases de células del pulmón, incluidas las células del musculo liso bronquial que juegan un papel importante en el control del tono bronquial y en la respuesta a los medicamentos broncodilatadores [44]. (Imagen tomada de Hawkins *et al.*, 2006)

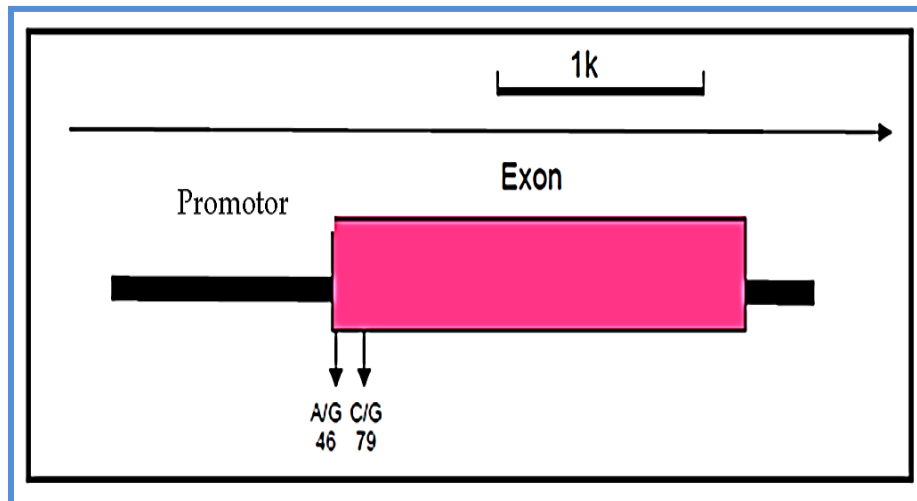


Figura 9 . Posiciones relativas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu.

En el polimorfismo del nucleótido 46 se encuentra un cambio de adenina por guanina (A por G), que produce la sustitución de una arginina por una glicina en el aminoácido 16 (Arg16Gly) y la variante en el nucleótido 79, que da un cambio de citosina por guanina (C por G), a nivel del aminoácido en la posición 27, produce un cambio de glutamina por ácido glutámico (Gln27Glu) [7].

### 2.8.1. Relación entre los polimorfismos del gen ADRβ2 y asma

Reihsaus *et al.*, [7]. Describieron en 1993 por primera vez los polimorfismos más frecuentes del ADRβ2 en humanos. En Estados Unidos un estudio de casos y controles, con un total de 107 sujetos, caracterizaron 9 polimorfismos, de los cuales cuatro producían cambios en la secuencia de aminoácidos. De éstos, dos fueron muy frecuentes en la población: el cambio de una Arginina en la posición 16 por una Glicina (Arg16Gly) y el de la Glutamina en la posición 27 por el Acido Glutámico (Gln27Glu). Las frecuencias alélicas (FA) que ellos encontraron fueron para los homocigotos Gly16 de 0,53 y para los homocigotos Glu27 de 0,2 y con la frecuencias del haplotipo Gly16/Glu27 de 0,24.

En el mismo estudio, Reihsaus *et al.*, [7] fueron quienes primero estudiaron la relación entre los polimorfismos más frecuentes y el asma. Tanto en los casos como en los controles la frecuencia del polimorfismo Gly16 y Glu27 fue igual. Así mismo no encontraron asociación entre polimorfismos con edad, sexo, asma inducida por ejercicio, número de visitas a emergencia y número de hospitalizaciones. Sin embargo, describieron una asociación entre aquellos pacientes que usaban corticosteroides y el polimorfismo Gly16, pues el 75% de estos sujetos eran homocigotos para el marcador. Este estudio, como se menciona anteriormente fue realizado en caucásicos. En este estudio, la estratificación por severidad del asma, no es clara.

Otro estudio realizado en población turca (n=104) [46], no relacionada, sin ningún tipo aparente de patología respiratoria, encontró una FA para Gly16 de 0,596 y para Glu27 0,317. Ningún sujeto fue homocigoto para el haplotipo Gly16/Glu27.

Otros estudios realizados en diversas poblaciones concuerdan en algunos casos, y en otros arrojan resultados distintos.

Un estudio posterior realizado en Canadá [47] con sujetos asmáticos y no asmáticos en un diseño de casos y controles, con población caucásica (n=315 casos, 84 controles), afroamericana (62 controles) y asiática (16 casos), de los cuales solo se usaron los datos de la población caucásica para el análisis. La FA para Gly16 fue de 0,61 (similar al estudio previo) y para Gln27 de 0,57. Los asiáticos tenían una menor FA para Gly16 (0,40) y Gln27 fue mayor en los negros (0,73). En cuanto a la asociación con asma, para el primer polimorfismo, no se encontró ninguna asociación (en caucásicos), mientras que para el segundo, se observó una frecuencia de asociación del 67% en asmáticos moderados y del 48% en asmáticos leves. Así mismo, para los individuos el haber tenido el haplotipo Gly16/Gln27 confirió un Odds Ratio (OR) de 3,1 en los asmáticos moderados. Los autores concluyeron que no había diferencias entre asmáticos fatales y casi fatales con asmáticos no fatales y no asmáticos, pero sí con asmáticos moderados. Por otro lado mostraron que no hubo diferencias entre asiáticos y negros en cuanto a FA, pero sí con caucásicos.

Entre tanto, Hopes *et al.*, [48] realizaron un estudio poblacional en un hospital de Nottingham, Inglaterra, en el cual incluyeron a niños que ingresaban por el servicio de urgencias. De un total de 419 sujetos, 104 se consideraron como casos y 315 como controles. Este trabajo reportó las siguientes FA: Gly16 0,66 y Glu27 0,48. La población se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg y el polimorfismo Gln27 se asoció con un incremento de riesgo en los asmáticos reportados (OR 2,18; intervalo de confianza 1,13-4,23).

Otro estudio [49] que buscó estas asociaciones se realizó en Caucásicos de Nueva Zelanda (n=246), donde se encontraron diferencias significativas para las FA del polimorfismo Gly16: 0,7 en Asma severa, 0,59 en Asma leve y 0,60 en Controles. Más aún 54% de los asmáticos severos, 46% asmáticos leves y 38% de los controles fueron homocigotos para el polimorfismo. La FA de Glu27 no fue diferente entre los casos y controles, ni entre los distintos grupos de asmáticos.

El estudio realizado por Shachor y cols. [50] en población israelí incluyó judíos ashkenazim, sefaradim y árabes, de los cuales 66 fueron casos y 113 controles, emparejados por etnia y estratificados según el tipo de marcador de asma severa. Encontraron que no había diferencia entre asmáticos y sus controles en ninguno de los grupos étnicos. La FA de Gly16 fue igual que en caucásicos, pero la FA de Glu27 sí fue distinta a los caucásicos, siendo similar a la de los turcos 0,3.

En la población latina, el trabajo de Santillán y cols. [51], realizado en la ciudad de Monterrey, México, incluyó a 907 mestizos mexicanos sin vínculo familiar. 303 pacientes de consulta externa se consideraron como casos y 660 personas de las listas del Instituto de Seguros Sociales de México fueron los controles. Encontraron que la población estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos polimorfismos, con una FA de 0,57 para Gly16 y 0,2 para Glu27. El primer polimorfismo no se asoció con el diagnóstico de asma, pero sí con el fenotipo de asma nocturna (OR 1,8; intervalo de confianza 1,3-2,6). La frecuencia del segundo polimorfismo fue diferente en comparación con la población caucásica y se asoció con una disminución del riesgo de tener diagnóstico de asma (OR 0,5; intervalo de confianza 0,4-0,7). En cuanto a los haplotipos, el más común en esta población fue Arg16Gly/Gln27 (0,43 en casos y 0,33 en controles). Más aun, los haplotipos Arg16/Gln27 y Arg16/Gln27Glu confirmaron un OR de 2,9 (intervalo de confianza 1,2-6,8) en hombres asmáticos al estratificar por sexo. Sin embargo, este estudio presenta importantes diferencias en las características demográficas de base



entre el grupo de casos y controles, incluyendo el índice de masa corporal, el cual es un factor de confusión relacionado con alteraciones del adrenoceptor beta.

Otro estudio [52], usó variables como punto final que se pueden considerar como marcadores de asma severa (i.e asma nocturna) en un diseño de casos y controles con n=45 en adultos de Estados Unidos sobre los cuales no se especificó su origen étnico. Los investigadores encontraron una FA en Gly16 de 0,804 en asmáticos nocturnos, lo cual se traduce en un OR de 3,8. Más aún, 88,9% de los asmáticos nocturnos fueron homocigotos para Gly16. En cuanto a Gln27 no se encontraron diferencias. El haplotipo Gly16/Glu27 se encontró en 30,4% de los asmáticos nocturnos vs. 18,2% de los no nocturnos, pero no alcanzó significación estadística.

Migita *et al.*, llevaron a cabo un meta-análisis [53] con los resultados de la mayoría de los estudios revisados para los polimorfismos del ADR $\beta$ 2, encontraron que la FA de Gly16 en promedio era de 0,47 y la de Gln27 0,95. Este meta-análisis mostró que el OR para Gly16 según el modelo de efectos fijos fue de 1,06 (intervalo de confianza 0,95-1,18) y usando el modelo de efectos aleatorios fue de 1,05 (intervalo de confianza 0,9-1,22). El OR para Gln27 con el modelo de efectos fijos fue de 1,17 (intervalo de confianza 1,03-1,34) y con el modelo de efectos aleatorios fue de 1,12 (intervalo de confianza 0,94-1,34). Esto para una muestra conjunta de 1290 casos y 1848 controles. Es interesante anotar que el OR para Gln27 bajo el modelo de efectos fijos pierde la significación estadística al excluir el estudio de Santillan y cols. [51] del análisis. Concluyeron que los polimorfismos de ADRB2 y sus haplotipos no se asocian con el asma. Sin embargo, una limitante de este estudio es el reducido número de trabajos incluidos en el meta-análisis así como la heterogeneidad conferida por un solo estudio [51] que al ser analizado separadamente altera los resultados.

En un meta-análisis de Contopoulos *et al.*, [54]. de estudios de cohortes y de casos y controles, tenía como objetivo la integración cuantitativa de la evidencia disponible en la asociación de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu con el asma, asma nocturna, asma severa e hiperreactividad bronquial. Los análisis primarios compararon sujetos con asma contra los que no la tenían, sujetos con formas moderadas o severas de asma contra los que tenían formas más leves y sujetos con hiperreactividad bronquial contra los que no contaban con esta última. Se examinó primordialmente el contraste de alelos (Gly16 vs. Arg16 y Glu27 vs. Gln27) para detectar diferencias en general. Se eligieron 28 estudios que proporcionaron información en la asociación entre polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu y la susceptibilidad para asma, hiperreactividad bronquial, asma nocturna y formas de asma moderada y severa. Este estudio incluyó 19 estudios en poblaciones de descendencia caucásica y 9 en poblaciones de descendencia asiática, 11 estudios caso control, 9 cohortes de población y 8 cohortes de asma. El asma fue definida con diferentes criterios (diagnósticos médicos, auto-reportes o ambos) que no fueron siempre especificados en detalle. Los casos de asma nocturna fueron definidos basados en la declinación nocturna de las tasas de pico flujo respiratorio en dos estudios y criterios clínicos en otros tres. La definición para asma moderada a severa también tuvo variaciones en los estudios de Contopoulos y cols [54]. En este estudio la frecuencia general del alelo Gly16 en sujetos sin asma fue 54.8% (IC 95%, 50.9% a 58.7%) y esto fue ligeramente más frecuente en descendientes caucásicos que en poblaciones de descendencia asiática (60.7% vs 46%). El alelo Glu27 tuvo menos de la mitad de frecuencia que el alelo Gly16 (24.7%; IC 95%, 17.9% a 32.9%), y fue casi 3 veces más frecuente en poblaciones de descendientes caucásicos que en asiáticos (36.1% vs. 13.6%). En el análisis de alelos; en general no existió relación entre el alelo Gly16 y asma.

Sin embargo, hubo una heterogeneidad límite entre los estudios en este análisis. Los resultados fueron altamente consistentes en estudios de sujetos de descendencia caucásica y asiática. Por el contrario, un riesgo incrementado para la susceptibilidad de asma fue demostrado (OR, 1.19; P=0.025) en los siete estudios con grandes proporciones de fenotipos no favorables, mientras que no se encontró asociación con asma en los 10 estudios restantes. (OR, 0.92; p=0.21). En este meta-análisis, no hubo asociación estadísticamente significativa del alelo Glu27 con ningún fenotipo

Con respecto al análisis de genotipos los homocigotos de Gly16 mostraron un riesgo mucho mayor de asma nocturna y severidad del asma comparados con los homocigotos de Arg16. Mientras que los heterocigotos de Gly16 tenían un riesgo moderado [54].

Basándose en los resultados de 28 estudios elegidos, en este meta-análisis Countupolos *et al.*, [54] demostraron que el alelo Gly16 no era un factor de riesgo para la susceptibilidad del asma o de hiperreactividad bronquial; pero parecía probable que duplicaba el riesgo para asma nocturna y moderados incrementos en la severidad del asma. Este estudio mostró un riesgo mayor para los homocigotos Gly16, mientras que para el alelo Glu27 no se evidenció asociación con algún fenotipo. Tampoco se detectó asociación entre ningún alelo e hiperreactividad bronquial, y esto pudo ser debido a la variación de la evaluación en los estudios. Según este meta-análisis [54] se sugiere que el gen de los receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos son un determinante importante de los fenotipos específicos de asma.

Otro meta-análisis realizado por Thakkinstian *et al.*, [55], analizó los polimorfismos y haplotipos, para las poblaciones de adultos y niños por separado, a partir de datos publicados que complementaron con datos adicionales solicitados a los autores originales. El análisis individual no detectó ningún efecto de Arg16Gly en adultos, pero sí sugieren un efecto recesivo de protección de Gly16 para los niños, con un O.R de 0,71 y un I.C del 95%: 0,53, 0,96 en comparación con los otros genotipos. Los resultados para Gln27Glu en los adultos indicaron que los heterocigotos tenían un riesgo reducido de asma en comparación con los homocigotos, indicado por un O.R de 0,73, IC 95%: 0,62 a 0,87, este meta-análisis indica que aunque los estudios son heterogéneos, en niños, el genotipo Glu27Glu tiene un riesgo menor de asma (O.R:0,60, I.C95%: 0,35 a 0,99, en comparación con los otros genotipos. A pesar de la proximidad de estos dos sitios polimórficos, el coeficiente de desequilibrio de ligamiento de 0,41 no fue alta ( $p < 0,001$ ). En cuanto al análisis de haplotipos este estudio sugirió que puede haber una interacción entre los dos sitios, con un menor riesgo de asma asociado con el alelo Glu27 (en comparación con Gln27), y que este riesgo es modificado por el alelo en la posición 16 [55].

En Colombia, un estudio realizado en la ciudad de Pereira, en el año 2007, tenía como objetivo estimar la distribución de las variantes alélicas de los sitios 46 (Gly16) y 79 (Glu27) del gen ADR $\beta$ 2 y su correlación con la severidad del asma, éste estudio mostró los siguientes resultados: el 30,4%(79) de la población general, 27,2 % (30) de los asmáticos y 33.56% (49) de los sanos, fueron homocigotos para el polimorfismo Arg16Arg. En cuanto al polimorfismo Gly16Gly, el 35%(90) de la población general, el 27,3%(40) de los casos y el 34,2%(50) de los individuos sanos, tenían este polimorfismo. Para la variante Gln27Gln se encontró una frecuencia del 68% (77) en el grupo asmático, un 74%(108) en los sanos y un 71%(185) en la población general. En cuanto a la variante Glu27Glu la frecuencia fue del 4%(5) tanto en los asmáticos como en los controles y en la población general. Con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, este dato se confirmó tanto para el genotipo correspondiente al codón 16 ( $p=0.62$ ) como para el codón 27



( $p=0.98$ ). En este estudio también se correlacionaron los diferentes alelos con la función pulmonar (VEF1 y FEF<sub>25-75</sub>), pero no se encontró significancia estadística entre estos resultados. Las conclusiones abordadas por sus autores, indicaron: que la frecuencia en la población de la variante Arg16Arg, se relacionó con mayores efectos adversos al uso de broncodilatadores de corta acción. Otra conclusión abordada fue que no había ninguna relación con la pérdida de función pulmonar, y que estos datos podrían estar sesgados por la administración concomitante del tratamiento. [56].

En el año 2010, se publicó otro estudio de la ciudad de Pereira [57], por los mismos investigadores del año 2007; esta vez la propuesta era establecer la relación de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del ADR $\beta$ 2 con la susceptibilidad y severidad del asma; determinar como era la respuesta a fármacos antiasmáticos en escolares colombianos. Se tomaron 109 pacientes y 137 controles asintomáticos los cuales fueron sometidos a genotipificación para los alelos A46G, Arg16Gly y C79G, Gln27Glu del gen ADR $\beta$ 2. En los resultados, ellos establecieron que no hubo diferencias estadísticas en las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas del gen ADR $\beta$ 2 entre los casos y los controles, ellos establecen que tampoco encontraron diferencias al comparar variables demográficas, clínicas y espirométricas de los pacientes asmáticos clasificados de acuerdo con sus genotipos y haplotipos ADR $\beta$ 2. En cuanto al genotipo y el haplotipo, tampoco encontraron relación con las respuestas espirométricas y la expresión del gen ADR $\beta$ 2 tras la administración de un agonista- $\beta$ 2 más un glucocorticoide. Ellos ante esto, sugirieron que, en el grupo de escolares mestizos estudiados, los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu no constituían marcadores de susceptibilidad o severidad para el asma, de esta manera, no se encontraban implicados en la expresión del gen ADR $\beta$ 2 durante el llamado “tratamiento de rescate” del asma.

En la ciudad de Bogotá un estudio de pacientes pediátricos asmáticos y controles [57]. Determinó la frecuencia de los tres principales polimorfismos del ADR $\beta$ 2 Arg16Gly, Gln27Glu, y Thr164Ile, en cuanto a los resultados ellos establecen que la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg para los tres polimorfismos analizados, en cuanto a las frecuencias alélicas en los casos estos fueron: Arg16 0,42, Gln27 0,71, y Thr164 0,97 y para los controles: Arg16 0,42, Gln27 0,77, y Thr164 0,98. Ellos también observaron cinco haplotipos en la población total. Las frecuencias de estos haplotipos en los controles fueron: Haplotipo 1 (Arg/Gln/Thr) 0,38, Haplotipo 2 (Gly/Gln/Thr) 0,37, Haplotipo 3 (Gly/Glu/Thr) 0,19, Haplotipo 4 (Gly/Gln/Ile) 0,02 y Haplotipo 5 (Arg/Glu/Thr) 0,04. En los casos Haplotipo 1 de 0,37, Haplotipo 2 de 0,32, Haplotipo 3 de 0,24, Haplotipo 4 de 0,03 y Haplotipo 5 de 0,05. Sin diferencias significativas entre los dos grupos. Los autores concluyeron que en su muestra analizada las frecuencias genotípicas, alélicas y haplotípicas de los tres polimorfismos no presentaban diferencias significativas entre casos y controles en relación con el asma [58] .

Un grupo en Venezuela [59], con la finalidad de establecer las frecuencias genéticas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu en un grupo de 105 asmáticos y 100 individuos sanos venezolanos. Demostró una diferencia significativa en la frecuencia Arg16Arg entre pacientes y controles:(28,6% vs 47%,  $p<0,01$ ) respectivamente. El polimorfismo Arg16Gly fue más frecuente en paciente (55%), comparado con los controles (35%,  $p < 0,01$ ). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el polimorfismo de la posición 27. En cuanto a los haplotipos para este estudio, el haplotipo Arg16GlyGln27Gln fue significativamente más frecuente en los pacientes en comparación con los controles ( $p<0,01$ ), mientras que la combinación Arg16ArgGln27Glu predominó

mas en los controles ( $p < 0,01$ ). Según los datos para los genotipos Arg16Gly y Gln27Glu, estos se asociaron con una mejor respuesta a uso del post broncodilatador. La conclusión que abordaron para este estudio, fue que, la frecuencia Arg16Arg en la población mestiza venezolana resultó más frecuente a lo descrito en otras poblaciones y esto puede ser un factor de protección en la aparición del asma [59].

Teniendo en cuenta el importante papel del  $\beta_2$ -adrenoreceptor en la regulación del tono de las vías respiratorias, un gran número de estudios clínicos han investigado, si las variantes genéticas del  $\beta_2$  adrenoreceptor se encuentran asociadas con fenotipos específicos de la entidad como por ejemplo con la Hiperreactividad bronquial (HRB), principalmente por su ubicación en una región cromosómica asociada a esta, también el Asma nocturna, severidad y función pulmonar, entre otras. Un resumen de los estudios de asociación más relevantes de los polimorfismos del ADR $\beta_2$ , se pueden ver en la tabla 1 cuadro 1.

Tabla 1 Asociaciones del ADRβ2 con fenotipos de asma [39, 49, 54, 59, 65, 67, 68, 70]

Diseño de estudio	Tamaño de muestra	Parámetros	Variante	Hallazgos
Cohorte Asmáticos	65 asmáticos (leve/moderada) U.S.A	HRB	GlnGlu27	Los Homocigotos Glu27, presentaron efecto bronco protector. Hall, I.P. <i>et al.</i> [65]
caso-control	86:(leve/moderada) 81:(severa persistente) 84(controles).UK	Severidad	ArgGly16 GlnGlu27	El Haplotipo Gly16/Gln27, fue mas frecuente en asma moderada que en asma leve. Weir, T.D. <i>et al.</i> [39]
caso-control	59:(leve) 95:(severa) 92(controles Nueva Zelan.	Severidad	ArgGly16 GlnGlu27	El Alelo Gly16 se asoció mas con asma severa, pero no con el desarrolla del asma <i>per se</i> . Holloway, J.W. <i>et al.</i> [49]
caso-control	546 asmáticos UK	Exacerbaciones.	ArgGly16 GlnGlu27	Los Homocigotos Arg16 tuvieron mayor aumento en las exacerbaciones que los Homocigotos Gly16. Palmer <i>et al.</i> , [67]
Caso-control	303 asmáticos 604controles Mexicanos	Asma	ArgGly16 GlnGlu27	Glu27 y el Haplotipo Gly16Glu27 se asociaron con un riesgo menor de tener asma. Santillan A, <i>et al.</i> [68]
Familias de individuos con asma	Puerto Riqueños 393 Mexicanos 274	Severidad	ArgGly16 GlnGlu27	Los Homocigotos Arg16 y el Haplo. ArgGln27, se asociaron con pérdida de la función pulmonar. Choudhry S, <i>et al.</i> , [69]
Caso-control	Australianos: 1090	Asma, COPD, Función pulmonar, HRB Sibilancias	ArgGly16 GlnGlu27	Los Homocigotos Arg16 tuvieron mayor riesgo de COPD, asma y sibilancias. Los homocigotos Gln27 tuvieron mayor riesgo de asma y HRB. Matheson <i>et al.</i> [70]
Caso-control	Venezolanos 105 asmáticos 100 controles	Asma severa	ArgGly16 GlnGlu27	Los Homocigotos Arg16 fueron menos prevalentes en el grupo de asma, (factor de protección en la aparición del asma) Larrocca <i>et al.</i> , [59]
Meta-análisis		HRB, Asma nocturna y Severa	ArgGly16 GlnGlu27	Gly16 se asoció con asma nocturna y severa, pero no se correlacionó con HBR. Contopoulos <i>et al.</i> [54].

## 2.9. Regulación de la actividad del $\beta_2$ -adrenoreceptor

La unión al receptor ADR $\beta_2$  de las catecolaminas endógenas, así como de las drogas  $\beta_2$ -agonistas da inicio al acoplamiento entre la proteína receptora y la proteína G estimuladora G $\alpha_s$ . Esto activa la adenilciclase, causando posteriormente un incremento en la concentración de adenosin monofosfato cíclico intracelular (cAMP). La activación del cAMP dependiente de quinasa y la fosforilación de proteínas específicas que afectan un rango de funciones celulares en las vías aéreas, incluida la relajación del músculo liso.

La magnitud de la respuesta celular a la señal del agonista  $\beta_2$  depende de numerosos factores, que incluyen: 1) la expresión del receptor, 2) la afinidad de la unión del ligando, y 3) el grado de acoplamiento entre la proteína receptora y la respuesta de los mensajeros “transducción”. Adicionalmente, los receptores de la superficie celular como el  $\beta_2$  adrenoreceptor son dinámicos, esto es; además de ser expresados y activados, ellos están sujetos a la *desensibilización* (desacoplamiento de la proteína G $\alpha_s$  o atenuación de la señalización del receptor tras la exposición crónica o aguda a un estímulo y la “regulación descendente o *Down-regulation*” (reducción de la cantidad de receptores). Las señales del  $\beta_2$  adrenoreceptor son reguladas también por medio de otros receptores de la superficie celular y moduladas en múltiples puntos de las vías efectoras. Es probable que la afinidad de los receptores por sus sistemas efectoras se regule por cambios de conformación estructural del receptor inducidos por la exposición a los agonistas. Lo que confiere al sistema una gran plasticidad y dinamismo. Todos estos mecanismos pueden estar sujetos a una variación genéticamente determinada de la función del receptor. El cuadro se complica posteriormente por los efectos potenciales de la variación genética en los componentes de las señales de transducción y otras moléculas como la proteína G y la adenil ciclase. Los estudios se han enfocado tanto en los efectos directos como en los indirectos de la activación de los receptores [72].

### 2.9.1. Desacoplamiento del $\beta_2$ adrenoreceptor de la proteína G $\alpha_s$

La desensibilización, o pérdida de respuesta ante la presencia crónica o aguda de un estímulo, se lleva a cabo al regular el acoplamiento con las proteínas G y el número de receptores disponibles en la membrana, iniciando mecanismos de internalización, reciclaje o degradación. La desensibilización de los  $\beta_2$ -adrenoreceptores acoplados a la proteínas G $\alpha_s$  incluye: **I-** Desacoplamiento del  $\beta_2$ -adrenoreceptor a la proteína G $\alpha_s$ , generalmente debido a fenómenos de fosforilación del receptor: **II-** Secuestro del  $\beta_2$ -adrenoreceptor, o internalización del receptor asociado a la membrana plasmática tras su estimulación. **III-** Fenómeno de “down-regulation”, por disminución del número de  $\beta_2$ -adrenoreceptores en la superficie celular por internalización y degradación lisosomal del receptor tras su estimulación por el agonista o por disminución de la síntesis de su ARNm [71].

### 2.9.2. Mecanismo de Endocitosis

El tráfico del  $\beta_2$ -adrenoreceptor desacoplado a compartimientos endosomales permite la desfosforilación y el reclutamiento del receptor a la superficie, como en el caso de la respuesta a los fármacos y agonistas hormonales mediados por el  $\beta_2$ -adrenoreceptor que a menudo se atenúa con el tiempo. En los endosomas es donde ocurre la disociación del complejo ligando-receptor, debido al pH ácido de su interior. Los complejos ligando-receptor ya disociados pueden seguir diferentes rutas, pueden dirigirse a los lisosomas

donde son degradados, o bien el ligando puede dirigirse al endosoma y el receptor reciclarse a la membrana plasmática y tener otros ciclos de endocitosis. La endocitosis del  $\beta_2$ -adrenoreceptor requiere también la interacción con  $\beta$ -arrestinas. En ausencia de activación del receptor, la  $\beta$ -arrestina reside en el citosol. Cuando se activan los receptores, las  $\beta$ -arrestinas (1-2) citosólicas se translocan a la membrana plasmática y la fosforilación estimulada por la unión del agonista favorece la interacción “ $\beta_2$ -adrenoreceptor-fosforilado - $\beta$ -arrestinas” [73, 74].

### 2.9.3. Proceso de resensibilización

La resensibilización es un proceso importante, ya que una desensibilización prolongada e irreversible dejaría a la célula sin capacidad de respuesta ante un nuevo estímulo. Este proceso incluye la defosforilación de los  $\beta_2$ -adrenoreceptores fosforilados que se encuentran en los endosomas. El complejo “ $\beta$ -agonista- $\beta_2$ -adrenoreceptor-fosforilado -arrestina” viaja hasta los endosomas desde la membrana plasmática. La defosforilación tiene lugar gracias a la acción de proteínas fosfatasa (GRP), que actúan de una manera más o menos efectiva en función de la secuencia de los receptores. En algunos receptores la interacción con las  $\beta$ -arrestinas es muy estable debido a que existen en su extremo carboxilo terminal abundantes cargas negativas y las fosfatasas realizan su función lentamente, una vez que tiene lugar la defosforilación se disocian los complejos ligando receptor- $\beta$ -arrestina [73, 74].

En el caso del asma, algunos pacientes con manejo de agonistas adrenérgicos, tras la administración crónica no desencadenan el proceso de internalización del agonista con el receptor, esto induce la tolerancia puesto que el receptor se va a encontrar activado en la superficie celular y la señalización se va a encontrar de manera ininterrumpida. Pero también, experimentalmente se ha observado, que agonistas adrenérgicos más eficaces, como por ejemplo el formoterol son capaces de inducir la internalización de los receptores, y aparentemente inducen a un menor grado de tolerancia. Se presentan casos en los que la administración concomitante de agonistas con corticoesteroides, disminuyen la aparición de tolerancia (no hay desensibilización) [29].

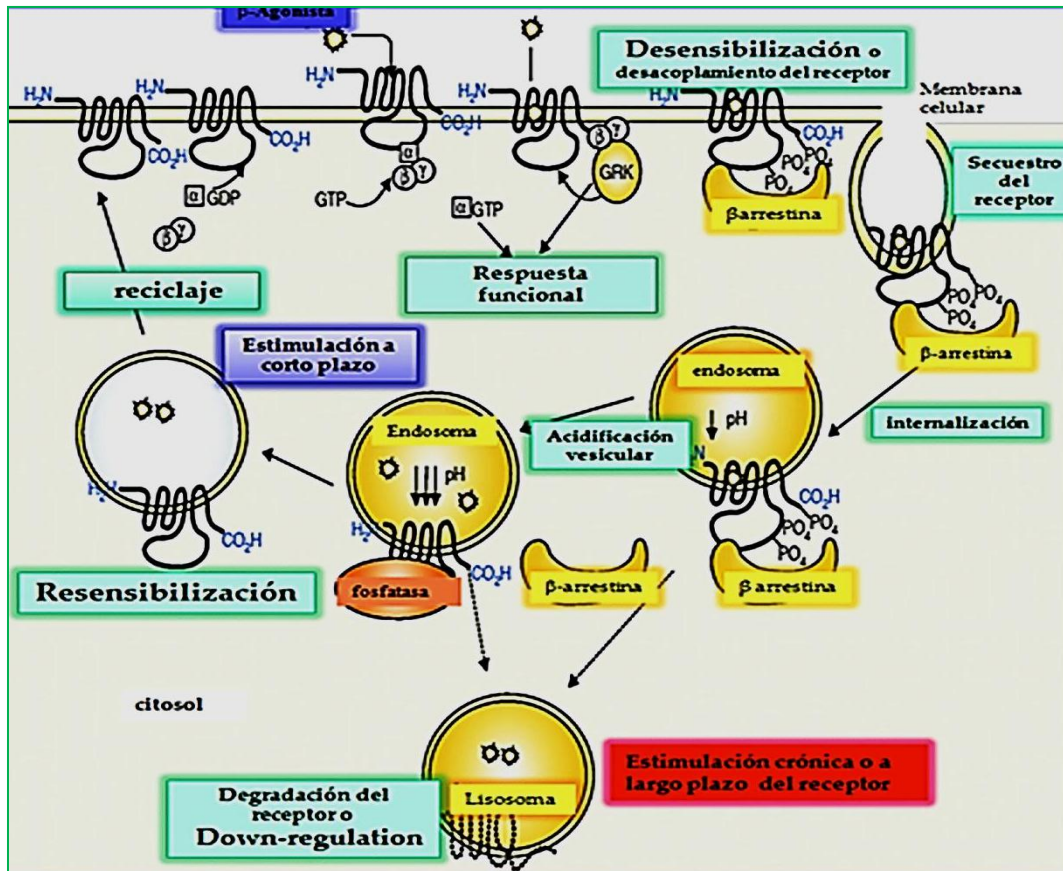


Figura 10. Regulación del  $\beta_2$ -adrenoreceptor (desensibilización y Downregulation):

En la desensibilización a largo plazo; existe una reducción del número total de los receptores, denominado regulación descendente o downregulation, este proceso se puede dar porque: 1) Aumenta la velocidad de degradación de los receptores, mediado por vesículas de clatrina y por la fosforilación de proteínas quinasas y 2) Hay una disminución en la síntesis de los receptores por la inestabilidad del ARNm. En la desensibilización a corto plazo: 1) Se observa un rápido desacoplamiento entre el  $\beta_2$ -adrenoreceptor y su proteína G; luego un secuestro momentáneo del receptor hacia el interior de la célula, por una serina-treonina quinasa denominada GRK ( $\beta$ -adrenergic-receptor-kinase) que únicamente fosforila al receptor si éste está ocupado por un agonista. 2) La unión de  $\beta$ -arrestina impide la unión de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G y por lo tanto no hay señalización. 3) El  $\beta_2$ -adrenoreceptor se disocia rápidamente de la  $\beta$ -arrestina y se incorpora al endosoma. 4) el ligando se disocia y el receptor es desfosforilado por fosfatasas específicas y luego el  $\beta_2$ -adrenoreceptor es reciclado a la membrana celular [73, 74]

#### 2.9.4. Efectos funcionales in vitro de los polimorfismos del $\beta_2$ adrenoreceptor.

En los primeros estudios *in vitro*, el grupo de Liggett [75], describió como los polimorfismos del ADR $\beta_2$  afectan la función del receptor por "regulación negativa" inducida por los agonistas. Usando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida en fibroblastos transfectados. Las células caracterizadas por dos alelos Gly16 (Homocigoto) presentaron un incremento en la "regulación negativa" comparados con aquellas con dos alelos Arg16 con exposición al agonista [75]. Un cuadro similar fue obtenido en estudios utilizando células de músculo liso de las vías aéreas humanas. Por el contrario, para las variantes en la posición 27 de la proteína receptora de ADR $\beta_2$ , Glu27 estuvo asociada con una

resistencia a la “regulación negativa” en comparación con Gln27. Sin embargo, es importante notar que la diferencia en la regulación por disminución entre genotipos (90% para Gly16 vs 75% para Arg16, una diferencia del 15%) fue notoriamente menor que el efecto total ocurrido con el genotipo, que supuestamente confiere resistencia a la “regulación por disminución” (Arg16; 75%). Esto indica que el efecto genético de la “regulación negativa” es relativo y no un fenómeno absoluto [76].

Los estudios que han sido diseñados para replicar estos hallazgos iniciales han arrojado resultados mixtos. Chong [77] cuantificaron el antagonismo funcional con respecto a la liberación de histamina por isoprenalina mediada por Ig-E en mastocitos de pulmón humano, y no hallaron efectos atribuibles a los polimorfismos de la posición 16. Por el contrario, los mismos autores confirmaron una resistencia relativa a la regulación negativa en células homocigotas para el alelo Glu27. Moore *et al* [78], reportaron una tendencia elevada a la desensibilización para la variante Gly16 en células de músculo liso de las vías aéreas humanas, confirmando el trabajo de Green *et al.* [8]. Sin embargo, para la posición 27, la resistencia a la regulación negativa era más elevada en las células homocigotas para Glu27, proporcionando de esta manera datos que entran en conflicto con los reportes de Green *et al* [8].

Las incoherencias de los resultados entre varias investigaciones *in Vitro* podrían deberse a diferentes grados de desequilibrio de ligamiento entre las posiciones 16 y 27 de las células estudiadas. Otra posible explicación es que aquí haya un “efecto de confusión” de los polimorfismos localizados en la región 5’ flanqueante. Las variantes codificantes para 5’-BUP, que regulan la expresión del receptor ADR $\beta$ 2, confieren un efecto independiente del agonista sobre la función del receptor. La variante Cys19 está asociada con una expresión elevada de ADR $\beta$ 2 en comparación con la variante Arg19. Además, existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre BUP Arg19 y el bloque codificante para el receptor del polimorfismo Glu27. Por lo tanto, con la mayor expresión del receptor en asociación con la variante Cys19, la capacidad para demostrar regulación negativa luego de la exposición al agonista podría estar aumentada.[76]

#### 2.9.5. Relación entre estudios In Vitro e In Vivo:

A pesar de que la evidencia a partir de los estudios *in Vitro* es inconsistente, el hecho de que las diferencias entre fenotipos sean marcadores frecuentemente identificados hace posible que los polimorfismos tengan importancia funcional. Los resultados de los estudios clínicos son más coherentes, particularmente aquellos que son el resultado del tratamiento a largo plazo con inhalación de agonistas- $\beta$ 2 de acción corta [79]. La pregunta continúa: ¿los polimorfismos están relacionados con la desensibilización y la regulación por disminución del receptor? Si es así, entonces ya que el genotipo Gly16 está en gran parte asociado con mayor regulación por disminución *in Vitro*, los resultados de los estudios clínicos parecen ser contrarios a lo esperado e incoherentes con los datos *in Vitro*.

Small *et al* [80] han tratado de direccionar esta cuestión. Ellos han propuesto un modelo dinámico para la regulación del ADR $\beta$ 2 en relación con la exposición al agonista. La figura 9 muestra este modelo, en el cual las concentraciones fisiológicas de los agonistas endógenos resultan en la desensibilización y tolerancia de los receptores, particularmente para el SNP-B (en este caso Gly16), el cual exhibe *in Vitro* mayores grados de regulación negativa. Para el SNP-A (Arg16), la función del receptor está relativamente preservada.



Por lo tanto, la exposición a dosis únicas del agonista a concentraciones farmacológicas, resulta en una respuesta inmediata mayor para el SNP-A comparado con el SNP-B. A su vez, el desarrollo de la tolerancia sería mucho mayor en el SNP-A (Arg16), por lo cual, en contraste con el SNP-B, se puede esperar una regulación negativa posterior. Esta explicación puede ser de gran ayuda para reconsiderar los resultados aparentemente contradictorios entre los estudios *in Vitro* e *in vivo*[76].



Figura 11. Comparación de los fenotipos en el modelo estático vs el dinámico de la regulación del receptor.

Estos modelos difieren dependiendo si los agonistas endógenos “pre regulan” la función del receptor antes de la exposición a los agonistas exógenos. El efecto clínico esperado (taquifilaxia o tolerancia) difiere dependiendo del modelo. Para el ADR $\beta$ 2, el polimorfismo de un único nucleótido A (SNP) es el polimorfismo Arg16, y el SNP B es el polimorfismo Gly16. Las columnas representan respuestas fisiológicas arbitrarias, como el volumen espiratorio forzado en el 1 seg. Small et al [80].

## 2.9.6. Respuestas In Vivo de los agonistas de $\beta$ 2: Efectos del Genotipo y el Haplotipo

### 2.9.7. Efectos agudos

En la actualidad se conoce que cada paciente responde de forma diferente a la misma medicación. Estas diferencias generalmente son más grandes entre los individuos de una población que en una misma persona en diferentes épocas (o entre mellizos monogigóticos). La existencia de grandes diferencias poblacionales con pequeña variabilidad entre cada paciente es coherente con que la herencia es determinante de la respuesta a un medicamento. A diferencia de otros factores que influyen la respuesta a un medicamento, los que son determinados genéticamente generalmente se mantienen estables a través de la vida del individuo. Dentro de este marco, los estudios



farmacogenéticos pueden ser considerados como un tipo especial de estudios de genpor-ambiente, en los cuales el uso de medicamentos representa la exposición ambiental.

Para la broncodilatación, la mayoría de los estudios han indicado que el genotipo Arg16 confiere una probabilidad incrementada a la respuesta a una sola dosis de los agonistas- $\beta_2$ . En un estudio epidemiológico, Martínez et al. [81] encontraron que el 60% de los niños asmáticos y el 14.3% de los no asmáticos que tenían el genotipo Arg16 mostraron una mejoría en el volumen espiratorio forzado en el 1 segundo (FEV<sub>1</sub>) con salbutamol. Esto en comparación con 13.3 y 3.0% en los homocigotos para Gly16, respectivamente. De igual forma, Lima et al. [82] encontraron que los cambios máximos en FEV<sub>1</sub> eran más grandes en los individuos homocigotos para Arg16 después de usar terbutalina oral (18% de incremento desde la línea basal en este grupo Vs 4.9% en los homocigotos para Gly16). De nuevo, estos resultados son coherentes con la hipótesis dinámica en la que un genotipo que confiere resistencia a la desensibilización *In Vitro* está asociada con un incremento inicial en la respuesta a la primera dosis de un agonista exógeno.

Aún no se ha encontrado un patrón consistente para la relación haplotipo-fenotipo de ADR $\beta_2$ . Drysdale et al [41] reportaron una relación significativa pero compleja entre el haplotipo ADR $\beta_2$  y la respuesta aguda al broncodilatador en 121 individuos asmáticos. Sin embargo, Taylor et al. [76], no pudieron confirmar ninguna relación en individuos asmáticos pertenecientes a un grupo aún más grande (n=161). En el estudio realizado por Taylor et al [76], se tuvo particular cuidado de eliminar cualquier posibilidad de alguna influencia de confusión del tratamiento con corticoesteroides inhalados y agonistas- $\beta_2$  utilizando periodos apropiados de suspensión de la droga previos a la prueba de la respuesta al broncodilatador. El tratamiento con corticoesteroides puede incrementar la capacidad de la línea basal de las vías aéreas y disminuir indirectamente la respuesta del músculo liso por la disminución en la inflamación de las vías. Los agonistas- $\beta_2$  pueden resultar en tolerancia y, por lo tanto, atenuar la respuesta del broncodilatador sin importar el genotipo. Aún cuando se analice por el genotipo y no por el haplotipo, el estudio de Taylor et al. [76], no logra confirmar que los individuos homocigotos para Arg16 presentaran una respuesta incrementada aguda al broncodilatador en comparación con los individuos Gly16. Por lo tanto, parece poco probable que el efecto agudo del broncodilatador por los agonistas- $\beta_2$  pudiera predecirse con certeza ya sea por el genotipo o por el haplotipo de ADR $\beta_2$ .

Algunos hallazgos investigados en los efectos del polimorfismo del  $\beta_2$ -adrenoreceptor (Arg16Gly) en la respuesta a agonistas- $\beta_2$  han sido por estudios funcionales *In Vitro* y en estudios clínicos que han mostrado efectos opuestos en la respuesta crónica a los agonistas- $\beta_2$ . En contraste, con los hallazgos del estudio financiado por el NIH (Instituto Nacional de Salud) sobre la respuesta  $\beta$ -adrenérgica del Genotipo [83], apoyó los efectos deletéreos del alelo Arg16 en la respuesta al tratamiento tradicional con albuterol, en términos de síntomas y función pulmonar [84]. Una posible explicación para estos resultados contradictorios ha sido propuesta dentro del marco del autodenominado modelo dinámico [75]. De acuerdo con este modelo, es posible que los alelos (como Gly16) que están asociados con un aumento en la "regulación negativa o downregulation" por catecolaminas endógenas puedan ser menos efectivos a la exposición aguda a agonistas- $\beta_2$  exógenos pero relativamente resistentes a los efectos taquifilácticos del uso frecuente de los agonistas- $\beta_2$ . Los hallazgos originados a partir de Israel [83] y de otros estudios en ADR $\beta_2$  tienen el potencial de influir significativamente en el uso clínico de los agonistas-  $\beta_2$  en los pacientes con asma.

### 2.9.8. Dosificación crónica

Gracias a que la principal preocupación acerca de la seguridad del uso regular de los agonistas-  $\beta_2$  – particularmente aquellos agentes de acción corta –se han desarrollado numerosos estudios retrospectivos, y más recientemente estudios prospectivos a largo plazo para identificar si los beneficios y/o los efectos adversos están relacionados con el genotipo [76].

En el estudio de Sears et al [85], el control del asma se deterioró con el fenoterol de inhalación regular que fue administrado durante 6 meses a 64 individuos en un estudio cruzado en el que se controlaba el placebo. Posteriormente, después del análisis para los genotipos de las posiciones 16 y 27, Hancox et al. [86] reportaron un incremento en la hiperreactividad de las vías aéreas a la metacolina, la cual fue significativa en individuos Arg16. En un gran estudio retrospectivo realizado por Taylor et al. [79] en el cual se realizaron comparaciones entre “los que fuera necesarios” y tratamientos regulares con salbutamol (cada uno administrado por 4 semanas), los resultados clave (flujo máximo matutino, tasa de exacerbación del asma) no fueron diferentes entre tratamientos dentro de toda la población de estudio (n=115). Sin embargo, cuando se estratifican por el genotipo, emergen diferencias importantes: Los individuos Arg16 mostraron una media de flujo máximo matutino mas baja, y su tasa de exacerbación casi duplicada con el uso regular del salbutamol. Independientemente, el requerimiento de tratamiento con prednisona oral fue también mas elevado en los individuos Arg16 durante el tratamiento regular con salbutamol. En los heterocigotos y en los homocigotos para Gly16 no hubo diferencias significativas entre tratamiento. Es interesante que el promedio de mejoría en el flujo máximo y la tasa de exacerbación que ocurrió con el agente salmeterol de larga acción (comparado con el placebo) fue menor en los individuos Arg16, aunque fueron mejores que durante el periodo de tratamiento con placebo, sin importar el genotipo. Posteriores análisis retrospectivos de los ensayos de SOCS y SLIC [87] han proporcionado datos que confirman que el genotipo influye fuertemente en la respuesta clínica con el agonistas- $\beta_2$ , salmeterol de larga acción y que los efectos son negativos [87].

En otros estudios que involucran agonistas- $\beta_2$  de acción corta, han emergido escenarios similares con relación a la importancia del genotipo Arg16. En un análisis retrospectivo conducido por Israel *et al.* [83], los homocigotos para Arg16 experimentaron un flujo máximo matutino reducido con el uso regular de salbutamol. Los mismos autores condujeron un estudio prospectivo aleatorio en el cual los resultados con tratamiento de agonistas- $\beta_2$  de acción corta de uso regular y “cuando fuera requerido” fueron comparados en dos grupos: homocigotos para Arg16 y asmáticos Gly16 [83]. Esto demostró que en los individuos Arg16 (n=37), el uso regular de salbutamol inhalado por 16 semanas no logró ninguna mejoría en el flujo máximo matutino. En el grupo Gly16, hubo un incremento significativo (14 L / min;  $p=0.018$ ). Cuando se suspendió la terapia, el flujo máximo se incrementó en el grupo Arg16 pero no cambió en el grupo Gly16. Este patrón de resultados es coherente con la respuesta adversa atribuible a la intervención en los pacientes Arg16. Las diferencias entre genotipos también se observaron por los síntomas y los requerimientos para el “alivio” suplementario. Ninguno de los estudios disponibles ha identificado una relación entre las variantes de la posición 27 y las manifestaciones clínicas durante el tratamiento a largo plazo con agonistas- $\beta_2$ . [83].

En resumen, la administración a largo plazo de medicamentos agonistas- $\beta$ 2 de acción corta está consistentemente asociada con la respuesta adversa en pacientes con el genotipo Arg16. Para los agonistas- $\beta$ 2 de larga acción, los hallazgos son persuasivos pero no definitivos. Las implicaciones prácticas de estos resultados son ambiguas. Primero, en el manejo del “asma difícil” caracterizada frecuentemente por el uso excesivo de medicamentos agonistas- $\beta$ 2 de acción corta, esto puede ser importante para determinar el genotipo de ADR $\beta$ 2 de un paciente, si la facilidad para realizarlo estuviera disponible. Si los pacientes son homocigotos para Arg16, entonces esto identificaría una susceptibilidad particular para un empeoramiento del asma relacionado con el medicamento, y las estrategias para el tratamiento se podrían adaptar según el caso. Segundo, en los ensayos clínicos en los cuales se evalúan los agonistas- $\beta$ 2, estratificar la población de estudio según el genotipo de ADR $\beta$ 2 sería una consideración *a priori* importante. Aunque esto pueda aumentar significancia el número de individuos que puedan requerirse; minimiza la posibilidad de un sesgo en los resultados por el genotipo ADR $\beta$ 2 [76].

### 2.9.9. Tolerancia

La tolerancia a los efectos de los agonistas- $\beta$ 2 es común, y se desarrolla rápidamente. Los resultados de los estudios *in Vitro* han resaltado que la variación genética de ADR $\beta$ 2 altera la capacidad de los receptores de adaptar su función por cualquier mecanismo, cuando son expuestos continuamente a las drogas agonistas- $\beta$ 2 (como ocurre en la desensibilización o la “regulación negativa”). Por lo tanto, parece lógico asumir que las diferencias entre los resultados clínicos con agonistas- $\beta$ 2 en relación con el genotipo ADR $\beta$ 2 resulten de las diferencias en la predisposición a desarrollar tolerancia farmacológica. Sin embargo, esto no ha sido comprobado. Existe una evidencia muy limitada de que la tolerancia es el mecanismo primario para los efectos adversos de los agonistas- $\beta$ 2, ya sea que estén relacionados o no con el genotipo de ADR $\beta$ 2. En la publicación de Israel et al. [84], los cambios en flujo máximo que siguen el comienzo o la terminación de un tratamiento con agonistas- $\beta$ 2 sugieren que la tolerancia es un mecanismo posible, pero la evidencia no es conclusiva de ninguna manera.

De hecho, la relación entre el genotipo ADR $\beta$ 2 y la tolerancia *in Vivo* inducida por la medicación ha sido sustentada pobremente. Teóricamente, y con base en el modelo sugerido por Small *et al.* [80], se puede esperar que la tolerancia ocurra con más posibilidad en individuos Arg16 (o Glu-27). Tan *et al.* [88] evaluaron retrospectivamente el efecto del tratamiento a corto plazo con formoterol sobre el desarrollo de la tolerancia a los agonistas- $\beta$ 2 y concluyeron que los mayores grados de tolerancia ocurrieron en pacientes con el genotipo Gly16. Esto es consistente con el modelo estático de la respuesta *in vivo* de los receptores de ADR $\beta$ 2 con exposición crónica al medicamento, más que con un modelo dinámico[76]. En estudios posteriores, los mismos autores tampoco lograron confirmar que ni el genotipo de la posición 16 ni el de la 27 determinan el desarrollo de la tolerancia. En un estudio prospectivo de Taylor *et al.* [76], no se observaron diferencias importantes en la tolerancia entre genotipos. Comparado con el placebo, el tratamiento regular con salmeterol resultó en tolerancia (medida por el incremento en FEV<sub>1</sub> con dosis secuenciales de salbutamol) cuya magnitud no fue estadísticamente diferente entre los genotipos de la posición 16. Los números fueron

pequeños; en todo caso, las tendencias fueron hacia grados más elevados de tolerancia en los individuos Arg16.

Identificar la influencia de la genética en el comportamiento de la respuesta a los medicamentos, tiene el potencial de mejorar tanto el uso como la prescripción de los mismos. Se ha logrado cierto progreso para los agonistas-  $\beta$ 2. La posibilidad biológica de una asociación entre polimorfismos no-sinónimos del gen ADR $\beta$ 2 y sus efectos funcionales ha sido explorada tanto *in Vitro* como *in vivo* – particularmente con respecto a la expresión, desensibilización y “regulación negativa”. Los hallazgos de los estudios *in vitro* están lejos de ser coherentes entre sí. Sorprendentemente, los datos de los estudios clínicos son mucho más consistentes. La evidencia actual relaciona al polimorfismo Arg16 con la respuesta adversa. En la práctica, la disponibilidad de genotipificar pacientes con asma complicada, especialmente en los que usan frecuentemente agonistas- $\beta$ 2” podría dar importantes luces al problema. Los homocigotos para Arg16 podrían experimentar inestabilidad en su asma como consecuencia de su tratamiento con los agonistas- $\beta$ 2 [76].

### 3. HIPÓTESIS

Los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2 Arg16Gly y Gln27Glu son más frecuentes en personas asmáticas que en personas no asmáticas en la población de adultos colombianos.

#### 3.1. *Hipótesis Nula*

No hay diferencias en la frecuencia de los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2 Arg16Gly y Gln27Glu en la población adulta asmática y no asmática en Colombia.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. *Objetivo General*

Determinar si existe asociación entre los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2, Arg16Gly (A46G) y Gln27Glu (C79G) y el asma, asma severa y no severa en adultos que asisten al Hospital Universitario San Ignacio

#### 4.2. *Objetivos Específicos*

- Establecer las frecuencias alélicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu, y de sus haplotipos en una muestra de población adulta sana y asmática en la ciudad de Bogotá.
- Estimar la asociación de los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2 Arg16Gly y Gln27Glu con los diversos grados de severidad según los cuales se estratificará el grupo de casos.
- Analizar las frecuencias alélicas obtenidas en la población de estudio en relación con las frecuencias alélicas reportadas en la literatura para otras poblaciones.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. *Población de Estudio y Muestra*

Con el objetivo de investigar si los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2, Arg16Gly (A46G) y Gln27Glu (C79G), constituyen una asociación con el asma, asma severa y no severa, se llevó a cabo un estudio de casos y controles apareado, con un tamaño de muestra poblacional de 70 casos y 59 controles, de adultos que asistieron al Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) de la Facultad de Medicina en la Pontificia Universidad Javeriana ubicada en la ciudad de Bogotá, durante el período 2006 a 2008.

En el grupo de casos se llevó a cabo una estratificación según asma severa y no severa según los criterios establecidos por este documento y los controles individuos no asmáticos que asistieron a la misma institución.

Los casos y su respectivo control se seleccionaron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión, e ingresaron al estudio con previa firma del consentimiento informado.

El tamaño de muestra fue obtenido mediante el programa OpenEpi, Version 2, con la herramienta tamaño de muestra para estudios de casos y controles, utilizando la siguiente información.

Confiabilidad: 95%

Error tipo II (1- $\beta$ ): 80%

Proporción de controles expuestos: \* 50 [39].

Proporción de casos expuestos: 74,48

OR previsto \* 2.918 [91]

Asociación de casos y controles: 1:1

Obteniéndose un n= 69 casos y 69 controles

### 5.2. *Variables de Estudio*

- Frecuencia alélica: Numérica discreta.
- Frecuencia haplotípica: Numérica discreta.
- Severidad del asma: Discreta ordinal.
- Curva Flujo-Volumen: Continua de razón.
- Edad: Continua categorizada.
- Sexo: Discreta nominal.
- Estrato socioeconómico: Discreta ordinal.
- Uso de medicamentos: Nominal.
- Tipo de hospitalización: Nominal
- Número de hospitalizaciones: Numérica discreta

### 5.3. **Criterios y Definiciones**

#### 5.3.1. **Casos**

#### 5.3.2. **Criterios de inclusión**

- Adultos
- Diagnóstico previo de asma mediante espirometría, curva flujo-volumen o prueba de provocación con Metacolina.
- Asma severa persistente se considero aquella que fue clasificada como tal por el médico tratante o que cumplió con los siguientes criterios [92]: síntomas diarios, exacerbaciones y síntomas nocturnos frecuentes, hay limitaciones en la actividad física, VEF<sub>1</sub> o FEP < 60% del predicho y variabilidad del VEF<sub>1</sub> y FEP entre > 30%.
- Asma moderada persistente se considero aquella que fue clasificada como tal por el médico tratante o que cumplió con los siguientes criterios [92]: síntomas diarios, las exacerbaciones que afectaban la actividad y el sueño, los síntomas nocturnos se dan más de una vez a la semana, requerimiento del uso diario de medicamentos con efecto beta 2 agonista de rápida acción, VEF<sub>1</sub> o FEP 60-80% del predicho y variabilidad del VEF<sub>1</sub> y FEP entre > 30%.
- Asma leve persistente se considerara aquella que fue clasificada como tal por el médico tratante o que cumpliera con los siguientes criterios [92]: los síntomas más de una vez a la semana pero menos de una vez al día, las exacerbaciones que afectaban la actividad y el sueño, los síntomas nocturnos se dan más de dos veces al mes, VEF<sub>1</sub> o FEP > 80% del predicho y variabilidad del VEF<sub>1</sub> y FEP entre 20-30%.
- Asma leve intermitente se considero aquella que sea clasificada como tal por el médico tratante o que cumpla los siguientes criterios [92]: los síntomas se dan menos de una vez a la semana, exacerbaciones cortas, los síntomas nocturnos se dieron menos de dos veces al mes, volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF<sub>1</sub>) o flujo espiratorio pico (FEP) > 80% del predicho y variabilidad del VEF<sub>1</sub> y FEP < al 20%.

#### 5.3.3. **Criterios de exclusión**

- Factores adicionales que se manifiesten como obstrucción reversible o irreversible de las vías aéreas como Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC), Bronquiectasias, neoplasias, Enfermedad Pulmonar Intersticial, edema pulmonar, trauma, eventos aspirativos masivos y reacciones anafilácticas.
- Asma ocupacional, asma inducida por el ejercicio y asma inducida por Aspirina.
- Sobrepeso, definido como un índice de masa corporal mayor a 25 Kg/m<sup>2</sup>.

- Diagnóstico de Síndrome coronario o cardiomiopatías.

#### 5.3.4. **Controles**

#### 5.3.5. **Criterios de inclusión**

- Adultos, apareados con cada uno de los casos mediante sexo y edad en un rango de 5 años.

#### 5.3.6. **Criterios de exclusión**

- Historia previa de asma o sibilancia, diagnosticada a cualquier edad y de cualquier severidad.
- Historia familiar en primer grado de asma o sibilancia, de cualquier severidad.
- Factores adicionales que se manifiesten como obstrucción reversible o irreversible de las vías aéreas como Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, ICC, Bronquiectasias, neoplasias, Enfermedad Pulmonar Intersticial, edema pulmonar, trauma, eventos aspirativos masivos y reacciones anafilácticas.
- Asma ocupacional, asma inducida por el ejercicio y asma inducida por Aspirina.
- Sobrepeso, definido como un índice de masa corporal mayor a 25 Kg/m<sup>2</sup>.
- Diagnóstico de Síndrome coronario o cardiomiopatías.

#### 5.3.7. **Criterios de severidad**

Se consideró asma severa como aquella definida por los criterios dados en el documento del “Global Initiative for Asthma” [92] para asma severa persistente tomando en cuenta los criterios de la sección (5.3.2) de este proyecto. Para el resto de pacientes asmáticos los que cumplían con las definiciones de asma moderada persistente, leve persistente y leve intermitente según criterios del “Global Initiative for Asthma” [92] y con los criterios que se enuncian en la sección (5.3.2) de este documento, se definieron los asmáticos no severos.

### 5.4. ***Recolección y manejo de la Información***

#### 5.4.1. **Datos demográficos, clínicos y paraclínicos**

Se creó una base de datos con su respectivo formato de captura mediante el programa de Microsoft Acces® con el fin de tomar los siguientes datos: número consecutivo, grupo de estudio, nombres y apellidos, número de historia clínica, edad, sexo, estrato socioeconómico, pruebas de función pulmonar, hospitalizaciones, uso de medicamentos, historia familiar y un árbol genealógico simétrico de tres generaciones (Anexo 1). Estos datos están codificados según el Manual de Codificación.



## 5.5. *Trabajo molecular*

### 5.5.1. **Obtención de muestras**

A todos los individuos con previa firma del consentimiento informado cuyo número consecutivo coincidió con el registro en la base de datos. Se les realizó una extracción de una muestra de 5ml de sangre periférica, mediante venopunción recogidas en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante y almacenadas a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN (Anexo 2).

### 5.5.2. **Extracción de DNA**

Con el Kit *Wizard genomic DNA purification* (Promega) mediante la técnica de extracción salina, a partir de sangre total se realizó la extracción de ADN de gran calidad, adecuadas para las reacciones de la PCR. (Anexo 3)

### 5.5.3. **Evaluación del rendimiento de la extracción de ADN**

La cantidad y calidad de muestra de ADN extraída puede ser un factor fundamental en el análisis genético de los polimorfismos Arg16Gly16 y Gln27Glu, por lo que una vez extraídas las muestras se procedió a evaluar la cantidad y calidad de ADN mediante la determinación de la absorbancia a 260nm y a 280nm en el espectrofotómetro del instituto de genética Humana de la Universidad Javeriana. La absorbancia fue medida en un volumen final de 100 µL, tras hacer una dilución de las muestras al 1/50, mediante la adición de 5 µl de la muestra problema a 95 µl de agua destilada. Todas las diluciones se midieron por duplicado, anotando la absorbancia a 260 nm y la relación 260/280.

### 5.5.4. **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

A partir de la muestra de ADN obtenida se amplificó la región del gen que codifica para el receptor  $\beta$ 2-adrenergico (ADR $\beta$ 2), en el que se encuentra el polimorfismo del nucleótido 46 generando un cambio de adenina por guanina (A por G), que a nivel de la secuencia de la proteína produce la sustitución de una Arginina por una Glicina en el aminoácido 16 (Arg16Gly). La otra variante encontrada en la posición 79 del gen del receptor  $\beta$ 2-adrenergico es un cambio del nucleótido citosina por guanina (C por G) que resulta en sustitución del aminoácido glutamina por ácido glutámico en el codón 27. Tabla 2

Con el uso de los primers citados previamente por Martínez *et al* [81] (cuadro 1).

**Sentido:** 5'GCCTTCTTGCTGGCACCCCA 3'

**Antisentido:** 5' CAGACGCTCGAACTTGGCCATG 3'

Se logró flanquear la región que incluye los polimorfismos Arg16Gly (G/A) y el polimorfismo Gln27Glu (C/G). Las bases que aparecen en negrilla son modificadas de la secuencia reportada, con el objetivo de crear los sitios de restricción para la enzima de restricción NcoI.

La PCR es una técnica que nos sirvió para la amplificación in vitro de las secuencias de ADN específicas, esta técnica se dio en tres etapas; la primera etapa: la desnaturalización, se generó por las altas temperaturas que separaron las hebras de ADN; en la segunda etapa, el anillamiento, los primers 0.5Mm, se hibridaron con las secuencias complementarias en los dos extremos 3` del segmento de ADN. La amplificación del molde se dio a una temperatura de 63°C y durante la tercer etapa; de elongación o extensión se logró gracias a: la enzimaTaq polimerasa 0.25U (Promega), MgCl<sub>2</sub> 0,75μM, los primers usados como molde de las dos hebras de ADN y los cuatro dNTPs 0.5 μM. La elongación final del ADN se llevó a cabo a una temperatura de 72 °C.Cuadro 1

La estandarización de la PCR se realizó de acuerdo a los protocolos y condiciones experimentales del laboratorio del Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana. Este procedimiento se efectuó a partir de la muestra 3.0 μl de ADN obtenida.

#### 5.5.5. **Visualización de los resultados**

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 1%. El gel se hizo disolviendo la agarosa en el TBE 10X en un horno microondas. Una vez enfriada la agarosa, se añadieron 5μl de bromuro de etidio y se depositó en la cubeta de electroforesis. El bromuro de etidio actúa intercalándose entre las hebras de ADN, emitiendo fluorescencia al ser iluminado con luz ultravioleta, lo que permite poner en manifiesto la presencia de ácidos nucleicos en el gel de agarosa. Una vez solidificada la disolución o el gel a temperatura ambiente, se procedió a cargar la totalidad de los productos de PCR (7 μl). En todos los geles se utilizó, un marcador de peso molecular para ADN, cuyo patrón de bandas oscilaba en un rango de tamaños de 50 en 50 pb.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando como tampón TBE 10X a 150 Voltios durante 30 minutos, después de que termino el corrimiento electroforético se colocó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para hacer la interpretación de los resultados que se asociaban con posición de la reacción de la PCR. Cada carril del gel fue cuidadosamente examinado para determinar si la amplificación fue positiva, negativa o no concluyente, en función de los siguientes criterios:1) Se consideró una amplificación positiva cuando podía observarse en los carriles del gel, la banda del tamaño correspondiente a 168pb. 2) La evaluación de la presencia de otras bandas de tamaño diferente al esperado. 3) Se tuvo también en cuenta, cuando la banda problema emitía más luminosidad que las demás, esto debía observarse con cuidado para descartar una posible contaminación de más ADN en la muestra. Y por último aquellas reacciones en las que no se observaba una buena luminosidad de la banda problema o era muy tenue, se consideraron como no concluyentes, con lo que no se dio por válido el resultado y se volvieron a montar para la amplificación.

## PROCESO MOLECULAR

A partir de sangre total se realizó la extracción de DNA con el protocolo del kit de Promega.

Se amplificó el gen ADR $\beta$ 2, para las posiciones 46 y 79. Cada reacción de PCR estuvo compuesta

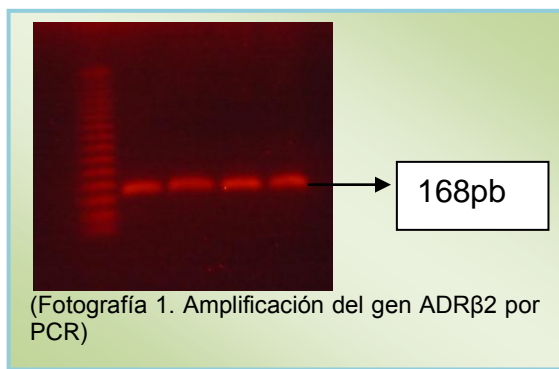
REACTIVO	[C Inicial]	[Cfinal]	VFinal( $\mu$ l)
Buffer	5X	1X	4.0
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4mM	0.75
dNTPs-Mix	100mM	0.2mM	0.5
Primer Sentido F	100 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.5
Primer Antisentido R	100 $\mu$ M	5 $\mu$ M	0.5
Taq polimerasa(Promega)	5U/ul	1.25U	0.25
DNA	20ng/ul		3
Agua	-		12.50
Volumen final de la reacción			22

Luego de preparada cada reacción se realizó la PCR de acuerdo al protocolo para el gen.

### Protocolo de amplificación del gen ADR $\beta$ 2 en el termocilcador *Biorad*

Primers	Sentido: 5' GCCTTCTTGCTGGCACCCCAT 3' Antisentido: 5' CAGACGACTTGGCCATG 3'		
Fases	Temperatura	Tiempo	
Denaturacion inicial		95°C	5 minutos
35 ciclos	Denaturación	95°C	30 segundos
	Anillamineto	60°C	30 segundos
	Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final		72°C	5 minutos
Tamaño del Fragmento		168 Pares de bases	

Luego con los productos de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (150V-30min) y se reveló con Bromuro de Etidio



CUADRO 1

### 5.5.6. Digestión enzimática de productos amplificados (RFLPs)

El análisis de RFLPs realizado en los individuos reveló los cambios en la secuencia de ADN en el único exón de la región codificante del gen ADR $\beta$ 2, el primero en el nucleótido 46, en donde hay un cambio de adenina por guanina (A por G), produce la sustitución de una arginina por una glicina en el aminoácido 16 Arg16Gly y la variante en el nucleótido 79, que da un cambio de citosina por guanina (C por G), a nivel del aminoácido en la posición 27, produce un cambio de glutamina por ácido glutámico (Gln27Glu)

Los primers citados previamente por Martínez *et al.* [81], en el cebador 5' crean un sitio de restricción para NcoI con la aparición del polimorfismo Gly16 pero no de Arg16, y el cebador 3' crea otro sitio de restricción para la misma enzima la cual digiere ambos polimorfismos, el cual fue usado como control de digestión completa. El polimorfismo Glu27 crea un sitio de restricción natural para la enzima BbvI. Además de polimorfismos aislados, también fue posible identificar los haplotipos. Para su correcta interpretación, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la amplificación de todos los pocillos relativos al gen ADR $\beta$ 2.

Tabla 2 Polimorfismos identificados por análisis de RFLP

Exón	Región de ADN	Cambio nucleótido	Cambio aminoácido	Referencia
1	Codificante	Adenina por guanina (A46G)	Arg16Gly	Martinez <i>et al</i> [81]
1	Codificante	citosina por guanina (C79G)	Gln27Glu	

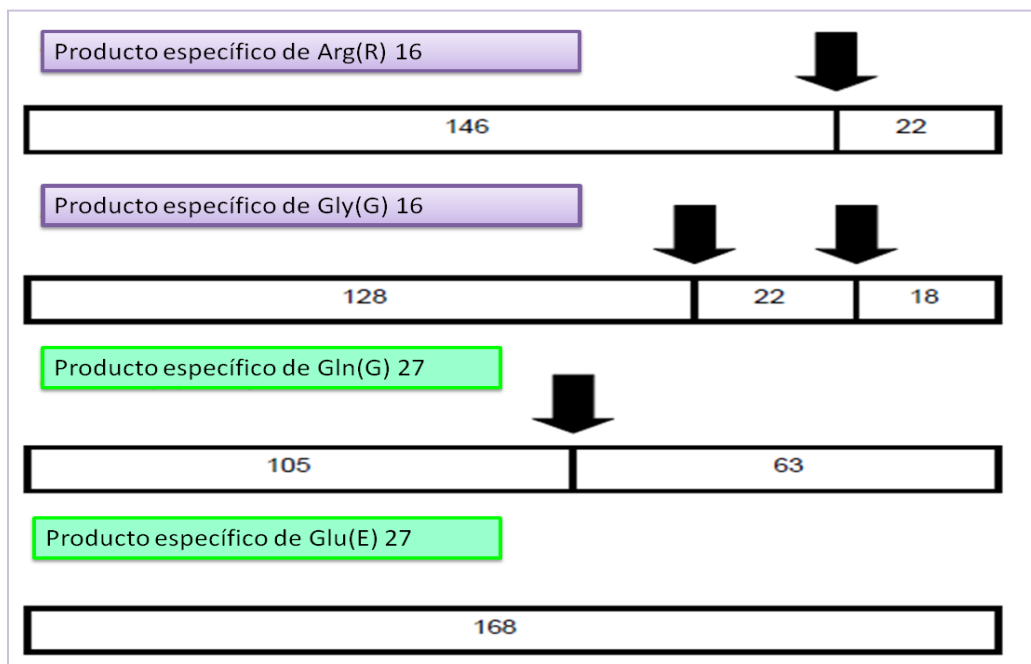


Figura 12 Sitios de restricción para los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2. (RFLPs).

Los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2. Arg16(R) Gly16 (G) y Gln27 (G) Glu27 (E). En un fragmento de 168 pares de bases, al digerir con la enzima de restricción *Nco*I, se generan dos fragmentos de 146 y 22 pares de bases para el alelo Arg16(R). Para el alelo Gln27 (G), la enzima *Bbv*I crea un sitio de restricción y genera dos fragmentos de 105 y 63pares de bases [81].

#### 5.5.7. Presencia del polimorfismo Arg16Gly

El gen que codifica para el receptor  $\beta$ 2- adrenérgico tiene un polimorfismo Arg16Gly en la posición 46 en la secuencia de ADN, con el fin de indentificar de éste polimorfismo se realizó un análisis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Los primers utilizados para la amplificación de la región del gen fueron: primers forward 5' GCCTTCTTGCTGGCACCCCAT3' y primer reverso 5' CAGACGCTCGAACTTGGCCA 3'. Se generó la detección de los polimorfismos en la posición 16 con las condiciones de PCR anteriormente citadas. Las bases que aparecen en negrilla se modificaron de la secuencia reportada, con el objetivo de crear los sitios de corte para la enzima de restricción *Nco*I. Para evidenciar el polimorfismo se tomarón 6.5 $\mu$ l del producto de la PCR de 168 pares de bases, con 2 UI de *Nco*I en 4 $\mu$ l de 25 mM de acetato de potasio, 10 mM de Tris acetato (pH 7.9), 5 mM de acetato de magnesio, 0,5 mM DTT y 16.7 mM MgCl<sub>2</sub>, todo el contenido se llevó a incubación a 37° C por 12 horas [93].

#### 5.5.8. Verificación de genotipos Arg16Gly

La presencia de un genotipo concreto en el locus de los genes ADR $\beta$ 2 que codifica para el receptor  $\beta$ 2-adrenergico, se determinó examinando las reacciones relativas a dicho locus, comprobando que fuesen coherentes y que en ninguna de ellas se hubiese obtenido un resultado no concluyente.

Para evidenciar los sitios de restricción de la enzima *Nco*I del fragmento original de 168pb, los productos de la digestión fueron llevados a una electroforesis en las cámaras Decode y MiniProteam II de BIO-RAD, según la estandarización en cada caso. La revelación de los geles se hizo con la coloración de plata. De esta forma la digestión mostró fragmentos de 146 y 22pb cuando el genotipo es A/A (Arg16Arg), cuando el genotipo era A/G, Arg16Gly los fragmentos fueron 146, 128,22 y 18pb y si era el genotipo G/G; Gly16Gly los fragmentos eran 128,22 y 18pb. Tabla 1

#### 5.5.9. Presencia del polimorfismo Gln27Glu

El polimorfismo en el gen ADR $\beta$ 2 del receptor  $\beta$ 2- adrenérgico Gln27Glu en la posición 79 en la secuencia de DNA, se genera con los mismos primers anteriormente citados por que este polimorfismo está en la misma región codificante de (Arg16Gly). Para evidenciar el polimorfismo se tomaron 6.5 $\mu$ l del producto de la PCR con 2,0 UI de la enzima *Bbv*1 en 4  $\mu$ l de 25 mM de NaCl, 5 mM de Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT. El total de la muestra se llevó a incubación a 37° C por 12 horas.Tabla 3

#### 5.5.10. Verificación de genotipos Gln27Glu

A través de una electroforesis en geles de policrilamida al 12%, teñidos con bromuro de etidio y revelados con lámpara de luz UV, los productos de la digestión con la enzima *Bbv*I, mostró que los fragmentos de 105 y 63pb correspondían al genotipo G/G

(Gln27Gln), los fragmentos de 168, 105 y 63 al genotipo G/C (Gln27Glu) y los fragmentos de 105 y 63pb al genotipo C/C (Glu27Glu). Tabla 3

Tabla 3 Condiciones para la detección de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del ADR $\beta$ 2 (PCR- RFLPs)

Descripción de las condiciones de la reacción PCR-RFLP para el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido(SNPs)								
SNP	Genotipos	Alelos	Primers	Producto PCR	Tm	Enzima de Restricción	Tamaño Alelo (pb)	Fuente
Arg16Gly	A/A	A	F 5'-GCCTTCTTGC TGGCACCCCAT-3'	168pb	37°C	NcoI	A-146, 22	Martínez 1997
	A/G						G-128, 22, 18	
	G/G	G	R5'CAGACGCTCGAA CTTGGCCATG					
Gln27Glu	G/G	G	F 5'-GCCTTCTTGC TGGCACCCCAT-3'	168pb	37°C	BvuI	G-105,63	Martínez 1997
	G/C							
	C/C	C	R 5'-CAGACGCTCG AACTTGGCCATG-3'				C-168	

#### 5.6. **Análisis estadístico.**

Los resultados fueron analizados por género, edad y estrato socioeconómico. Se realizó la estadística descriptiva para las variables numéricas y categóricas. Con el objetivo de establecer posibles diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre controles y los distintos grupos clínicos, se utilizó el nivel de significancia estadística establecido a  $P < 0,05$ .

Para determinar la asociación polimorfismo enfermedad se utilizó un modelo de casos y controles, donde se consideró como exposición positiva la presencia del alelo y como exposición negativa la ausencia de éste, la validez de estos resultados se hizo mediante el cálculo de *odds ratio* (OR). Se realizó el planteamiento de pruebas de hipótesis con el fin de determinar si existía asociación entre las variables y la enfermedad. Se tomó un nivel de confianza del 95% para evaluar la significancia estadística. Las pruebas estadísticas se realizaron con los programas Epidat, versión 3.1.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Descripción demográfica de la población

Ciento veintinueve individuos, con una distribución de 70 controles y 59 casos fueron escogidos con criterios de exclusión e inclusión, en el Hospital universitario San Ignacio entre enero del 2006 a enero de 2008, de la ciudad de Bogotá (Colombia). La estructura de los individuos de este estudio se describe en la Tabla 1. Se puede destacar que en cuanto a la variable de la edad, el rango más prevalente en ambos grupos estuvo entre los 36 y 41 años. En cuanto al género hubo un cierto predominio del sexo femenino (81/129) en ambos grupos. El estrato social 1 y 2 reflejo una frecuencia mayor en el grupo de los casos, mientras que en el grupo control hubo una mayor frecuencia de estratos mayores a 3. (Tabla 4)

Tabla 4 Distribución de las variables demográficas de la población estudiada

Características de la población según el género, edad y estrato				
Variables	Casos(n=70)	Controles(n=59)	Total	Valor p
Rango de edad				
18-23	7(8%)	6(11%)	13(100%)	0.9267
24-29	6(10%)	7(13%)	13(100%)	
30-35	7(11%)	3(7%)	10(100%)	
36-41	12(19%)	11(20%)	23(100%)	
42-47	6(10%)	6(11%)	12(100%)	
48 – 53:	9(14%)	6(9%)	15(100%)	
54 – 59	6(10%)	5(9%)	11(100%)	
>60	12(18%)	12(20%)	24(100%)	
Total	65(100%)	56(100%)	121(100%)	
Género				
Femenino	44(64%)	39(65%)	81(100%)	0.9322
Masculino	26(36%)	20(35%)	46(100%)	
Total	70(100%)	59(100%)	129(100%)	
Estrato social				
(1-2)	54(77%)	2(4%)	53(100%)	<0,001
>3	14(23%)	55(96%)	68(100%)	
Total	68(100%)	57(100%)	121(100%)	

## 6.2. Descripción de las características clínicas de los individuos asmáticos.

El grupo de individuos con asma estuvo constituido por 70 individuos, en los cuales se valoró la gravedad del asma según los criterios de GINA [92] la distribución de los diferentes criterios de este grupo se muestra en la Tabla 5.

De acuerdo con el diagnóstico de asma según los síntomas del paciente, se observó una mayor prevalencia de pacientes que tenían asma severa persistente 39/70 individuos con un porcentaje del (51%) sobre el total del grupo. En el grupo de estudio la mayoría de los pacientes 43/70 que represento un total del (60%), presentaban asma severa. En este estudio se tomó en cuenta la lista de medicamentos que estaban usando los pacientes asmáticos, la distribución de los fármacos antiasmáticos entre los pacientes presentó una mayor frecuencia de  $\beta$ -Agonistas de corta acción (SABA), 64/70(35%) y también del uso frecuente de Corticoesteroides 63/70 (33%). En cuanto a la asistencia clínica de estos pacientes se observó una alta relevancia en el servicio de urgencias, con un total de 923 ingresos. Por otro lado el factor de antecedentes familiares para el asma, estimó que 40 individuos de los 70 tenían historia familiar positiva para la enfermedad.

Tabla 5 Características de los individuos asmáticos en el estudio

Pacientes asmáticos de este estudio(n=70)	
Diagnóstico de asma	Total
severa persistente	39(51%)
moderada persistente	19(30%)
Leve persistente	8(11%)
Leve intermitente	4(6%)
Total	70(100%)
Grupo de estudio	
Asma severa	43(60%)
Asma no severa	27(40%)
Total	70(100%)
Tratamiento	
$\beta$ -Agonistas de corta acción	64(35%)
$\beta$ -Agonistas de larga acción	16(8%)
Corticoesteroides	63(33%)
Anticolinérgicos	23(23%)
Antileucotrienos	3(3%)
Teofilina	16(9%)
Total	185(100%)
Asistencia Clínica	
Medicina interna	498
Urgencias	923



### 6.3. Descripción de resultados moleculares

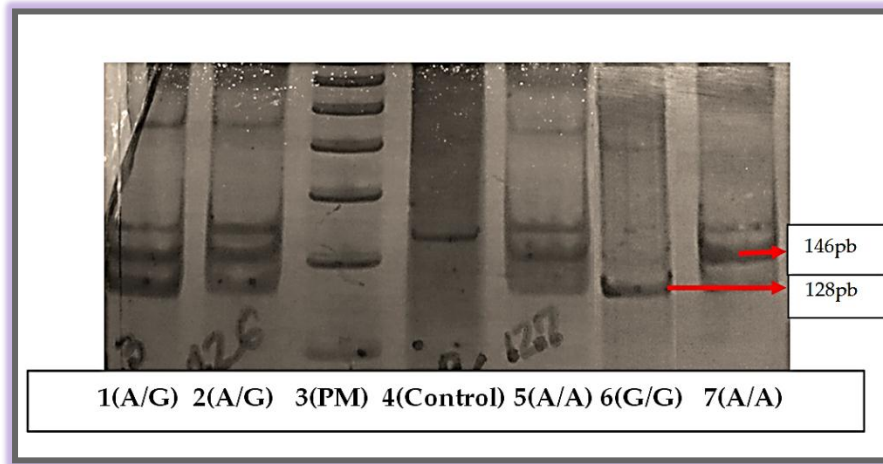


Figura 13 Electroforesis de la amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo Arg16Gly del gen *ADRB2* con la enzima *NcoI*

Identificación de los polimorfismos Arg16Gly en asmáticos seleccionados. Homocigotos para Arginina 16 líneas 5 y 7. Homocigoto para Glicina 16, línea 6 y los heterocigotos para el polimorfismo Arg16Gly líneas 1,2 y 6.

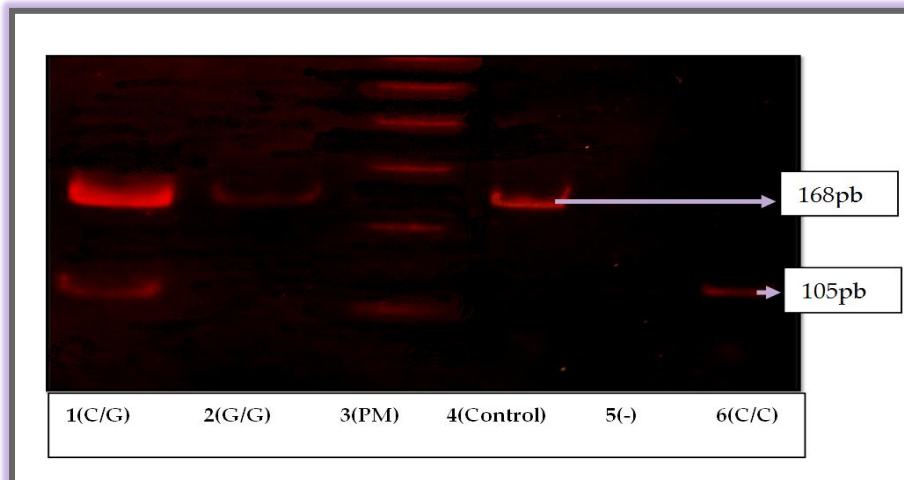


Figura 14 Electroforesis de la amplificación y corte del segmento correspondiente al polimorfismo Gln27Glu del gen *ADRB2* con la enzima *BbvI*.

El producto amplificado de *ADRB2* produce una banda de 168pb. Heterocigoto para el polimorfismo Gln27Glu, líneas 1. Homocigoto para Glu27 línea 2 y Homocigoto para Gln27 línea 6.

#### 6.4. **Presencia del Polimorfismo Arg16Gly del ADR $\beta$ 2.**

De los aislamientos realizados en el grupo de los casos se encontró la distribución de los genotipos de la siguiente forma: el cambio en estado heterocigoto A/G(Arg16Gly), se dio en 38 individuos, 2 para el genotipo G/G(Gly16Gly) y 30 para el genotipo A/A(Arg16Arg), las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.45 para el genotipo A/A(Arg16Arg), 0.54 para el genotipo A/G (Arg16Gly) y 0.03 para el genotipo G/G(Gly16Gly) , la frecuencia del alelo G (Gly16) fue del 0.30 y la frecuencia del alelo A (Arg16) del 0.70. Por otro lado en el grupo control, se encontraron 34 individuos para el polimorfismo A/G y 25 individuos para el genotipo A/A, las frecuencias genotípicas encontradas para este grupo fueron: 0.58 para el genotipo A/G y 0.42 para el genotipo A/A, en grupo control no hubo ningún individuo para el genotipo G/G, en cuanto a la frecuencia alélica del polimorfismo de este grupo, se mostró que la frecuencia del alelo A fue del 0.71 y la del alelo G fue del 0.29 como se muestra Tabla 6.

#### 6.5. **Presencia del polimorfismo Gln27Glu del ADR $\beta$ 2**

De los aislamientos analizados en el grupo de estudio, se encontró la distribución de los genotipos del polimorfismo Gln27Glu. Para el grupo de los casos la distribución fue de la siguiente forma: el polimorfismo C/G (Gln27Glu) se dio en 44 individuos, el genotipo G/G (Glu27Glu), en 7 individuos y el genotipo C/C (Gln27Gln) en 19, las frecuencias genotípicas encontradas fueron 10% para el genotipo G/G, 0.63 para el genotipo C/G y 0.27 para el genotipo C/C, la frecuencia del alelo G (Glu27) fue del 0.41 y la frecuencia del alelo C (Gln27) fue 0.59. Para el grupo control se encontraron 29 individuos para el polimorfismo C/G, 3 individuos para el genotipo G/G y 27 individuos para el genotipo C/C, las frecuencias genotípicas encontradas fueron 0.49 para el genotipo C/G, 0.05 para el genotipo G/G, y para el genotipo C/C, 0.46, la frecuencia del alelo G (Glu27) fue del 0.30 y la del alelo C (Gln27) fue 0.70%, como se muestra en la tabla 7.

#### 6.6. **Estimación del equilibrio de Hardy-Weinberg**

La población de este estudio no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a que se estima que un valor de p menor de 0,05 indica desequilibrio y como para el polimorfismo Arg16Gly en el grupo de los casos el valor de p fue 0,014 y para el grupo control 0,0019, se estimó que ambos grupos estaban en desequilibrio. En cuanto al polimorfismo Gln27Glu el valor de p para el grupo de los casos fue 0,013 y para el grupo control de 0.17, pese a esto, los resultados indicaron que ambas poblaciones no diferían significativamente en sus frecuencias alélicas y genotípicas Dichas estimaciones fueron realizadas por el programa Genepop versión 3.4 por el método cadenas de Markov, respectivamente para cada grupo de individuos y para cada polimorfismo.

### 6.6.1. Inferencias de los polimorfismos Gly16 y Glu27

Para los polimorfismos Gly16 y Glu27 del gen ADR $\beta$ 2, se estudiaron los 4 alelos correspondientes a estos dos polimorfismos. Al analizar los resultados para el alelo Arg16 se encontró que era más frecuente que el alelo Gly16, tanto para el grupo de los casos como para el grupo control. Por otro lado, en cuanto al alelo Gln27, se observó que presentaba una mayor frecuencia en comparación con el alelo Glu27, tanto en el grupo de casos como en el grupo control. En este análisis no se evidencio una variación en la frecuencia alélica, a pesar de tener un número más bajo de individuos en el grupo control. Con respecto a la distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu, no se encontraron diferencias significativas en los asmáticos y el grupo control. Tabla 6 y 7

Tabla 6 Distribución del polimorfismo Arg16Gly16 en la población asmática y no asmática

Polimorfismo Arg16Gly del $\beta_2$ -adrenoreceptor Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en el grupo de casos y controles					
Polimorfismo	Alelos y Genotipos			Casos(n=70)/ Frecuencia	controles(n=59)/ Frecuencia
Arg16Gly	Alelo	A	Arg16	98/(0.70)	84/(0.71)
		G	Gly16	42/(0.30)	34/(0.29)
	Genotipo	A/A	Arg16Arg	30/(0.43)	25/(0.42)
		A/G	Arg16Gly	38/(0.54)	34/(0.58)
		G/G	Gly16Gly	2/(0.03)	0
			HW	<b>p=0,014</b>	<b>p=0,0019</b>
			Chi-Squared	X <sup>2</sup> =5.9	X <sup>2</sup> = 9.6

\*HW: equilibrio de Hardy Weinberg.

Valor de p con nivel de confianza del 95% para equilibrio de Hardy Weinberg, p<0,05 indica disequilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla 7 Distribución del polimorfismo Gln27Glu en la población asmática y no asmática.

Polimorfismo Gln27Glu del $\beta_2$ drenoreceptor Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en el grupo de casos y controles					
Polimorfismo	Alelos y Genotipos			Casos(n=70)/ Frecuencia	Controles(n=59)/ Frecuencia
Gln27Glu	Alelo	C	Gln27	82/(0.59)	83/(0.70)
		G	Glu27	58/(0.41)	35/(0.30)
	Genotipo	C/C	Gln27Gln	19/(0.27)	27/(0.46)
		C/G	Gln27Glu	44/(0.63)	29/(0.49)
		G/G	Glu27Glu	7/(0.10)	3/(0.05)
			HW	<b>p=0.013</b>	<b>p=0.17</b>
			Chi-Squared	X <sup>2</sup> =6.1	X <sup>2</sup> =1.8

\*HW: equilibrio de Hardy Weinberg.

Valor de p con nivel de confianza del 95% para equilibrio de Hardy Weinberg, p<0,05 indica disequilibrio de Hardy Weinberg.

### 6.7. Frecuencias alélicas y genotípicas del ADR $\beta$ 2 en otras poblaciones

Existe una considerable variación en las frecuencias de alelos y genotipos del gen que codifica para el  $\beta_2$ -adrenoreceptor ADR $\beta$ 2, entre los diferentes grupos étnicos, como se observa en la tabla 7. En este estudio se puso en evidencia las variantes alélicas del gen ADR $\beta$ 2 en una población adulta de la ciudad de Bogotá, en la cual es prevalente el mestizo con ancestros de blanco español, negro africano e indígena americano; consecuentemente, se esperaba encontrar una distribución alélica correspondiente con nuestro origen tri-étnico. No obstante las distribuciones de los alelos y genotipos para los polimorfismos Gly16 y Gln27, se sitúan cercanos a una población de este mismo País, Pereira. En cuanto a los polimorfismos Arg16Gly se evidencia una baja frecuencia de homocigotos para Gly16, en comparación con otros grupos étnicos reportados. (Tabla 8,9)

**Tabla 8 Poblaciones en las cuales han sido reportadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Arg16Gly en adultos sin asma.**

Población	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly/Gly	Arg16	Gly16
México [68]	17%	52%	31%	43%	57%
Colombia Pereira [94]	46%	47.4%	6.6%	69.7%	30.3%,
Colombia Bogotá(estudio actual)	42%	58%	0%	71%	29%
caucásico americano[95]	15%	46%	39%	38%	62%
caucásico europeo[95]	27%	38%	35%	46%	54%
Afroamericanos[95]	24%	50%	26%	49%	51%
chinos [95]	36%	46%	18%	59%	41%

**Tabla 9 Grupos étnicos en los cuales han sido reportadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Gln27Glu.**

Población	Gln27Gln	Gln27Glu	Glu27Glu	Gln27	Glu27
México [68]	64%	33%	3%	80%	20%
Colombia Pereira [94]	44,7%	48,2%	7,1%	68,8%	31,2%
Colombia Bogotá(estudio actual)	46%	49%	5%	70%	30%
caucásico Americano[95]	32%	53%	15%	58%	42%
caucásico Europeo[95]	46%	39%	15%	65%	35%
Afroamericanos[95]	63%	32%	5%	79%	21%
Chinos[95]	86%	14%	0	93%	7%

6.8. **Asociación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu entre casos y controles.**

El objetivo de este trabajo se basó en establecer si había o no diferencias en las frecuencias de los polimorfismos del gen ADR $\beta$ 2, Gly16 y Glu27 en la población adulta asmática y no asmática en Colombia. Basándose en esta hipótesis, el problema fue decidir acerca de la validez de las diferencias si las había, tomando como base los resultados experimentales.

La tabla 10 resume las frecuencias de los alelos identificados en los análisis de RFLPs en los casos y controles para los polimorfismos Arg16 y Gly16. Los datos de esta correlación sugirieron que en el caso de Arg16, este alelo tuvo una frecuencia mayor que el alelo Gly16, tanto en los controles como en los casos. En cuanto al alelo Gln27, éste mostró también una mayor frecuencia en relación con el alelo Glu27 en ambos grupos.

El resultado para establecer una asociación estadística entre el polimorfismo Gly16 se basó en estimar la razón de las prevalencias o *odds ratio* (OR), cuyo valor fue de 1.0 (intervalo de confianza, IC 95%: [0,61-1,8]). Para el polimorfismo Glu27 el OR calculado fue 1.6, IC 95%: [0,99-2,8], indicando que no había una asociación entre el antecedente y la enfermedad. En este enfoque se tuvo en cuenta que el valor de 1 estuvo dentro del intervalo, lo que generó el rechazo de la hipótesis de asociación. Finalmente, la significancia estadística, para Gly16 se resumió con el valor de  $p=0.04$ , lo que señaló la falta de asociación entre la frecuencia alélica y la enfermedad.

Tabla 10 Asociación de las Frecuencias alélicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu entre casos y controles.

Alelo	casos(70)	controles(59)	Estadístico OR IC (95,0%)
Arg16	98(70%)	84(70%)	OR:1.0 I.C=(0,61-1,8) valor $p$ : 0,83
Gly16	42(30%)	34(30%)	
Gln27	82(61%)	83(70%)	OR:1.6 I.C=(0,99-2,8) valor de $p$ : 0,04
Glu27	58(39%)	35(30%)	

6.9. **Asociación de las frecuencias Genotípicas del polimorfismo Arg16Gly del ADR $\beta$ 2, entre casos y controles.**

Al determinar la correlación entre los genotipos del polimorfismo Arg16Gly entre los casos y controles, no fue posible establecer una relación entre el polimorfismo y el asma. Para determinar la asociación de estos datos se calculó el valor del O.R que en este caso fue 0.4 (IC 95%: [0.4; 1.7]), indicando así que no había asociación entre el Genotipo y la enfermedad, debido a que el extremo inferior del intervalo estaba por debajo de 1, generando así el rechazo de la hipótesis de asociación. En cuanto al valor de  $p$  para este análisis, éste fue superior a un 5% ( $p=0,41$ ), señalando aún más la falta de asociación entre la enfermedad y el genotipo. En la tabla 11 se observa una mayor frecuencia del

genotipo Arg16Gly tanto en casos como en controles, en comparación con los demás genotipos.

Tabla 11 Asociación del polimorfismo Arg16Gly entre casos y controles.

Genotipo	Casos(70)	Controles(59)	Estadístico OR, IC (95,0%)
Arg16Arg	30(47%)	25(41%)	OR=0,8 I.C=(0,4-1,7) Valor de $p=0,41$
Arg16Gly	38(50%)	34(59%)	
Gly16Gly	2(3%)	(0%)	

6.10. **Asociación de las Frecuencias Genotípicas del polimorfismo Gln27Glu del ADR $\beta$ 2, entre casos y controles.**

Al correlacionar la frecuencia del polimorfismo Gln27Glu como se muestra en la tabla 12 en el grupo de casos y controles, se observó una mayor frecuencia del genotipo Gln27Glu, en ambos grupos, pero considerando que el valor del OR para este análisis fue de 1.7, (IC95%: [0.8-3.5]) y que el valor de  $p$  fue de 0.08, se determinó que los individuos en cuestión que tenían el polimorfismo Gln27Glu27 no tenían asociación con el asma, debido a que el intervalo de confianza (I.C) pasó por 1 y que el valor de  $p$  no fue estadísticamente significativo.

Tabla 12 Asociación del polimorfismo Gln27Glu entre casos y controles.

Genotipo	Casos(70)	Controles(59)	Estadístico OR, IC (95,0%)
Gln27Gln	19(27%)	27(46%)	OR=1.7,IC:(0.8-3.5) Valor de $p=0,08$
Gln27Glu	44(63%)	29(49%)	
Glu27Glu	7(10%)	3(5%)	

6.11. **Distribucion Alelo- haplotipo en casos con asma**

Los polimorfismos Arg16Gly (A46G) y Gln27Glu (C79G) están localizados en el mismo gen y el mismo exón son relativamente próximos entre sí, y a los alelos que se transmiten conjuntamente se les denomina haplotipos; fue necesario estimar la frecuencia de los Haplotipos entre los individuos afectados y no afectados.

Para analizar estos datos consideramos los dos loci: el locus 1 con los dos alelos Arg16 y Gly16 y el locus 2 con los alelos Gln27 y Glu27 (Tabla13). Esto mostro que en locus 1, el alelo Arg16 estaba presente en el 70% de los cromosomas en la población de los pacientes y el aleo Gly16 en el 30%. En el locus 2, el alelo Gln27 estuvo presente en el 59% de los cromosomas y el alelo Glu27 en el 41%. De amañera análoga, los dos haplotipos que contenían el alelo Arg16, Arg16Gln27 y Arg16Glu27, tuvieron frecuencias

del 87% y 47% respectivamente. Los haplotipos que contenían el alelo Gly16, Gly16 Gln27 y Gly16 Glu27 tuvieron frecuencias del 13% y 53% respectivamente. Por consiguiente, pudimos deducir que los haplotipos más frecuentes de esta población fueron Arg16 Gln27 (142/87%) y Gly16 Glu27 (62/53%).

**Tabla 13 Distribucion Alelo- haplotipo en casos con asma**

Locus 1 Locus-2	Alelo Arg16	Alelo Gly16	Total
Alelo Gln27	Arg16 Gln27 142(87%)	Gly16 Gln27 22(13%)	164(59%)
Alelo Glu27	Arg16 Glu27 54(47%)	Gly16 Glu27 62(53%)	116(41%)
Total Alelos	196(70%)	84(30%)	280(100%)

### 6.12. **Distribucion Alelo- haplotipo en controles**

Para este caso igual que el anterior se realizó un análisis comparativo de las variantes alélicas Arg16, Gly16, Gln27 y Glu27 en su conformación haplotípica, en todos los portadores Demostrando también que en el grupo de individuos no asmáticos, los haplotipos más frecuentes fueron Arg16Gln27 (132/80%) y Gly16Glu27 (34/49%). (Tabla 14)

**Tabla 14 Distribucion Alelo- haplotipo en controles**

Locus 1 Locus-2	Alelo Arg16	Alelo Gly16	Total
Alelo Gln27	Arg16Gln27 132(80%)	Gly16Gln27 34(20%)	166(70%)
Alelo Glu27	Arg16Glu27 36(51%)	Gly16Glu27 34(49%)	70(30%)
Total	168 (71%)	68(29%)	236(100%)

#### 6.12.1. **Relación de haplotipos entre casos y controles**

Para este punto se realizó un análisis comparativo de los haplotipos Arg16Gln27, Arg16Glu27, Gly16Gln27 y Gly16Glu27 entre los casos y controles. En la composición de la muestra se observó que el haplotipo más frecuente fue Arg16Gln27, debido a que se encontró en el 51% de los casos y en el 56% de los controles. Por otro lado, se encontró que el haplotipo Gly16Gln27 fue el menos frecuente en comparación con los 3 haplotipos restantes.

El valor estadístico común para todos los niveles (Arg16Gln27, Arg16Glu27, Gly16Gln27, Gly16Glu27), fue menor a 0,05 ( $p=0,011$ ), lo que señaló que había una diferencia entre alguno de los diferentes niveles de exposición (Haplotipos) entre los casos y controles. Debido a esto se cuantificó el grado de relación existente entre alguna de las variables. De esta manera se evidenció que los haplotipos Gly16Gln27 y Gly16Glu27 diferían



significativamente, ya que se encontró que el haplotipo Gly16Glu27, era mas frecuente en el grupo de los casos con un 22% en comparación con los controles que tuvo una frecuencia del 14%. El resultado de este análisis mostro un *odds ratio* de 1.69 (IC 95%:[1,04;2,7]), indicando por lo tanto, una asociación entre el antecedente ( haplotipo: Gly16Glu27) y la enfermedad (asma).(Tabla15)

**Tabla 15 Relación de haplotipo entre casos y controles**

Haplotipo	Casos(70)	Controles(59)	Estadístico OR, IC (95,0%)
Arg16Gln27	142(51%)	132(56%)	Referencia
Arg16Glu27	54(19%)	36(16%)	OR:1,39 (IC 95%: [0,85;2,2])
Gly16Gln27	22(8%)	34(14%)	OR:0,60 (IC 95%: [0,3;1,08])
Gly16Glu27	62(22%)	34(14%)	OR:1,69 (IC 95%: [1,04;2,7])
Total	280(100%)	236(100%)	Valor de $p=0,011$

### 6.12.2. Relación de haplotipos por genotipos de los polimorfismos Gly16 y Glu27 del ADR $\beta$ 2 entre casos y controles.

Los haplotipos más representativos en los dos grupos evaluados fueron Arg16Gly/Gln27Glu (28/21%) y Arg16Gly/Gln27Gln (42/32%), respectivamente. (Tabla 16). El valor estadístico para este análisis fue igual a 0.38, lo que significó que el genotipo no tenía capacidad predictiva sobre ninguno de los dos grupos.

**Tabla 16 Relación de Haplotipos del  $\beta$ 2 -adrenoreceptor entre casos y controles**

Genotipos	Casos(n=70)	Controles(n=59)	Total
<b>Arg16ArgGln27Gln</b>	11(9%)	10(8%)	21(17%)
<b>Arg16GlyGln27Gln</b>	10(9%)	17(12%)	28(21%)
<b>Arg16ArgGln27Glu</b>	16(12%)	12(8%)	28(20%)
<b>Arg16GlyGln27Glu</b>	25(19%)	17(13%)	42(32%)
<b>Gly16GlyGln27Glu</b>	2(2%)	0	2(2%)
<b>Arg16ArgGlu27Glu</b>	3(2%)	2(2%)	4(4%)
<b>Arg16GlyGlu27Glu</b>	3(3%)	1(1%)	4(4%)
<b>Total</b>	70(56%)	59(45%)	129(100%)

Valor de  $p=0.38$



### 6.12.3. Análisis de haplotipos del ADR $\beta$ 2 en la población de afectados.

En la tabla 17, se observan los resultados de la distribución de los haplotipos realizado en 70 individuos no emparentados de la ciudad de Bogotá cada haplotipo presenta en la población la frecuencia que sería esperada simplemente basándose en la frecuencia de los alelos en los loci que conforman el haplotipo. Como se puede observar para las variantes **Arg16Gly** y **Gln27Glu** del ADR $\beta$ 2, el número de haplotipos o combinaciones que se pueden obtener son 9, pero para esta población se encontraron 7 y sólo 2 haplotipos se encontraron con mayor frecuencia; entre los cuales el más común fue Arg16 Gly16/Gln27Glu 25(36%), seguido de Arg16Arg/Gln27Glu 16(23%) respectivamente.

Tabla 17 Distribución de los genotipos de las variantes Gly16 y Glu27 en el grupo de los casos.

Variante genética SNP1 \ SNP2	Gln27Gln	Gln27Glu	Glu27Glu	Total
Arg16Arg	11(16%)	16(23%)	3(4%)	30(43%)
Arg16Gly	10(14%)	25(36%)	3(5%)	38(54%)
Gly16Gly	0	2(3%)	0	2(3%)
Total	21(30%)	13(61%)	6(9%)	70(100%)

### 6.12.4. Relación de los alelos Arg16-Gly16 y el fenotipo

Para determinar si había una relación con la frecuencia de los alelos Arg16 y Gly16 en los individuos afectados con asma severa (n=43) y no severa (n=27), se realizó una tabla en donde se relacionaba el fenotipo con las dos variantes, pero los valores estadísticos para este análisis indicaron la falta de relación entre los alelos y la severidad del asma, debido a que el valor de  $p$  fue 0.30 ( $>0.05$ ). Tabla 18

Tabla 18 Distribución de las frecuencias alelos Arg16 y Gly16 en individuos con asma severa y no severa.

Grupo de estudio	Alelo Arg16	Alelo Gly16	Total
Asma severa	62(72%)	24(28%)	86(61%)
Asma no severa	36(67%)	18(33%)	54(39%)
Total	98(70%)	42(30%)	140(100%)

Valor de  $p= 0,30$

### 6.13. Relación de los alelos Gln27-Glu27 y el fenotipo

El análisis de la distribución de los alelos Glu27 y Gln27 de acuerdo al fenotipo, muestra que el alelo más frecuente fue Gln27 dentro del grupo de individuos que presentaron

asma severa. El valor de  $p$ , para este análisis fue 0.22 ( $>0.05$ ), lo que indicó que no había diferencias apreciables entre los fenotipos y los alelos. (Tabla 19)

Tabla 19 Distribución de las frecuencias alelos Gln27 y Glu27 en individuos con asma severa y no severa.

Fenotipo	Alelo Gln27	Alelo Glu27	Total
Asma severa	53(62%)	33(38%)	86(62%)
Asma no severa	29(54%)	25(46%)	54(38%)
Total	82(59%)	58(41%)	140(100%)

Valor de  $p=0,22$

#### 6.14. **Relación entre el fenotipo y el polimorfismo Arg16Gly**

La relación del polimorfismo Arg16Gly entre casos de asma severa ( $n=43$ ) y no severa ( $n=27$ ), mostró que más de la mitad de los individuos tenían la variante Arg16Gly 30(43%), en comparación con las demás. El valor de estadístico para este análisis fue  $p=0.71$ , lo que significó que el polimorfismo Arg16Gly no tenía relación con el fenotipo de severidad. (Tabla 20)

Tabla 20 Distribución del polimorfismo Arg16Gly de acuerdo al fenotipo de severidad

fenotipos	Arg16Arg	Arg16Gly	Gly16Gly	Total
Asma severa	20(29%)	22(31%)	1(1%)	43(61%)
Asma no severa	10(14%)	16(23%)	1(1%)	27(38%)
Total	30(43%)	38(54%)	2(3%)	70(100%)

Valor de  $p=0,71$

#### 6.15. **Relación entre el fenotipo y el polimorfismo Gln27Glu**

Este análisis se realizó para conocer cuál era el genotipo más frecuente de acuerdo al fenotipo, para lo cual se dicotomizó en severidad y no severidad (Tabla 21). En general el genotipo Gln27Glu fue el más frecuente en ambos grupos, pero se destacó principalmente en los sujetos que tenían asma severa (23/43). El valor de estadístico para este análisis fue de  $p=0.11$ , lo que significó que no había diferencia significativa entre los genotipos y los fenotipos de severidad.

**Tabla 21 Distribución del polimorfismo Gln27Glu de acuerdo al fenotipo de severidad**

fenotipos	Gln27Gln	Gln27Glu	Glu27Glu	Total
Asma severa	15(21%)	23(33%)	5(7%)	43(62%)
Asma no severa	4(6%)	21(30%)	2(3%)	27(38%)
Total	19(27%)	44(63%)	7(10%)	70(100%)

Valor de  $p=0,11$

#### 6.16. **Distribucion Alelo-haplotipo-Fenotipo de severidad**

Los dos loci para los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu están estrechamente ligados entre si, lo que quiere decir que están en desequilibrio de ligamiento. Esto significa que cuando uno de los alelos está presente en el haplotipo, el otro también tiene la probabilidad aumentada de estar presente dentro de este haplotipo y de esta manera influir o modificar el fenotipo de la enfermedad. En cuanto a esto se encontraron 4 combinaciones en los individuos con asma severa en este estudio. La combinación más frecuente para este grupo fue Arg16Gln27 presentándose en un 87% (92/106) respectivamente, los 3 haplotipos restantes tuvieron una frecuencia menor. (Tabla 22)

**Tabla 22 Distribución de alelos y Haplotipos de acuerdo al fenotipo de severidad**

Locus 1 Locus 2	Alelo Arg16	Alelo Gly16	Total
Alelo Gln27	Arg16Gln27 92(87%)	Gly16Gln27 14(13%)	106(62%)
Alelo Glu27	Arg16Glu27 32(48%)	Gly16Glu27 34(52%)	66(38%)
Total alelos	124(72%)	48(28%)	172(100%)

#### 6.16.1. **Distribucion Alelo-haplotipo-Fenotipo de no severidad**

Este análisis se realizó para conocer cuál era el alelo y haplotipo más frecuente en este grupo, demostrando así, que más de la mitad de los individuos con asma no severa, tenían el alelo Arg16. En cuanto al haplotipo Arg16Gln27 este fue el más frecuente en comparación con Gly16Glu27 que fue el que presentó menor frecuencia. (Tabla 23)

**Tabla 23 Distribución de alelos y Haplotipos de acuerdo al fenotipo de no severidad**

Locus 1 Locus 2	Alelo Arg16	Alelo Gly16	Total
Alelo Gln27	Arg16 Gln27 50(86%)	Gly16 Gln27 8(14%)	58(54%)
Alelo Glu27	Arg16 Glu27 22(44%)	Gly16 Glu27 28(56%)	50(46%)
Total alelos	72(67%)	36(33%)	108(100%)

## 6.17. Relación haplotipo-Fenotipo

Para analizar el patrón de distribución de los haplotipos de acuerdo a los dos fenotipos severa y no severa, se realizó una tabla incluyendo los 4 haplotipos que eran comunes en la población, pero como se puede observar en la tabla 24, la frecuencia de cada haplotipo fue similar en ambos grupos. Lo que, en otras palabras, indica que no había un patrón de distribución de los haplotipos con respecto a los fenotipos. Esto significa que el haplotipo no tiene capacidad predictiva sobre el fenotipo asmático. Además el valor de p para estos datos estuvo por arriba de 0,05 ( $p=0,57$ ) lo que señaló aun más la falta de relación entre el haplotipos y el fenotipo. Sin embargo, el análisis de la distribución mostró que el haplotipo más frecuente fue Arg16Gln27 en ambos grupos.

Tabla 24 Relación haplotipo-Fenotipo

Fenotipos	Arg16Gln27	Arg16Glu27	Gly16Gln27	Gly16Glu27	Total
Severa	92(53%)	32(19%)	14(8%)	34(20%)	172(100%)
No severa	50(46%)	22(20%)	8(7%)	28(26%)	108(100%)

Valor de  $p=0,57$

### 6.17.1. Distribución Haplotipo-fenotipo en el gen ADR $\beta$ 2

La combinación de los polimorfismos estudiados, encontró que la más frecuente fue Arg16GlyGln27Glu 37% (26/70), proveniente de 13 casos que referían haber tenido asma severa persistente. La distribución de individuos según el diagnóstico para el resto de los Haplotipos se puede observar en la tabla 25.

El valor de estadístico para este análisis fue de 0.97, lo que significó que el Haplotipo no tenía capacidad predictiva sobre el tipo de diagnóstico.

Tabla 25 Distribución de Haplotipos de acuerdo al grado de severidad.

Haplotipos	Severa Persistente	Moderada Persistente	Leve Persistente	Leve intermitente	Total
Arg16ArgGln27Gln	6(9%)	4(6%)	0	0	10(14%)
Arg16ArgGln27Glu	9(13%)	5(7%)	2(4%)	1(1%)	17(24%)
Arg16GlyGln27Glu	13(19%)	6(10%)	4(6%)	2(3%)	25(37%)
Arg16GlyGln27Gln	5(8%)	2(1%)	1(1%)	1(1%)	9(11%)
Arg16ArgGlu27Glu	2(3%)	1(1%)	0	0	3(4%)
Arg16GlyGlu27Glu	3(5%)	0	1(1%)	0	4(6%)
Gly16GlyGln27Glu	1(1%)	1(1%)	0	0	2(2%)
<b>Total</b>	<b>39(56%)</b>	<b>19(27%)</b>	<b>8(11%)</b>	<b>4(6%)</b>	<b>70</b>

Valor de  $p=0.97$



## 7. DISCUSIÓN

De los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el gen ADR $\beta$ 2 (5q31-32) que codifica para el  $\beta$ 2-Adrenoreceptor ha sido el más investigado en estudios genéticos del asma, esto se basa en el hecho de limitar la búsqueda a genes que, como este, estén localizados en áreas cromosómicas ligadas al asma. Cuatro de los nueve polimorfismos reportados para este gen resultan en sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 27, 34 y 164, que con excepción del 34, todos alteran la función del receptor [75]. Al parecer, estos polimorfismos funcionales modifican el fenotipo de la enfermedad. Por lo tanto, se ha propuesto que variaciones en la secuencia de este gen tienen una contribución diferencial en la enfermedad entre las poblaciones y aún entre los individuos [54]; también se ha observado una asociación importante con la respuesta al tratamiento y con la gravedad de la misma [17]. Los polimorfismos del  $\beta$ 2-adrenoreceptor ADR $\beta$ 2, también se ha relacionado con otros fenotipos asociados con la entidad como hiperreactividad bronquial, [66], y tanto el polimorfismo Gly16 como el Gln27 se han relacionado con susceptibilidad al asma [49, 61, 62], sin embargo, otros reportes no han encontrado dicha correlación. Entre tanto, algunos estudios *in vitro* han demostrado que los polimorfismos del ADR $\beta$ 2 pueden alterar el proceso de la transducción de señales de este receptor, evidenciado porque los dos polimorfismos han sido asociados con alteraciones en la expresión del receptor, "Downregulation", o en el desacoplamiento del receptor, en respuesta a los  $\beta$ 2-agonistas del ADR $\beta$ 2[35]. De esta manera, resulta el gran interés de estudiar el gen ADR $\beta$ 2 y sus polimorfismos más frecuentes o alelos silvestres Arg16 y Gln27.

Aunque los hallazgos en este estudio no son estadísticamente significativos, en algunos reportes los homocigotos Gly16 tienen un riesgo mucho mayor de asma nocturna y severidad del asma, comparados con los homocigotos Arg16, mientras que los heterocigotos de Gly16 tienen un riesgo moderado. Sin embargo, se ha estimado que existen discrepancias sustanciales entre los diferentes grupos étnicos. Estas observaciones son consideradas en el meta-análisis de Contopoulos *et al.*, [54], en donde la frecuencia general del alelo Gly16 en sujetos sin asma fue de 54.8% y esto fue más frecuente en descendientes caucásicos que en poblaciones de descendencia asiática (60.7% vs 46%) , encontrando, de esta manera, diferencias en los hallazgos con respecto a la relación de los polimorfismos y la severidad de la enfermedad.

En el estudio actual, se logró obtener el dato del diagnóstico de asma para los 70 pacientes, tomando en cuenta los fenotipos de severidad (leve, moderada y severa), se pudo observar una mayor proporción de pacientes con genotipo heterocigoto u homocigoto para Arg16 entre los fenotipos de mayor severidad, sin que las diferencias hayan sido estadísticamente significativas, esta alta frecuencia homocigotos Arg16 es similar a lo que se reportó en la población de Puerto Rico [69]. Por otro lado, un estudio de adultos en la población Mexicana [68], evaluó la asociación del asma con los polimorfismos del ADR $\beta$ 2, en este estudio se encontró una significativa asociación inversa con Glu27 y el haplotipo Gly16Gly/Glu27Glu; en el género masculino se encontró una asociación positiva entre Gly16 sin Glu27. En las mujeres no se encontró asociación con el haplotipo Gly16Gly/Glu27Glu, y con respecto al asma nocturna se encontró una asociación con el alelo Gly16 [68]. Esto podría indicar solo una coincidencia, y es que los afectados puedan estar presentando los alelos Arg16 y Gln27: uno, el que realmente le esté causando el fenotipo que puede estar en estado homocigoto Arg16Arg y el otro, que puede no estar causando ningún efecto porque está en estado heterocigoto Gln27Glu, y en este caso el polimorfismo solo serviría como un marcador que está indicando que el

fenotipo en los individuos se vea influenciado por la presencia en conjunto de los polimorfismos. Sin embargo, también puede ser el reflejo de una heterogeneidad genética inter e intrapoblacional. De manera que resulta imprescindible realizar estos estudios en cada grupo étnico para identificar los factores genéticos que contribuyen a la enfermedad y aquellos que son compartidos entre las poblaciones, para así conocer a los que son específicos de cada una de ellas. Esta cuestión se planteó debido a que en este estudio también se encontró un mayor número de individuos con asma severa, que portaban en conjunto los alelos Arg16 y Gln27.

Los polimorfismos Gly16 y Glu27 del ADR $\beta$ 2 aquí evaluados, como se discutió anteriormente, pueden presentar interacciones o sinergismo entre diferentes SNPs, debido a que el análisis de haplotipos abre la posibilidad de que el polimorfismo Arg16Gly pueda tener un efecto modificador: se ha observado que el efecto protector de Glu27 puede ser acentuado con Arg16 comparado con Gly16, aunque por sí solo, el polimorfismo en la posición 16 no muestra un efecto independiente. Por ejemplo, cuando está presente Gln27, el riesgo del asma parece ser el mismo sin importar el polimorfismo que esté en la posición 16, pero si es Glu27, el riesgo disminuye y ese descenso es más acentuado al estar presente Arg16. Estos datos hacen aún más difícil el análisis de haplotipos, ya que un polimorfismo puede modificar el efecto que se ve en otro por sí solo [55]. En la muestra de este estudio se observó una mayor proporción de heterocigotos para Glu27 y la mayoría de los individuos que portaban este alelo cursaban con un diagnóstico de asma severa persistente, representando de esta manera cierta contradicción con los estudios *in vitro* y con el estudio de Drysdale *et al.*, [41], sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al grado de severidad y un genotipo en particular.

Para el polimorfismo Gln27Glu según el análisis de thakkestian *et al.*, [55 ], no se ha estimado que cumplan un papel en la severidad de la enfermedad, sin embargo, el alelo Glu27 parece ser un factor protector contra el asma, reduciendo el riesgo aproximadamente en un 27%. Esto tiene sentido biológico porque la variante Glu27 es resistente a la “regulación negativa” *In Vitro* [55, 76] y es posible que estos individuos expresen niveles más elevados del  $\beta_2$ -adrenoreceptor en un contexto de inflamación. Esto se ha sugerido tanto en las poblaciones adultas como en las pediátricas, aunque el modelo genético en cada una es diferente [55]. Sin embargo, el efecto protector de Glu27 puede deberse a su conformación en haplotipo, y no al efecto aislado de su SNP. Esto se planteó en el estudio de Drysdale *et al* [41] quienes investigaron 13 SNPs, en el promotor y en las regiones codificantes del gen del ADR $\beta$ 2 en humanos, en relación con la respuesta a los  $\beta$ -agonistas. Ellos encontraron que, aunque no había asociación cuando los SNPs eran analizados individualmente, había una clara relación entre uno de los haplotipos comunes (en su publicación el haplotipo 2, que incluye Glu27) y una buena respuesta a los  $\beta$ -agonistas *in vivo*, así como un incremento en los niveles del RNAm y en la expresión del gen *in Vitro*; mientras que los haplotipos que incluían Gln27 (como el haplotipo 4 de su publicación) tenían una respuesta más reducida a los  $\beta$ -agonistas y niveles más bajos de expresión del RNAm. Esto crea una hipótesis y es saber si una buena respuesta a los agonistas exógenos también refleja una buena respuesta a los agonistas endógenos y por lo tanto, un efecto protector contra el asma [41, 55].

Algunos estudios poblacionales que realizan el screening del gen ADR $\beta$ 2, excluyen la región promotora y solo analizan la región codificante. De hecho, se debe resaltar que la región promotora juega un papel importante en la regulación de la expresión de un gen. Está establecido también que alteraciones en la región reguladora, pueden interrumpir el

proceso normal de activación e iniciación transcripcional de un gen, ya que pueden actuar incrementando o disminuyendo el nivel de mRNA y por lo tanto el producto génico sintetizado. Esto se toma en cuenta ya que se ha encontrado que el polimorfismo Arg19Cys en la región promotora, se ha relacionado con una disminución de la expresión del receptor; por ende, esta variante genética podría estar presente con una mayor frecuencia en determinadas poblaciones, de ahí la necesidad de poder secuenciar la totalidad de este gen en un número representativo de individuos afectados [41, 44].

De esta manera, para analizar la correlación de los polimorfismos Gly16 y Glu27, el desequilibrio de ligamiento, en un estudio de casos y controles, puede llevar a una asociación aparente entre un alelo y una enfermedad, en este caso, podría ser que aunque el alelo no tenga una implicación funcional con la enfermedad, es probable que el alelo asociado esté en desequilibrio de ligamiento con otro situado en un locus cercano que sí está funcionalmente implicado. En este estudio, una de las finalidades fue encontrar una variante alélica que contribuyera a la enfermedad, pero aunque los datos no mostraron ninguna correlación, si la asociación hubiera sido positiva entre la enfermedad y un único alelo dentro del bloque de desequilibrio de ligamiento, esto nos habría señalado de manera informativa que la región del genoma situada en el bloque es la que contiene el alelo asociado con la enfermedad. Por lo tanto, esa región constituirá el lugar donde buscar la variante alélica que sí está implicada funcionalmente en el proceso mismo de la enfermedad. Cabe aclarar que estos resultados pudieron darse así, ya que no se evaluaron otros polimorfismos en el gen, que puedan estar alterando la interacción de estas variantes de secuencia y otras ubicadas dentro del gen, por lo cual, no se puede descartar la participación de los mismos en la susceptibilidad a la enfermedad. Todos estos hallazgos muestran un panorama de lo difícil que es establecer un panel de los polimorfismos en Colombia, al menos para los asmáticos, porque aún no se han identificado las variantes más frecuentes para el gen ADR $\beta$ 2 [57].

Los datos reportados en este estudio no son del todo similares a los encontrados en el Longitudinal Normative Aging Study Cohort [63], donde el haplotipo Gly16/Gln27 tenía un efecto protector comparado con Arg16/Glu27, pero en el estudio actual los adultos con asma severa presentaron una baja frecuencia del haplotipo Arg16/Glu27, sin llegar a ser significativo en comparación con el grupo control, ni tener asociación fuerte con la entidad. Esto puede ser por el tamaño de la muestra con la clasificación en la mayoría con el fenotipo de severidad, lo que dificulta la conclusión sobre si hay o no un haplotipo protector y alguno que predisponga a la enfermedad. En cuanto al estudio de Litonjua *et al* [63], tal interpretación del efecto de Arg16/Glu27 pudo deberse a que los resultados se dieron en pacientes con hiperreactividad de la vía aérea, la cual no siempre corresponde a asma, y que la población fue seleccionada con una prueba de metacolina, y asmáticos no diagnosticados mediante espirometría y criterios clínicos [55].

En vista de la alta frecuencia del alelo Gln27, en este estudio se tomó en cuenta el estudio latinoamericano mixto (México y Puerto Rico), en donde se quería evaluar la respuesta al albuterol y determinar si se encontraban diferencias entre las dos poblaciones, pero en relación con el polimorfismo Gln27Glu, ellos encontraron que en la población de asmáticos mexicanos había una mayor proporción para Gln27 y pocos con Glu27 (17.8%), contrario a lo que ocurrió en la población de Puerto Rico, en donde la frecuencia para Glu27 fue mayor (26.5%) en contraste con Gln27. Todo esto puede ser debido a que la distribución de algunos polimorfismos puede variar dependiendo del origen étnico de



las poblaciones y dada la diversidad en la composición racial que caracteriza a cada población. Otro dato interesante del estudio de Mexicanos y Puertorriqueños [69] es que la población de asmáticos Mexicanos tenía un menor número de afectados con asma moderada /severa (30.8%), con respecto a los Puertorriqueños (40.5%), por lo cual no se puede descartar que la diferencia se estuviera dando por el número de asmáticos con mayor severidad, lo que podría indicar una correlación de dicho fenotipo y la distribución de frecuencias encontradas en estas poblaciones para el alelo Glu27.

En Colombia, en la ciudad de Pereira [56], se determinó la distribución de las frecuencias de los polimorfismos Gly16 y Glu27 en niños asmáticos y su correlación con la severidad de la enfermedad, encontrando diferencias en las frecuencias del polimorfismo Gln27Glu, con una menor frecuencia del alelo Glu27 y una alta frecuencia de homocigotos para Gln27Gln. Estos datos señalan una similitud en relación con este estudio, debido a que el alelo y homocigotos para Glu27 fue menor en comparación con la variante Gln27. En la ciudad de Bogotá [58], otro estudio tenía como objetivo identificar los polimorfismos del  $\beta$ 2-adrenoreceptor en una población de pacientes pediátricos con asma y controles sanos; este estudio mostró un mayor número de pacientes con asma moderada persistente, que presentaban el polimorfismo Gly16, sin embargo este dato no fue significativo. Los datos de este estudio fueron semejantes a los resultados que se encontraron en el trabajo antes mencionado, ya que la variante Gly16 estuvo presente en algunos individuos con asma moderada persistente. En los anteriores estudios mencionados, en cuanto al análisis de haplotipos y su correlación con la severidad del asma, no se encontró ninguna asociación. En referencia a estos hallazgos, se toma en cuenta que el asma de la niñez y de la adultez no se relaciona en sí, debido a que el asma es una enfermedad clínicamente diferente en estas dos poblaciones, por ejemplo la naturaleza de la entidad en los niños muestra una enfermedad de tipo atópico, eosinofílica, episódica, que no se asocia con hiperreactividad de la vía aérea, por lo tanto, el polimorfismo Glu27, asociado con menor hiperreactividad, puede no tener una implicación en estudios de niños [29, 31], de esta manera, en el estudio de Agudelo *et al.*, [56], donde la frecuencia de Glu27 fue menor, se toma en cuenta que el polimorfismo Glu27 se ha asociado con una menor hiperreactividad de las vías respiratorias en adultos [55]. Esto puede explicar las diferencias entre las asociaciones de niños y adultos. Alternativamente, dado que la patogénesis del asma no está completamente comprendida, podría existir un efecto pleiotrópico del receptor  $\beta$ 2 a lo largo de los diferentes estados o etiologías de la enfermedad. De hecho, se ha observado dicha asociación edad-específica de otro gen candidato en una población de niños monitoreados desde la niñez hasta la adultez temprana [87]. Una explicación alternativa a estos resultados es que los efectos de las variantes genéticas dependen de otros factores cuya frecuencia y distribución varía tanto en individuos como entre poblaciones, además el momento clínico de los asmáticos pediátricos en comparación con los adultos, difiere en el origen etiológico de la enfermedad [96]. Pero en cuanto a la variación en el grado de severidad entre estos individuos, se puede sugerir que la misma variante génica esté causando fenotipos diferentes, aunque también puede estar siendo influenciado por el contenido genético de cada individuo. En los datos de este estudio se encontró que había una frecuencia superior de afectados con el haplotipo Arg16GlyGln27Glu, dentro del grupo de pacientes con asma severa persistente (37%), pero sin evidenciarse una diferencia estadísticamente significativa, esto no quiere decir que no pueda haber desequilibrio con otros SNP's no evaluados, que influyan más en la presentación de la enfermedad o de la severidad.

En este estudio, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) pudo haberse dado principalmente por factores como: la migración (flujo genético), selección y mutación [98]. En este hecho se toma en cuenta que Colombia se caracteriza por ser el resultado de la mezcla de tres grupos principales: indígenas, españoles y africanos, a los que se le sumaron importantes grupos de inmigrantes provenientes de otros países europeos y de Oriente Medio. Como consecuencia de esto, Colombia ha sido uno de los países latinoamericanos con mayores consecuencias socioculturales generadas por la llegada de los conquistadores españoles en 1492, hecho que produjo un mestizaje entre diferentes etnias, el cual se prolonga desde la época de la Conquista y la Colonia (siglos XVI al XIX) con importantes variaciones regionales hasta hoy día [95][97]. Entonces para contextualizar el término “mezcla” se debe considerar que es la unión de dos poblaciones genéticamente diferentes. De manera que en nuestro caso, la variante Arg16Gly se pudo haber generado por dos grupos hipotéticos, uno formado exclusivamente por individuos homocigotos Arg16Arg y el otro por homocigotos Gly16Gly, lo que significó un cambio importante en la relación con cada uno de los grupos iniciales. El problema para la aplicación de este planteamiento es que en la actualidad el único dato con el que se cuenta es la frecuencia del gen en la población Mestiza, mientras que las frecuencias de las poblaciones bases (española, indígena, africana) son obtenidas de la literatura o de bases de datos, aceptando, así, que son iguales o similares a las existentes cuando ocurrió la mezcla génica.

Por consiguiente, señalando que el desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se haya dado por la gran variabilidad poblacional en nuestro país, debemos considerar también que la baja frecuencia de los homocigotos Gly16Gly y Glu27Glu encontrados en este estudio, se deban a una desventaja adaptativa de los individuos de esta población, mientras que el mayor número de heterocigotos Arg16Gly podrían permitir conservar la diversidad genética (Genotipos o polimorfismos) en la población, debido a que podrían tener una mejor adaptación a las condiciones ambientales. Con respecto a los pacientes, se podría pensar que el asma no solo estaría asociada a la condición heterocigota de los genotipos ArgGly16 y GlnGlu27 de manera independiente sino más probablemente al haplotipo que los incluye a los dos Gly16/Glu27. Esto se deduce debido a que los resultados de este estudio mostraron una alta frecuencia del haplotipo Gly16/Glu27, en los individuos con asma.

Una posibilidad alterna para comprender la falta de equilibrio de Hardy-Weinberg es que las variantes del gen ADR $\beta$ 2 atraviesen un barrido selectivo, en donde la selección positiva y balanceante se inicia por la distribución en la población de los alelos recientemente seleccionados y se mantiene así hasta su fijación o hasta que sean seleccionados [98]. Sumado a esto, como el gen ADR $\beta$ 2 tiene un proceso evolutivo dinámico, se hace difícil determinar su régimen selectivo fundamental [99].

Las variantes polimórficas de los genes ADR $\beta$  han sido asociadas con tres condiciones muy frecuentes: asma, obesidad e hipertensión, enfermedades que se han ido difundiendo en las poblaciones humanas probablemente porque los alelos Gly16 y Glu27 son susceptibles a los cambios ambientales y al estilo de vida [99].

Por otro lado, en este estudio se tomó en cuenta la variable relacionada con los antecedentes familiares para el asma, que mostró que al menos un miembro de la familia, tomando en cuenta solo hermanos, padres e hijos con asma diagnosticada, se presentó en la mayoría de los casos. Dentro de este marco, los estudios de segregación familiar del asma han demostrado que no es un solo gen el responsable de la expresión de la enfermedad, pero algunos estudios también toman en cuenta que la enfermedad

muestra una marcada variabilidad fenotípica, sugiriendo una heterogeneidad etiológica y fuertes influencias ambientales que pueden influir considerablemente en la penetrancia de los genes del "asma". Sin embargo, hay nueva y fuerte evidencia que sugiere que así como en el caso de las interacciones gen-por-gen y gen-por-ambiente, los efectos genéticos sobre el riesgo de esta enfermedad podrían variar en magnitud, e incluso en dirección, con la edad y el estadio de la enfermedad [18].

Destacando otra cuestión, en la actualidad se conoce que cada paciente responde de forma diferente a la misma medicación. Estas diferencias generalmente son más grandes entre los individuos de una población que en una misma persona en diferentes épocas, además las grandes diferencias poblacionales con pequeña variabilidad entre cada paciente es coherente con que la herencia es determinante en la respuesta a un medicamento; de esta manera, se estima que la genética es responsable en parte de la variabilidad en la disposición y efecto de un medicamento. Aunque otros factores monogénicos como la edad, la función del organismo, la terapia concomitante, la interacción de los medicamentos y la naturaleza de la enfermedad influyen en el efecto de una medicación, actualmente existen muchos ejemplos de casos en los cuales se sabe que las diferencias que existen entre individuos en cuanto a la respuesta a un medicamento, se deben a variaciones en la secuencia de los genes que codifican para sus sitios diana, que a diferencia de otros factores que influyen en la respuesta a un medicamento, los que son determinados genéticamente, generalmente se mantienen estables a través de la vida del individuo [76]. En este sentido, el  $\beta_2$ -adrenoreceptor codificado por el gen ADR $\beta_2$  ilustra un enlace entre un polimorfismo genético, los sitios diana de un medicamento y su respuesta clínica. Sin embargo, cuando los elementos claves de los sistemas biológicos difieren en cada individuo y cada población, ellos pueden impactar las relaciones gen-enfermedad de forma diferente en cada individuo, influenciando la validez y el poder de replicación de los estudios genéticos. Es así que cuando se considera un criterio de concordancia de los reportes positivos y negativos, en la dirección de las asociaciones genéticas, los polimorfismos/haplotipos específicos ligados con la respuesta del receptor son discrepantes [18].

Tomando en cuenta lo anterior en cuanto a los estudios fármacogenéticos, ninguno ha identificado una relación entre las variantes de la posición 27 y las manifestaciones clínicas durante el tratamiento a largo plazo con  $\beta_2$ -agonistas. Pero se ha estimado, en consenso con algunos estudios clínicos, que la administración a largo plazo de medicamentos  $\beta_2$ -agonistas de acción corta está consistentemente asociada con la respuesta adversa en pacientes con el genotipo Arg16Arg. Para los  $\beta_2$ -agonistas de larga acción, los hallazgos son persuasivos pero no definitivos [76]. En el estudio actual, la mayoría de los pacientes reportaron el tratamiento que estaban manejando, coincidiendo con lo comentado anteriormente con el uso de  $\beta$ -agonistas de corta acción 61(35%) y los resultados en su genotipo en la mayoría de ellos fue Arg16Arg. Queda en adelante evaluar la respuesta de estos pacientes, en particular los homocigotos Arg16, para poder establecer si las alteraciones intrínsecas de los receptores conllevan a que un paciente no responda bien al tratamiento, porque ya ha sido claramente reconocido como un marcador del control de la enfermedad [76].

Una cuestión por establecer, es saber si el estrato socioeconómico es sensible a causar errores en la estratificación de la población, esto se tomó en cuenta, debido a que el estrato 1y 2, en este trabajo, presentó un valor significativo con respecto a los controles, adicionalmente los pacientes reportaron en su mayoría asma severa. Sin embargo, esta

información aunque se presenta como un factor en la población colombiana, debe ser ampliada y estudiada con más detalle para analizar específicamente este factor, porque aunque nuestros datos muestran una relación, no son definitivos para llegar a conclusiones que permitan hacer recomendaciones orientadas hacia el nivel de vida adecuado para los pacientes con asma. Sin embargo, consensos internacionales como el de GINA [1] sugieren que los factores sociales y económicos deben de integrarse para entender el asma y su manejo. De este modo, hay razones para creer que la carga substancial del asma se puede reducir a través del esfuerzo compartido entre los pacientes, las organizaciones para el cuidado de la salud y los gobiernos, para mejorar el control. Porque aunque el costo de controlar la enfermedad parece alto, el costo de no tratarla correctamente es más alto [1]. En cuanto a las variantes genéticas, se podría señalar que podrían depender también de otros factores, cuya frecuencia y distribución varía tanto en individuos como entre poblaciones y de esta manera, considerar si el efecto genético en una enfermedad es homogéneo en todas las poblaciones (grupos étnicos) o es diferente según la población.

Además, a esto también se le suma la falta de investigación del gen  $ADR\beta 2$  en Colombia y su asociación con el asma, porque otros estudios en este caso servirían para tomar en cuenta metodologías o poder tener más perfiles de contraste, para poder cuestionar si el efecto genético en el riesgo de una enfermedad es homogéneo entre las diferentes poblaciones; pero esta suposición quizás no sea fiable para el estudio de las variantes genéticas del gen  $ADR\beta 2$  y sus polimorfismos Gly16 y Glu27, porque sería como plantear un modelo estadístico o lineal, en el cual la secuencia de ADN se asocia con el riesgo de la enfermedad, pero no tomaría en cuenta la influencia tanto de los sistemas biológicos como de los factores ambientales que interactúan dentro de un momento específico en el desarrollo del asma. De hecho, en un modelo lineal simple el éxito en detectar una asociación positiva entre una variante genética y la severidad del asma es posible solo si el gen “correcto” es probado frente al fenotipo “correcto”, pero en una enfermedad multifactorial como el asma esto es un asunto trivial para su investigación. Esta será una tarea desafiante, en estudios de asociación, porque la exposición ambiental no está controlada por los investigadores, además esta puede cambiar drásticamente en el tiempo y el espacio, y es altamente sensible a causar confusión [18].

#### 7.1. ***Frecuencias alélicas y genotípicas del gen $ADR\beta 2$ en otras poblaciones y su asociación con el asma.***

Al analizar la distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas en otras poblaciones que también han estudiado la asociación de los polimorfismos **Arg16Gly** y **Gln27Glu** con el asma, se encontró que hay discrepancia entre los datos obtenidos de este estudio y otras de Latinoamérica (México, Pereira, Bogotá, Venezuela ), en algunos ejemplos citados, se demuestra que las frecuencias relativas de estos polimorfismos son iguales en los individuos con asma y el grupo control. Sin embargo, en los asmáticos la variante genética sí puede modificar las manifestaciones clínicas de la entidad asmática. En esta tabla (25) se observa que en nuestro país los dos estudios que se han hecho hasta ahora han incluido niños, en donde la etiología de la enfermedad es a veces diferente en relación con la del adulto.

La muestra de pacientes y controles analizada para el polimorfismo Arg16Gly no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. No obstante, las frecuencias alélicas de los

casos y controles están cercanos a los hallados en la población de Pereira [97]. Por otro lado, debemos señalar que este polimorfismo es bastante sencillo de determinar y la posibilidad de error de asignación de alelos es muy baja, ya que la resolución no genera solapamientos de bandas.

Otro punto de vista a resaltar es la diferencia de hallazgos en cada población, por ejemplo, en la población Venezolana se observa un efecto de protección del alelo Arg16, en cambio en otras poblaciones en el mundo se ha encontrado una gran susceptibilidad de este alelo con el desarrollo de la enfermedad.

**Tabla 26 Relación de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu y el asma en otras poblaciones de América latina**

<b>Población América latina</b>	<b>Frecuencia Alelo Arg16 asma vs control</b>	<b>Polimorfismos del ADR<math>\beta</math>2</b>	<b>Hallazgos</b>
México, Santillán <i>et al.</i> , [68]	45% vs 43%	Haplotipo: Gly16 /Glu27 Alelo: Glu27	En los adultos mexicanos con asma, se reportó que el alelo Glu27 tenía un efecto protector.
Larocca Venezuela <i>et al.</i> , [59]	28,6% vs 47%,	Haplotipo:Arg16/Gln27Glu	Mayor frecuencia en el grupo de asmáticos
		Arg/Gly y Gln/Glu	Una mejor respuesta al uso del broncodilatador se asoció con estos Genotipos.
		Homocigotos: Arg16	Se encontró con más frecuencia a lo descrito en otras poblaciones (factor de protección en la aparición del asma)
Bogotá,[58]	42% vs 42%	Haplotipo: Arg/Gln/Thr	El polimorfismo Gly16 se presentó con mayor frecuencia en individuos con asma moderada.
Bogotá, estudio actual(adultos)	71%vs70%	Haplotipo: Gly16Glu27	Este Haplotipo se encontró con mayor frecuencia en individuos con asma, adicionalmente tuvo una asociación positiva con la entidad
México y Puerto Rico( Familias) Choudhry <i>et al.</i> [69]	45,2% del alelo Arg16 para los Puertorriqueños. 42,1% del alelo Arg16 para los Mexicanos	Homocigotos: Arg16 Haplotipo: Arg16/Gln27	Entre los Puertorriqueños los homocigotos para Arg 16 y los que tenían el haplotipo Arg16/Gln27 se asociaron con una mayor respuesta al uso del broncodilatador, pero entre los mexicanos con asma no hubo esta asociación.
Pereira, [56]	No se reportó la frecuencia alélica.	Arg16Arg: Asmáticos (33,56); Población general (27,2%) Gly16Gly: Asmáticos (27,3%); Población general (35%) Gln27Gln: Asmáticos (68%) Población general (71%) Glu27Glu: Asmáticos (4%)	En esta población la frecuencia de Arg16Arg se relacionó con mayores efectos adversos al uso de broncodilatadores de corta acción.

		Población general:(4%)	
--	--	------------------------	--

## 8. CONCLUSIONES

- » Las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismo Arg16Gly y Gln27Glu detectadas en este análisis, no fueron estadísticamente significativas entre casos y controles.
- » Los resultados de este estudio identificaron un efecto de susceptibilidad de los alelos Gly16 y Glu27, como parte de un haplotipo, OR: 1.69 (IC 95%: [1.04; 2.7]) Valor de  $p=0,011$ . Esto justifica futuras investigaciones en estudios más amplios y en otras poblaciones.
- » Los polimorfismos analizados en este trabajo no presentaron asociación con el grado de severidad de los pacientes.
- » Los valores de las frecuencias alélicas de este estudio, fueron cercanos a los reportados en otra población de Colombia.
- » Estos resultados apoyan el papel de estos polimorfismos en la susceptibilidad al desarrollo del asma.

## 9. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Teniendo en cuenta que los estimados de ancestralidad poblacional varían de una región a otra, sería necesario crear una base de datos con la participación de más estudios que reporten las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas en diferentes poblaciones, para así poder realizar mejores inferencias sobre el impacto en la susceptibilidad de estos polimorfismos con el asma. De acuerdo con esto, para alcanzar una mejor caracterización genética del  $\beta_2$ -adrenoreceptor en nuestro país, deberían plantearse las siguientes metas:

Estandarizar las definiciones utilizadas para los fenotipos de asma, para así dar una mayor validez y claridad de los estudios.

Ampliar el número de individuos a estudiar para establecer una frecuencia más certera de las variantes Arg16Gly y Gln27Glu en la ciudad de Bogotá.

Diseñar otros estudios de asociación genética en donde se pueda controlar la participación de pacientes con diferente estrato social.

Ampliar los estudios de estos polimorfismos en otros hospitales del país y evaluar su aplicación clínica.

Evaluar las interacciones gen-ambiente (Respuesta al broncodilatador).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bateman, E.D., et al., Guía de bolsillo para el manejo y prevención del asma (GINA). Global initiative for Asthma, ed. G.d.b.d.a.e.y. médicos. 2010: Global initiative for Asthma
2. Lai, C.K.W., et al., Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 2009. **64**(6): . 476-483.
3. ASMAIRE, Programa de Atención Integral y Educación del paciente con Asma de la Fundación Neumológica, F.N. Colombiana, Editor. 2008.
4. Ioannidis, J.P.A., et al., Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*, 2001. **29**(3): 306-309.
5. Weiss, L.A., et al., The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet*, 2006. **38**(2): 218-222.
6. Tulic, M.K., et al., Modification of the Inflammatory Response to Allergen Challenge after Exposure to Bacterial Lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2000. **22**(5): p. 604-612.
7. Reihnsaus, E., et al., Mutations in the Gene Encoding for the {beta}2-adrenergic Receptor in Normal and Asthmatic Subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1993. **8**(3): 334-339.
8. Green, S., et al., Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1995. **13**(1): p. 25-33.
9. Bossé, Y. and T.J. Hudson, Toward a Comprehensive Set of Asthma Susceptibility Genes. *Annual Review of Medicine*, 2007. **58**(1): 171-184.
10. Ober, C. and S. Hoffjan, Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*, 2006. **7**(2): 95-100.
11. Van Eerdewegh, P., et al., Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 2002. **418**(6896): . 426-430.
12. Simpson, A. and A. Custovic, Pets and the development of allergic sensitization. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2005. **5**(3): 212-220.
13. Dalvi, M.S., M. Halonen, and A. Tucson, A Polymorphism in TLR2 (-16934 A→T) Influences TLR2 Surface Expression on Human Monocytes. *Proc. Am. Thorac. Soc.* , 2005. **2**:**A736**
14. Koppelman, G.H., et al., Association of a Promoter Polymorphism of the CD14 Gene and Atopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001. **163**(4): 965-969.
15. Sengler, C., et al., Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. *Clinical & Experimental Allergy*, 2003. **33**(2): 166-169.
16. Ober, C., et al., A Second-Generation Genomewide Screen for Asthma-Susceptibility Alleles in a Founder Population. *American Journal of Human Genetics*, 2000. **67**(5): 1154-1162.
17. Hoffjan, S., D. Nicolae, and C. Ober, Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory Research*, 2003. **4**(1): 14.
18. Guerra, S. and F.D. Martinez, Asthma Genetics: From Linear to Multifactorial Approaches. *Annual Review of Medicine*, 2008. **59**(1): 327-341.
19. Andrews, A.-L., et al., IL-4 Receptor  $\alpha$  Is an Important Modulator of IL-4 and IL-13 Receptor Binding: Implications for the Development of Therapeutic Targets. *The Journal of Immunology*, 2006. **176**(12): 7456-7461.



20. Jacoby, D.B., R.M. Costello, and A.D. Fryer, Eosinophil recruitment to the airway nerves. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2001. **107**(2): 211-218.
21. Wiggs, B.R., et al., A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 1992. **145**(6): 1251-8.
22. Shimura, S., et al., Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J*, 1996. **9**(7): 1395-401.
23. Valdar, W., et al., Genetic and Environmental Effects on Complex Traits in Mice. *Genetics*, 2006. **174**(2): 959-984.
24. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, Inflammatory Mediators of Asthma: An Update. *Pharmacological Reviews*, 1998. **50**(4): 515-596.
25. Wynn, T.A., IL-13 EFFECTOR FUNCTIONS\*. *Annual Review of Immunology*, 2003. **21**(1): 425-456.
26. Puddicombe, S.M., et al., Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma. *The FASEB Journal*, 2000. **14**(10): 1362-1374.
27. Shapiro, S.D. and C.A. Owen, ADAM-33 Surfaces as an Asthma Gene. *New England Journal of Medicine*, 2002. **347**(12):936-938.
28. Erzurum, S.C., Inhibition of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  for Refractory Asthma. *New England Journal of Medicine*, 2006. **354**(7): 754-758.
29. Deshpande, D., et al., Arrest in regulation of G protein-coupled receptor signaling and function in airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2007. **175**(A662).
30. Billington, C. and R. Penn, Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 2003. **4**(1): p. 2.
31. Amrani, Y. and R.A. Panettieri, Airway smooth muscle: contraction and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003. **35**(3): 272-276.
32. Gosens, R., et al., Muscarinic M3-Receptors Mediate Cholinergic Synergism of Mitogenesis in Airway Smooth Muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003. **28**(2): 257-262.
33. Holgate, S.T., ed. Inflammatory Mechanisms of Asthma. University of Southampton, UK, ed. Abcam. 2010
34. Johnson, M., Molecular mechanisms of  $\beta$ 2-adrenergic receptor function, response, and regulation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2006. **117**(1):18-24.
35. McGraw, D.W. and S.B. Liggett, Molecular Mechanisms of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Function and Regulation. *Proc Am Thorac Soc*, 2005. **2**(4): 292-296.
36. Groneberg, D.A., K.F. Rabe, and A. Fischer, Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: Vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *European Journal of Pharmacology*, 2006. **533**(1-3): 182-194.
37. Deshpande, D.A. and R.B. Penn, Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cellular Signalling*, 2006. **18**(12): 2105-2120.
38. Xie, H.G., et al., Frequency of functionally important beta-2 adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics*, 1999. **9**(4): 511-6.
39. Weir, T.D., et al., beta 2-Adrenergic Receptor Haplotypes in Mild, Moderate and Fatal/Near Fatal Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998. **158**(3): 787-791.
40. Holgate, S.T., Epithelium dysfunction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2007. **120**(6): 1233-1244.
41. Drysdale, C.M., et al., Complex promoter and coding region  $\beta$ 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(19):10483-10488.

42. Guerra, S., et al., The Differential Effect of Genetic Variation on Soluble CD14 Levels in Human Plasma and Milk. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2004. **52**(3): 204-211.
43. Kroymann, J. and T. Mitchell-Olds, Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature*, 2005. **435**(7038): 95-98.
44. Hawkins, G.A., et al., Sequence, Haplotype, and Association Analysis of ADRbeta2 in a Multiethnic Asthma Case-Control Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006. **174**(10): 1101-1109.
45. Reihnsaus, E., et al., Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993. **8**(3): 334-9.
46. Zhang, J., P. Pare, and A. Sandford, Recent advances in asthma genetics. *Respiratory Research*, 2008. **9**(1): p. 4.
47. Weir, T.D., et al., beta2-Adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(3): p. 787-91.
48. Hopes, E., et al., Association of glutamine 27 polymorphism of beta 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study. *Bmj*, 1998. **316**(7132): 664.
49. Holloway, J.W., et al., Association of beta2-adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(8): 1097-103.
50. Shachor, J., et al., Genetic polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor in Israelis with severe asthma compared to non-asthmatic Israelis. *Isr Med Assoc J*, 2003. **5**(11): 821-4.
51. Santillan, A.A., et al., Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(6):1095-100.
52. Turki, J., et al., Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest*, 1995. **95**(4): 1635-41.
53. Migita, O., et al., ADRB2 polymorphisms and asthma susceptibility: transmission disequilibrium test and meta-analysis. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004. **134**(2): 150-7.
54. Contopoulos-Ioannidis, D.G., E.N. Manoli, and J.P.A. Ioannidis, Meta-analysis of the association of  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2005. **115**(5): 963-972.
55. Thakkinstian, A., et al., Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between  $\beta$ 2-Adrenoceptor Polymorphisms and Asthma: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, 2005. **162**(3): 201-211.
56. Agudelo, V., et al., Prevalencia de polimorfismos del gen beta 2-adrenergico en menores asmáticos y no asmáticos y asociación con la severidad de la enfermedad. *Neumología Pediátrica*, 2008. **3**(1): 106.
57. Dennis, R., et al., Prevalencia de asma en niños de la ciudad de Bogotá ¿está aumentando su frecuencia?, in VIII Congreso Latinoamericano de Neumología Pediátrica y XII Congreso Latinoamericano de Fibrosis Quística, N. pediátrica, Editor. 2010, Sociedad chilena de neumología pediátrica: Cartagena. Colombia. p. 10.
58. Rubio Gómez, C., Análisis de polimorfismos genéticos del receptor beta-2 adrenérgico en pacientes pediátricos asmáticos y controles sanos en una muestra de la ciudad de Bogotá, in Maestría en Ciencias con Énfasis en Genética Humana. 2010, Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario: Bogotá.

59. Larocca, N.E., et al., Role of Beta2 Agonists in Respiratory Medicine with Particular Attention to Novel Patents and Effects on Endocrine System and Immune Response. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2011. **24**: 24.
60. Yotova, V., et al., Tracing genetic history of modern humans using X-chromosome lineages. *Human Genetics*, 2007. **122**(5): 431-443.
61. Gao, G., S. Wang, and J. Zhang, Study on beta 2 adrenergic receptor genetic polymorphisms in asthmatics in the people of the Han nationality of northern China. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2000. **23**(2): 93-7.
62. Hopes, E., et al., Association of glutamine 27 polymorphism of  $\beta$ 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study. *BMJ*, 1998. **316**(7132): 664.
63. Litonjua, A.A., et al.,  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Polymorphisms and Haplotypes Are Associated With Airways Hyperresponsiveness Among Nonsmoking Men\*. *Chest*, 2004. **126**(1): 66-74.
64. Dewar, et al.,  $\beta$ 2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population. *Clinical & Experimental Allergy*, 1998. **28**(4): 442-448.
65. Hall, I.P., et al., Association of Glu 27  $\beta$ 2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *The Lancet*, 1995. **345**(8959): 1213-1214.
66. Meyers, D.A., et al., Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: Interactions with passive smoke exposure. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2005. **115**(6): 1169-1175.
67. Palmer, C.N.A., et al., Arginine-16  $\beta$ 2 adrenoceptor genotype predisposes to exacerbations in young asthmatics taking regular salmeterol. *Thorax*, 2006. **61**(11): 940-944.
68. Santillan, A.A., et al., Association between  $\beta$ 2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2003. **112**(6): 1095-1100.
69. Choudhry, S., et al., Pharmacogenetic Differences in Response to Albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005. **171**(6): 563-570.
70. Matheson, M.C., et al., [beta]2-adrenergic receptor polymorphisms are associated with asthma and COPD in adults. *J Hum Genet*, 2006. **51**(11): 943-951.
71. Levin, M.C., et al., The Myocardium-protective Gly-49 Variant of the  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor Exhibits Constitutive Activity and Increased Desensitization and Down-regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(34): 30429-30435.
72. Dishy, V., et al., The Effect of Common Polymorphisms of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor on Agonist-Mediated Vascular Desensitization. *New England Journal of Medicine*, 2001. **345**(14): 1030-1035.
73. Penn, R.B., A.N. Pronin, and J.L. Benovic, Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2000. **10**(2): 81-89.
74. Penn, R.B., et al., Arrestin Specificity for G Protein-coupled Receptors in Human Airway Smooth Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(35): 32648-32656.
75. Liggett, S.B., Polymorphisms of the beta 2-Adrenergic Receptor and Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997. **156**(4): S156-162.
76. Taylor, D., Pharmacogenetics of beta2-agonist drugs in asthma. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2006. **31**(2): 247-258.
77. Chong, L.K., et al., Influence of genetic polymorphisms in the [beta]2-adrenoceptor on desensitization in human lung mast cells. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2000. **10**(2):153-162.

78. Moore, P.E., et al., Polymorphism of the {beta}2-Adrenergic Receptor Gene and Desensitization in Human Airway Smooth Muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000. **162**(6): 2117-2124.
79. Taylor, D.R., et al., Asthma exacerbations during long term  $\beta$  agonist use: influence of  $\beta$ 2 adrenoceptor polymorphism. *Thorax*, 2000. **55**(9): 762-767.
80. Small, K.M., D.W. McGraw, and S.B. Liggett, Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2003. **43**(1): 381-411.
81. Martinez, F.D., et al., Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997. **100**(12): 3184-3188.
82. Lima, J.J., et al., Impact of genetic polymorphisms of the [beta]2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics[ast]. *Clin Pharmacol Ther*, 1999. **65**(5): 519-525.
83. Israel, E., et al., Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *The Lancet*, 2004. **364**(9444): 1505-1512.
84. Israel, E., et al., The Effect of Polymorphisms of the beta 2-Adrenergic Receptor on the Response to Regular Use of Albuterol in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000. **162**(1): 75-80.
85. Sears, M.R., et al., Regular inhaled [beta]-agonist treatment in bronchial asthma [see comments]. *Lancet*, 1990. **336**: 1391-1396.
86. Hancox, R.J., M.R. Sears, and D.R. Taylor, Polymorphism of the [beta]2-adrenoceptor and the response to long-term beta2-agonist therapy in asthma. *Eur Respir J*, 1998. **11**: 589-593.
87. Weiss, S.T., et al., Overview of the pharmacogenetics of asthma treatment. *Pharmacogenomics J*, 2006. **6**(5): 311-326.
88. Tan, S., et al., Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics [see comments]. *Lancet*, 1997. **350**: 995-999.
89. CNCA, C.N.C.d.A., Guías para diagnóstico y manejo del asma, in Revista colombiana de neumología. 2003.
90. Bhakthavalsala, S., Paediatrics. 2008: Mosby.
91. Gao, J.M., et al., Association of polymorphism of human beta 2-adrenergic receptor gene and bronchial asthma. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2002. **24**(6): 626-31.
92. Global Initiative for Asthma (GINA). 2002; Available from: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com).
93. Martinez, F.D., et al., Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest*, 1997. **100**(12): 3184-8.
94. Isaza, M.C., et al., Polimorfismo beta-2 adrenérgico en mestizos colombianos y respuestas de la variante alélica Gln27Glu al propranolol. *Revista MEDICINA*, 2004. **26**(2): 108-114.
95. Maxwell, T.J., et al., Beta-2 adrenergic receptor genotypes and haplotypes in different ethnic groups. *Int J Mol Med*, 2005. **16**(4): 573-80.
96. O'Donnell, A.R., et al., Age-specific Relationship between CD14 and Atopy in a Cohort Assessed from Age 8 to 25 Years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2004. **169**(5): 615-622.
97. Yunis, J.J., E.J. Yunis, and E. Yunis, Genetic relationship of the Guambino, Paez, and Ingano Amerindians of Southwest Colombia using major histocompatibility

- complex class II haplotypes and blood groups. *Human Immunology*, 2001. **62**(9): 970-978.
98. Nussbaum, R.L., THOMPSON & THOMPSON. *Genética en medicina + Student Consult*, 7a ed. 2008: MASSON.
99. Cagliani, R., et al., Diverse Evolutionary Histories for  $\beta$ -adrenoreceptor Genes in Humans. *American Journal of Human Genetics*, 2009. **85**(1): 64-75.

## 11. ANEXOS

### 11.1. *Anexo 1. Manual de Códigos*

#### MANUAL DE CODIGOS

proyecto: polimorfismos de adrb2 en asma

##### Genotipos

Gly16: 1  
Arg16: 2  
Gly16Arg: 3  
Glu27: 4  
Gln27: 5  
Glu27Gln: 6

##### Haplotipos

*Gly16/Glu27*: 1  
*Gly16/Gln27*: 2  
*Arg16/Glu27*: 3  
*Arg16/Gln27*: 4  
*Gly16Arg/Glu27*: 5  
*Gly16Arg/Gln27*: 6  
*Glu27Gln/Gly16*: 7  
*Glu27Gln/Arg16*: 8

##### Sexo

Masculino: 1  
Femenino: 2

##### Edad

18 – 23: 1  
24 – 29: 2  
30 – 35: 3  
36 – 41: 4  
42 – 47: 5  
48 – 53: 6  
54 – 59: 7  
>60: 8

##### Estrato Socioeconómico

Estrato 1: 1  
Estrato 2: 2  
Estrato 3: 3  
Estrato 4: 4  
Estrato 5: 5  
Estrato 6: 6  
No especificado: 99

##### Tipo de Hospitalización

Unidad de Cuidados Intensivos: 1  
Sala de Medicina Interna: 2  
Urgencias: 3

##### Uso de Medicamentos

Postcodificación

##### Grupo de Estudio

Asma severa: 1  
Asma no severa: 2  
Control: 3

##### Diagnostico

Asma severa persistente: 1  
Asma moderada persistente: 2  
Asma leve persistente: 3  
Asma leve intermitente: 4

## 11.2. **Anexo 2 Protocolo de extracción de DNA por kit wizard Promega**

1. En un tubo falcon de 15ml poner 9ml de buffer de lisis de globulos rojos y sobre este adicionar con una pipeta de transferencia plastica 3ml de sangre total.

Mezclar muy bien hasta completa homogenización

2. Agitar fuertemente en una plataforma (shaker) durante 10 minutos a temperatura ambiente

3. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet

5. Dar vortex vigorosamente al pellet en el líquido residual

6. Adicionar 3ml de buffer de lisis nuclear y mezclar cuidadosamente con chupa Plástica varias veces, hasta completa homogenizacion. Dejar al menos 30 minutos a temperatura ambiente

7. Adicionar 1ml de solución precipitante de proteínas (dar vortex)

8. Centrifugar a 4000rpm durante 20 minutos

9. Verter el sobrenadante en un tubo Falcon de 15ml que contenga 3ml de isopropanol frio, dejar en reposo al menos 5 minutos

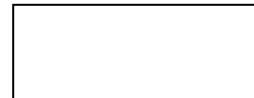
10. Mezclar cuidadosamente por inversion hasta precipitar el DNA

11. Envolver el DNA en una pipeta pateur de vidrio y poner en 250µl de solución de rehidratación

13. Almacenar el DNA a -20oC



11.3. **Anexo 3. Consentimiento Informado**



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN**

**Estudio: CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL BETA 2 ADRENOCEPTOR EN ADULTOS COLOMBIANOS Y SU ASOCIACIÓN CON EL ASMA**

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, con su participación.

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio: (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. (b) El participar en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero esta investigación nos permite clarificar muchos conceptos sobre la enfermedad y su mecanismo de herencia, de manera que los beneficios posteriores sean para usted, su familia u otros individuos afectados. (c) Usted puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocación de este consentimiento no tendrá perjuicio alguno sobre la relación médico-paciente. (d) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. (e) Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material genético. (f) CONFIDENCIALIDAD: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Departamento de Ciencias Fisiológicas. 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 investigación tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. (g) La naturaleza de este estudio, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información importante está resumida a continuación y será explicada por el grupo investigador. (h) 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.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla de los investigadores, o directamente con:

Erik Baltaxe, MD.  
Julián Palomino, MD.  
Ignacio Briceño, MD, PhD.  
Gabriel Pascual, MD.  
Darío Riascos B, MD.  
Henry Aceros, MD.  
Esperanza Holguín, MD

---

Tel (91)3208320 (Ext. 2794 o Ext. 2782)



## EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

### **OBJETIVO:**

El objetivo principal de este estudio investigativo es el de:

**Cuantificar el grado de asociación entre los polimorfismos del gen ADRB2 Arg16Gly y Gln27Glu y la severidad del asma en adultos que asisten a la consulta externa del Hospital Universitario San Ignacio.**

### **PROCEDIMIENTO:**

Se tomarán de su historia clínica datos concernientes a su edad, severidad del asma, medicamentos usados, historia familiar de asma o sibilancias y resultados en las pruebas de función pulmonar. El investigador realizará además un árbol genealógico. Se realizará también una toma de sangre venosa periférica del antebrazo mediante técnica adecuada por parte de la Enfermera Jefe del servicio o Bacterióloga del Instituto de Genética Humana en el área designada para toma de muestras. Este procedimiento le puede traer como consecuencia dolor y en muy raras ocasiones hematoma o infección en el sitio de punción.

Estas muestras serán manejadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio del Departamento de Ciencia Fisiológicas. Las muestras para este estudio serán analizadas en su totalidad en los laboratorios del Instituto de Genética Humana.

### **RIESGOS E INCOMODIDADES**

La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento.

### **BENEFICIOS ADICIONALES:**

Este estudio tiene para usted el(los) siguiente(s) beneficio(s) adicional(es):

1. Identificar el tipo de polimorfismo o mutación que tiene usted para los genes que codifican la proteína del Adrenoceptor B2 y que le permitirá poder tener, en un futuro, unas posibles recomendaciones para el pronóstico y manejo terapéutico de su enfermedad.

### **RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES**

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

### **MANEJO DE RESULTADOS:**

Los resultados de los estudios genéticos solo le serán revelados cuando representen una ayuda diagnóstica para la entidad objeto de este estudio; estos resultados le serán entregados durante consulta clínica.

### **OTRA INFORMACIÓN PERTINENTE:**

---

### **AUTORIZACION:**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

**Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.**

**Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en las situaciones señaladas a continuación:**

- En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro Si No de mi familia :
- En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en Si No anonimato mis datos de identificación:
- En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en Si No anonimato mis datos de identificación:
- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve Si No en anonimato mis datos de identificación:

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con documento de identificación: No. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de \_\_\_\_\_, con el fin de realizar análisis de \_\_\_\_\_. 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: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Investigador

## Caracterización de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu del receptor $\beta$ 2-adrenergico en adultos Colombianos y su asociación con el asma

Erik Baltaxe<sup>1</sup>; Julián Palomino<sup>1</sup>; Darío Riascos<sup>1</sup>; Ignacio Briceño<sup>1</sup>; Esperanza Holguín<sup>1</sup>; Henry Aceros<sup>1</sup>, Gabriel Pascual<sup>1</sup>, Paola Cadena<sup>2</sup>, Paola Ayala.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, programa de Posgrados, Pontificia Universidad Javeriana.

### Resumen

**Objetivo:** Determinar si los polimorfismos del gen del receptor  $\beta$ 2-adrenergico (ADR $\beta$ 2), Arg16Gly y Gln27Glu se asocian con el asma en adultos que asisten al Hospital Universitario San Ignacio en la ciudad de Bogotá, Colombia. **Materiales y métodos:** Se caracterizaron 70 pacientes asmáticos y 59 no asmáticos para el aminoácido 16 y el 27 del ADR $\beta$ 2, mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en ADN extraído de sangre periférica con el Kit de extracción Promega. El análisis de RFLPs se realizó con las enzimas de restricción *NcoI* y *BbvI*, y la visualización de estos polimorfismos se realizó en electroforesis con geles de poliacrilamida. La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del ADR $\beta$ 2 entre los dos grupos se realizó con un test de Chi-cuadrado. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los loci polimórficos, Arg16Gly y Gln27Glu entre el grupo de casos (0.70, 0.30, 0.59 y 0.41 respectivamente) y los controles (0.71, 0.29, 0.70 y 0.30), respectivamente. Las frecuencias genotípicas también fueron similares entre los casos y controles ( $p > 0.05$  para todos los genotipos). De los 4 posibles haplotipos resultantes de la combinación entre los distintos alelos, sólo se presentaron dos con mayor frecuencia en toda la población de estudio (Arg16Gln27 y Gly16Glu27). Una asociación significativa se encontró para el haplotipo Gly16Glu27 y el asma ( $p < 0.05$ ). **Conclusiones:** Estos resultados apoyan el papel de los polimorfismos Gly16 y Glu27 del gen ADR $\beta$ 2 en la susceptibilidad al desarrollo del asma en la población adulta asmática de la ciudad de Bogotá.

**Palabras clave:** estudios de Asociación, asma,  $\beta$ 2-adrenoreceptor polimorfismo, genotipo, Haplotipo

### Abstract

**Background:** Several polymorphisms of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor ADR $\beta$ 2 gene associated with asthma have been identified, but the results are not conclusive. **Objective:** To determine whether single nucleotide polymorphisms found in the sequence of the ADR $\beta$ 2 adrenergic receptor are associated with asthma in adults who attend San Ignacio Hospital in the city of Bogotá, Colombia. **Methods and materials:** 70 patients with asthma and 59 controls were studied for amino acid 16 and amino acid 27 of the ADR $\beta$ 2 receptor, through the polymerase Chain Reaction (PCR) in DNA extracted from peripheral blood using Promega extraction Kit and RFLP analysis with restriction enzymes *NcoI* and *BbvI*, and finally visualized with polyacrilamide gel electrophoresis. Comparisons of the ADR $\beta$ 2 genotypes or alleles between different groups were performed using chi-square test. **Results:** No significant differences for the allele frequencies were found for polymorphic loci Arg16Gly and Gln27Glu between the cases group (0.70, 0.30, 0.59 and 0.41 respectively) and the control group (0.71, 0.29, 0.70 and 0.30, respectively). The genotype frequencies were also similar between cases and the controls ( $p > 0.05$  for all the genotypes). Only two of the 4 possible haplotypes, from the combination between different alleles, were frequent in the participants of this study (Arg16Gln27 and Gly16Glu27). Significant association between the Gly16Glu27 haplotype and asthma ( $p < 0.05$ ) was found.

**Conclusion:** Our results imply that the existence of the haplotype Gly16Glu27 may confer susceptibility to asthma in Bogotá, Colombia.

**Keywords:** association studies, asthma,  $\beta_2$ -adrenergic receptor, polymorphism, genotype; haplotypes

## Introducción

Según el documento del “Global Initiative for Asthma” (1), el asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, en la cual diversos elementos celulares desempeñan un papel importante. Existe una importante preocupación a escala mundial, debido a que afecta a millones de pacientes, familias y sistemas de salud de todo el mundo. En Colombia se estima que la prevalencia es cercana al 10,4% y se ha ido observando un aumento en la consulta con casos de asma severa y asma refractaria al tratamiento (1).

El gen  $\text{ADR}\beta_2$  codifica para el  $\beta_2$ -adrenoreceptor, este gen ha sido localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q31-33), carece de intrones y consta de un bloque codificante de 1242 pares de bases (pb) (2). En la región codificante de este gen, los dos polimorfismos que ocurren con alta frecuencia en la población en general son sustituciones de nucleótidos individuales en las posiciones 46 (A46G) y 79 (C79G), correspondientes a las sustituciones de Arginina por Glicina en la posición del aminoácido 16 y glutamina por glutamato en la posición del aminoácido 27. Las frecuencias de los alelos para el Arg16Gly y Gln27Glu varían según el grupo étnico (3). Las frecuencias alélicas reportadas para Arg16 en caucásicos, afroamericanos y las poblaciones de Asia son de 0,39, 0,50 y 0,40, respectivamente; mientras que para Gln27 son de 0.57, 0.73 y 0.80 (3).

Los receptores de la superficie celular como el  $\text{ADR}\beta_2$  presentan un proceso dinámico, esto quiere decir que además de ser expresados y activados, también están sujetos a un proceso de desensibilización (desacoplamiento de la proteína Gas) y a la degradación del receptor. El cuadro se complica posteriormente por los efectos de la variación genética (4).

La alteración en la función del receptor podría explicar diferentes grados de severidad del fenotipo asmático, hiperreactividad bronquial y asma nocturna (5). Sin embargo, hay gran controversia en cuanto al papel que juega el gen en la enfermedad, ya que hay datos que sugieren una relación con el asma, pero al realizar comparaciones de la presencia de estos polimorfismos en pacientes asmáticos y controles, los resultados han sido inconsistentes y los polimorfismos que resultan informativos en una población pueden no serlo en otra (5). Así, el descubrimiento de factores genéticos asociados a asma y aquellos que son propios de cada población podrían tener un gran impacto en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento. Por lo tanto, es importante realizar estudios en nuestra población que nos proporcionen una medida de la variabilidad genética del receptor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño del estudio:** Se llevó a cabo un estudio de casos y controles, con un

tamaño poblacional de 70 casos (asmáticos) y 59 controles (no asmáticos). La población de estudio seleccionada fueron pacientes que asistieron al Hospital Universitario San Ignacio de la Facultad de Medicina en la Pontificia **Definición de variables:** Severidad del asma, Curva Flujo-Volumen, edad, sexo, estrato socioeconómico, uso de medicamentos, tipo de hospitalización, número de hospitalizaciones.

*Análisis estadístico:* los resultados fueron almacenados y codificados en una base de datos en el programa Access database, Microsoft Office 2007. Los grupos de casos y controles fueron ajustados por sexo y edad. Se realizó la estadística descriptiva: porcentajes de aparición del evento para las variables categóricas. Asimismo, se analizó el nivel de asociación para el desenlace atribuido a la variante génica, mediante el cálculo de *odds ratio* (OR), prueba de ji al cuadrado y el planteamiento de pruebas de hipótesis con el fin de determinar si existía asociación entre las variables y la enfermedad o si no la había. Se tomó un nivel de confianza del 95% para evaluar la significancia estadística. Las pruebas estadísticas se realizaron con los programas Epidat versión 3.1. Las frecuencias de los alelos y genotipos se estimaron por conteo directo de los mismos. Se realizó el test de Chi cuadrado para verificar si las frecuencias observadas de los genotipos guardaban concordancia con las esperadas bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg.

Universidad Javeriana ubicada en la ciudad de Bogotá desde febrero 2006 hasta febrero del 2008, que cumplieron con los criterios de inclusión, propuestos por el grupo de trabajo.

### *Estudio molecular*

#### ***Presencia del polimorfismo Arg16Gly:***

La extracción de ADN se realizó utilizando el estuche Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) en sangre total siguiendo las instrucciones del fabricante. El polimorfismo del gen ADR $\beta$ 2 fue determinado por el método descrito por Martinez et al., (6), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la detección de este polimorfismo se amplificó el gen ADR $\beta$ 2 con los cebadores las secuencias Forward:

5'GCCTTCTTGCTGGCACCCCAT3/

Reverse

5'CAGACGCTCGAACTTGGCCATG3'.

Con condiciones experimentales de PCR descritas por Martinez *et al.*, (6), con lo que se obtuvo un fragmento de 168 pares de bases y al digerir con la enzima de restricción *NcoI* y separar los productos en gel de poliacrilamida, se evidenciaron fragmentos de 146 y 22pb cuando el genotipo era A/A (Arg16Arg), si el genotipo era A/G (Arg16Gly) los fragmentos fueron 146, 128,22 y 18pb y si el genotipo era G/G (Gly16Gly) los fragmentos fueron 128,22 y 18.

#### ***Presencia del polimorfismo Gln27Glu:***

Para la detección de este polimorfismo se utilizaron los mismos cebadores anteriormente citados por que este polimorfismo está en la misma región codificante de Arg16Gly. Los productos de la digestión con la enzima *BbvI* se llevaron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, teñidos con bromuro de etidio y revelados con

lámpara de luz UV. El polimorfismo Gln27Glu crea un sitio de restricción para la enzima *BbvI*, de esta manera fragmentos de 105 y 63pb corresponden al genotipo G/G(Gln27Gln), los fragmentos de 168, 105 y 63 corresponden al genotipo G/C (Gln27Glu) y el genotipo C/C (Glu27Glu) genera un fragmento de 168 pares de bases.

## Resultados

**Descripción demográfica de la población:** Este estudio incluyó un total

de 129 individuos con una distribución de 70 controles con diagnóstico clínico de asma y 59 controles escogidos con criterio de exclusión. En cuanto a la variable de la edad el rango más prevalente en ambos grupos estuvo entre los 36 y 41 años. En cuanto al género hubo un cierto predominio del sexo femenino (80/129) en ambos grupos y la variable de estrato social reflejó una frecuencia mayor en el estrato 1 y 2 en el grupo de casos, mientras que en el grupo control tuvo una mayor frecuencia de estratos mayor a 3. Tabla1

**Tabla 1. Distribución de las variables demográficas de la población estudiada**

Características de la población según el género, edad y estrato				
Rango de edad	Casos(n=70)	Controles(n=59)	Total	Valor p
18-23	7(8%)	6(11%)	13(100%)	0.9267
24-29	6(10%)	7(13%)	13(100%)	
30-35	7(11%)	3(7%)	10(100%)	
36-41	12(19%)	11(20%)	23(100%)	
42-47	6(10%)	6(11%)	12(100%)	
48 – 53:	9(14%)	6(9%)	15(100%)	
54 – 59	6(10%)	5(9%)	11(100%)	
>60	12(18%)	12(20%)	24(100%)	
Total	65(100%)	56(100%)	121(100%)	
<b>Género</b>				
Femenino	43(64%)	39(65%)	81(100%)	0.9322
Masculino	26(36%)	20(35%)	46(100%)	
Total	70(100%)	59(100%)	129(100%)	
<b>Estrato social</b>				
(1-2)	51(77%)	2(4%)	53(100%)	<0,001
>3	15(23%)	53(96%)	68(100%)	
Total	66(100%)	55(100%)	121(100%)	

## Descripción de los individuos asmáticos

El grupo control estuvo constituido por 70 individuos, en los cuales se valoró la gravedad del asma según los criterios del estudio, la distribución de las variables del grupo asmático de este estudio se muestran en la tabla 2. De acuerdo con el diagnóstico de asma según los síntomas

del paciente, se observó una mayor prevalencia de pacientes que tenían asma severa persistente 35/70 individuos con un porcentaje del (51%) sobre el total del grupo. En el grupo de estudio la mayoría de los pacientes 40/70 que represento un total del (60%), presentaban asma severa. En este estudio se tomó en cuenta la lista

de medicamentos que estaban usando los pacientes asmáticos, la distribución de los fármacos antiasmáticos entre los pacientes presentó una mayor frecuencia de  $\beta$ -Agonistas de corta acción (SABA), 61/70(35%) y también el uso frecuente de

Corticoesteroides 60/70(33%). En cuanto a la asistencia clínica de estos pacientes se observó una alta relevancia en el servicio de urgencias, con un total de 923 ingresos. Tabla 2.

**Tabla 2. Características de los individuos asmáticos en el estudio.**

<b>Pacientes asmáticos de este estudio(n=70)</b>	
<b>Diagnóstico de asma</b>	Total
severa persistente	39(51%)
moderada persistente	19 (30%)
Leve persistente	8(11%)
Leve intermitente	4(6%)
Total	67(100%)
<b>Grupo de estudio</b>	
Asma severa	43(60%)
Asma no severa	27(40%)
Total	70(100%)
<b>Tratamiento</b>	
$\beta$ -Agonistas de corta acción	64(35%)
$\beta$ -Agonistas de larga acción	16(8%)
Corticoesteroides	63(33%)
Anticolinérgicos	23(23%)
Antileucotrienos	3(3%)
Teofilina	16(9%)
Total	185(100%)
<b>Asistencia Clínica</b>	
Medicina interna	498
Urgencias	923

#### **Distribución alélica y genotípica en la población de estudio.**

Se determinó la relación existente entre casos y controles de cada alelo de los polimorfismos del ADR $\beta_2$ . El alelo Arg16 mostró una frecuencia mayor que el alelo Gly16 tanto en los controles como en los casos (Tabla 3). El alelo Gln27 mostró también una mayor frecuencia en relación

con alelo Glu27 en ambos grupos. (Tabla 4).

La población de este estudio no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a que se estima que un valor de p menor de 0,05 indica desviación del equilibrio y como para el polimorfismo Arg16Gly en el grupo de

los casos el valor de p fue 0,014 y para el grupo control 0,0019, se estimó que ambos grupos estaban en desequilibrio (Tabla 3). En cuanto al polimorfismo Gln27Glu el valor de p para el grupo de los casos fue 0,013 y para el grupo control de 0.17 (Tabla 4), pese a esto, los resultados indicaron que ambas

poblaciones no diferían significativamente en sus frecuencias alélicas y genotípicas. Dichas estimaciones fueron realizadas por el programa Genepop versión 3.4 por el método cadenas de Markov, respectivamente para cada grupo de individuos y para cada polimorfismo.

**Tabla 3 Distribución de las frecuencias Genéticas en la población del Polimorfismo Arg16Gly del ADR $\beta_2$**

Polimorfismo	Alelos y Genotipos			Casos(n=70)/ Frecuencia	controles(n=59)/ Frecuencia
Arg16Gly	Alelo	A	Arg16	98/(0.70)	84/(0.71)
		G	Gly16	42/(0.30)	34/(0.29)
	Genotipo	A/A	Arg16Arg	30/(0.43)	25/(0.42)
		A/G	Arg16Gly	38/(0.54)	34/(0.58)
		G/G	Gly16Gly	2/(0.03)	0
	HW			<b>p=0,014</b>	<b>p =0,0019</b>

\*HW: equilibrio de Hardy Weinberg.

Valor de p con nivel de confianza del 95% para equilibrio de Hardy Weinberg, p<0,05 indica desequilibrio de Hardy Weinberg.

**Tabla 4 Distribución de las frecuencias Genéticas en la población del Polimorfismo Gln27Glu del ADR $\beta_2$**

Polimorfismo	Alelos y Genotipos			Casos(n=70) /Frecuencia	Controles(n=59) /Frecuencia
Gln27Glu	Alelo	C	Gln27	82/(0.59)	83/(0.70)
		G	Glu27	58/(0.41)	35/(0.30)
	Genotipo	C/C	Gln27Gln	19/(0.27)	27/(0.46)
		C/G	Gln27Glu	44/(0.63)	29/(0.49)
		G/G	Glu27Glu	7/(0.10)	3/(0.05)
	HW			<b>p=0.013</b>	<b>p=0.17</b>

\*HW: equilibrio de Hardy Weinberg.

Valor de p con nivel de confianza del 95% para equilibrio de Hardy Weinberg, p<0,05 indica desequilibrio de Hardy Weinberg.

### Asociación de los polimorfismos con el asma entre casos y controles.

Al determinar la asociación entre los genotipos del polimorfismo Arg16Gly16 entre los casos y controles no fue posible establecer una relación entre el polimorfismo y el asma. En la tabla 5 se observa una mayor frecuencia del

genotipo Arg16Gly16 tanto en casos y controles en comparación con los demás genotipos. Al realizar la asociación del polimorfismo Gln27Glu27 en el grupo de casos y controles no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. El genotipo que presentó mayor frecuencia



en ambos grupos fue Glu27/Glu27. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos polimorfismos analizados entre pacientes y controles ( $P > 0.05$ ), así como tampoco se evidenció un mayor riesgo de presentar la

(Tabla5). enfermedad asociado a la presencia de un polimorfismo determinado, ni a un genotipo particular ( $OR < 1$ ), lo que sugiere que los polimorfismos del ADR $\beta$ 2, probablemente no estaban asociados con la fisiopatología de la enfermedad.

**Tabla 5. Asociación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu entre casos y controles**

				Asma	Control	Estadístico
<b>Polimorfismo</b>	Alelos y Genotipos			(N = 70)	(N = 59)	
<b>Arg16Gly</b>	Alelo	A	Arg16	98(0.70)	80(0.70)	OR=1,0 IC 95%: [0,61-1,8] valor $p = 0,83$
		G	Gly16	42(0.29)	34(0.30)	
	Genotipo	A/A	Arg16Arg	30(0.47)	25(0.41)	OR=0.8 IC 95%:[0,4-1,7] Valor de $p = 0,41$
		A/G	Arg16Gly	38(0.50)	34(0.59)	
G/G		Gly16Gly	2(0.03)	0(0)		
<b>Gln27Glu</b>	Alelo	C	Gln27	82(0.61)	83(0.70)	OR=1,6 IC 95%.[0,99-2,8] valor $p = 0,04$
		G	Glu27	58(0.39)	35(0.30)	
	Genotipo	C/C	Gln27Gln	19(0.27)	27(46)	OR = 1,7 IC 95%:[0.8-3,5] Valor de $p = 0,08$
		C/G	Gln27Glu	44(0.63)	29(0.49)	
		G/G	Glu27Glu	7(0.10)	3(0.05%)	

#### Asociación de haplotipos entre casos y controles

Para este punto se realizó un análisis comparativo de los haplotipos Arg16Gln27, Arg16Glu27, Gly16Gln27 y Gly16Glu27 entre los casos y controles. En la composición de la muestra se observó que el haplotipo más frecuente fue Arg16Gln27, debido a que se encontró en el 51% de los casos y en el 56% de los controles. Por otro lado, se encontró que el haplotipo Gly16Gln27 fue el menos frecuente en comparación con los 3 haplotipos restantes.

El valor estadístico común para todos los niveles (Arg16Gln27, Arg16Glu27, Gly16Gln27, Gly16Glu27), fue menor a 0,05 ( $p = 0,011$ ), lo que señaló que había una diferencia entre alguno de los diferentes niveles de exposición (Haplotipos) entre los casos y controles. Debido a esto se cuantificó el grado de relación existente entre alguna de las variables. De esta manera se evidenció que los haplotipos Gly16Gln27 y Gly16Glu27 diferían significativamente, ya que se encontró que el haplotipo Gly16Glu27, era más frecuente en el grupo de los casos con un 22% en

comparación con los controles que tuvo una frecuencia del 14%. El resultado de este análisis mostro un *odds ratio* de 1.69 (IC 95%:[1,04;2,7]), indicando por lo

tanto, una asociación entre el antecedente ( haplotipo: Gly16Glu27) y la enfermedad (asma).

**Tabla 5 Distribución Haplotípica de los polimorfismo del ADR $\beta$ 2**

Haplotipo	Casos (n=70)	Controles (n=59)	Estadístico
<b>Arg16Gln27</b>	142(51%)	132(56%)	O.R:1.0
<b>Arg16Glu27</b>	54(19%)	36(16%)	OR:1,39 (IC 95%: [0,85;2,2])
<b>Gly16Gln27</b>	22(8%)	34(14%)	OR:0,60 (IC 95%: [0,3;1,08])
<b>Gly16Glu27</b>	62(22%)	34(14%)	OR:1,69 (IC 95%: [1,04;2,7])
Total alelos	280(100%)	236(100%)	Valor de $p=0,011$

### Discusión

De los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, el gen ADR $\beta$ 2 (5q31-33) que codifica para el  $\beta$ 2- Adrenoreceptor ha sido el más investigado en estudios genéticos del asma, esto se basa en el hecho de limitar la búsqueda a genes que, como este, estén localizados en áreas cromosómicas ligadas al asma. Cuatro de los nueve polimorfismos reportados para este gen resultan en sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 27, 34 y 164, que con excepción del 34, todos alteran la función del receptor (7). Al parecer, estos polimorfismos funcionales modifican el fenotipo de la enfermedad. Por lo tanto, se ha propuesto que variaciones en la secuencia de este gen tienen una contribución diferencial en la enfermedad entre las poblaciones y aún entre los individuos (8); también se ha observado una asociación importante con la respuesta al tratamiento y con la gravedad

de la misma (9). Los polimorfismos del  $\beta$ 2-adrenoreceptor ADR $\beta$ 2, también se ha relacionado con otros fenotipos asociados con la entidad como hiperreactividad bronquial (10), y tanto el polimorfismo Gly16 como el Gln27 se han relacionado con susceptibilidad al asma (11,12 ,13), sin embargo, otros reportes no han encontrado dicha correlación. Entre tanto, algunos estudios *in vitro* han demostrado que los polimorfismos del ADR $\beta$ 2 pueden alterar el proceso de la transducción de señales de este receptor, evidenciado porque los dos polimorfismos han sido asociados con alteraciones en la expresión del receptor, “Downregulation”, o en el desacoplamiento del receptor, en respuesta a los  $\beta$ 2. agonistas del ADR $\beta$ 2 (14). De esta manera, resulta el gran interés de estudiar el gen ADR $\beta$ 2 y sus polimorfismos más frecuentes o alelos silvestres Arg16 y Gln27 (15).

En este estudio, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) pudo haberse dado principalmente por factores como: la migración (flujo genético), selección y mutación (16). En este hecho se toma en cuenta que Colombia se caracteriza por ser el resultado de la mezcla de tres grupos principales: indígenas, españoles y africanos, a los que se le sumaron importantes grupos de inmigrantes provenientes de otros países Europeos y de Oriente Medio. Como consecuencia de esto, Colombia ha sido uno de los países latinoamericanos con mayores consecuencias socioculturales generadas por la llegada de los conquistadores españoles en 1492, hecho que produjo un mestizaje entre diferentes etnias, el cual se prolonga desde la época de la Conquista y la Colonia (siglos XVI al XIX) con importantes variaciones regionales hasta hoy día (16) (17). Entonces para contextualizar el término “mezcla” se debe considerar que es la unión de dos poblaciones genéticamente diferentes. De manera que en nuestro caso, la variante Arg16Gly se pudo haber generado por dos grupos hipotéticos, uno formado exclusivamente por individuos homocigotos Arg16Arg y el otro por homocigotos Gly16Gly, lo que significó un cambio importante en la relación con cada uno de los grupos iniciales. El problema para la aplicación de este planteamiento es que en la actualidad el único dato con el que se cuenta es la frecuencia del gen en la población Mestiza, mientras que las frecuencias de las poblaciones bases (española, indígena, africana) son obtenidas de la literatura o de bases de datos, aceptando, así, que son iguales o similares a las existentes cuando ocurrió la mezcla génica.

Por consiguiente, señalando que la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se haya dado por la gran variabilidad poblacional en nuestro país, debemos considerar también que la baja frecuencia de los homocigotos Gly16Gly y Glu27Glu encontrados en este estudio, se deban a una desventaja adaptativa de los individuos de esta población, mientras que el mayor número de heterocigotos Arg16Gly podrían permitir conservar la diversidad genética (Genotipos o polimorfismos) en la población, debido a que podrían tener una mejor adaptación a las condiciones ambientales. Con respecto a los pacientes, se podría pensar que el asma no solo estaría asociada a la condición heterocigota de los genotipos ArgGly16 y GlnGlu27 de manera independiente sino más probablemente al haplotipo que los incluye a los dos Gly16/Glu27.

Esto se deduce debido a que los resultados de este estudio mostraron una alta frecuencia del haplotipo Gly16/Glu27, en los individuos con asma.

Una posibilidad alterna para comprender la falta de equilibrio de Hardy-Weinberg es que las variantes del gen ADR $\beta$ 2 atraviesen un barrido selectivo, en donde la selección positiva y balanceante se inicia por la distribución en la población de los alelos recientemente seleccionados y se mantiene así hasta su fijación o hasta que sean seleccionados [98]. Sumado a esto, como el gen ADR $\beta$ 2 tiene un proceso evolutivo dinámico, se hace difícil determinar su régimen selectivo fundamental (18).

Las variantes polimórficas de los genes ADR $\beta$ 2 han sido asociadas con tres condiciones muy frecuentes: asma, obesidad e hipertensión, enfermedades que se han ido difundiendo en las poblaciones humanas probablemente porque los alelos Gly16 y Glu27 son susceptibles a los cambios ambientales y al estilo de vida (18).

## Conclusiones

Las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos Arg16Gly y Gln27Glu detectadas en este análisis, no fueron estadísticamente significativas entre casos y controles.

Los resultados de este estudio identificaron un efecto de susceptibilidad de los alelos Gly16 y Glu27, como parte de un haplotipo, OR: 1,69 (IC 95%: [1,04; 2,7]) Valor de  $p=0,011$ . Esto justifica futuras investigaciones en estudios más amplios y en otras poblaciones.

Los valores de las frecuencias alélicas de este estudio, fueron cercanos a los reportados en otra población de Colombia.

Estos resultados apoyan el papel de estos polimorfismos en la susceptibilidad al desarrollo del asma.

## Financiación

Este trabajo fue financiado con recursos por la Pontifica Universidad Javeriana.

## Conflicto de intereses

Los autores afirman no tener ningún conflicto de intereses

## Referencias

1. Bateman ED, Boulet LP, Cruz A, Fitzgerald M, Haatela T, Levy M y cols. Guía de bolsillo para el manejo y prevención del asma 2010. Global Initiative for Asthma, 2010. [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com)
2. Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG. Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem* 1987; **262**:7321–7.
3. Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, Cockcroft D, James A, Liggett SB, Pare PD. b2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate, and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**;158:787–791
4. Green SA, Turki J, Hall IP, Liggett SB. Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. *J Pulm Pharmacol* 1995; **8**:1–10.
5. Thakkinstian A, McEvoy M, Minelli C, Hancox B, Duffy D, Thompson J, Hall I, Kaufman J, Leung TF, Helms PJ, Hakonarson H, Halpi E, [Navon R](#), [Attia J](#). Systematic review and metaanalysis of the association between b2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005; **162**:201–211.
6. Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest* 1997;**100**:3184–8.
7. Liggett SB. Polymorphisms of the b2-adrenergic receptor and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;**156**: 156–162.
8. Contopoulos-Ioannidis, D.G., E.N. Manoli, and J.P.A. Ioannidis, Meta-analysis of the association of  $\beta$ 2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2005. **115**(5): p. 963-972.
9. Hoffjan, S., D. Nicolae, and C. Ober, Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory Research*, 2003. **4**(1): p. 14.
10. Meyers DA, Postma DS, Stine OC, Koppelman GH, Ampleford EJ, Jongepier H, Howard TD, Bleecker ER. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1169–1175
11. Holloway JW, Dunbar PR, Riley GA, Sawyer GM, Fitzharris PF, Pearce N, . Association of b-2 adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; **30**:1097-103
12. Gao G, Wang S, Zhang J. Study on beta 2 adrenergic receptor genetic polymorphisms in asthmatics in the people of the Han nationality of northern China. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2000; **23**: 93-7.

13. Hopes, E., McDougall C, Christie G, Dewar J, Wheatley A, Hall IP, Association of glutamine 27 polymorphism of  $\beta$ 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study. *BMJ*, 1998. **316** (7132): p. 664
14. McGraw, D. W., E. T. Donnelly, M. G. Eason, S. A. Green, and S. B. Liggett. 1998. Role of bARK in long-term agonist-promoted desensitization of the b2-adrenergic receptor. *Cell Signal*. **10**:197–204.
15. Taylor, D., Pharmacogenetics of beta2-agonist drugs in asthma. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2006. **31**(2): p. 247-258.
16. Maxwell TJ, Ameyaw MM, Pritchard S. Beta2-adrenergic receptor genotypes and haplotypes in different ethnic groups. *Int J Mol Med*. 2005;16:573–80
17. Yunis, J.J., E.J. Yunis, and E. Yunis, Genetic relationship of the Guambino, Paez, and Ingano Amerindians of Southwest Colombia using major histocompatibility complex class II haplotypes and blood groups. *Human Immunology*, 2001. **62**(9): p. 970-978.
18. Cagliani R., Fumagalli M., Pozzoli U., Riva S., Comi G.P., Torri F., Macciardi F., Bresolin N., Sironi M. Diverse evolutionary histories for beta-adrenoreceptor genes in humans. *Am. J. Hum. Genet*. 2009; **85**:64–75.

