
Polimorfismos de número variable de repeticiones en tándem del intrón 2 de 5-HTT y MUC 7 en pacientes venezolanos con asma o EPOC.

Diego Lema¹, Alexis Hipólito García¹, Dolores Del Carmen Moreno², Carmen Cristina García² y Juan Bautista De Sanctis¹.

¹Instituto de Inmunología y ²Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Palabras clave: asma; EPOC; transportador de serotonina; mucina; STin2; MUC7; variación de número de repeticiones en tándem (VNTR).

Resumen. El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son enfermedades inflamatorias crónicas. En ambas patologías existe broncoconstricción, producción de mediadores inflamatorios, hipersecreción de moco y migración de células inflamatorias. La serotonina tiene propiedades inmunomoduladoras que facilitan la broncoconstricción y su transportador (5-HTT) es el principal determinante de su concentración plasmática. Las mucinas (MUC) son glicoproteínas involucradas en la inmunidad innata local. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la asociación entre polimorfismos de número variable de repeticiones en tándem (VNTR) del intrón 2 de 5-HTT (STin2) y MUC7 en pacientes venezolanos con asma o EPOC. El grupo de estudio consistió en 301 individuos (102 asmáticos, 99 EPOC, y 100 controles). No se observaron diferencias en las frecuencias de polimorfismos de MUC7 entre los grupos. Sin embargo, se encontró asociación entre alelos y genotipos de STin2 con presencia de asma o EPOC ($p < 0,001$). El alelo STin2.9 tuvo un odds ratio (OR) de 0,15 ($p=0,16$) en los pacientes con asma, mientras que en los pacientes con EPOC los genotipos STin2.10/10 y 10/12 presentaron un OR de 0,33 ($p=0,002$) y 3,64 ($p=0,002$), respectivamente. Con relación a los haplotipos, el STin2/MUC7 10/10-6/6 se relacionó con riesgo en asma (OR=1,6, $p=0,02$) y protección en EPOC (OR=0,3, $p=0,006$) y el 10/12-6/6 (OR=3,7, $p=0,002$) fue un factor de riesgo para EPOC. En conclusión, en la población venezolana los polimorfismos de STin2 son importantes para definir factor de riesgo de enfermedad y, en consecuencia, el transportador de serotonina es relevante en ambas patologías.

5-HTT intron 2 and MUC7 variable number of tandem repeats polymorphisms in a Venezuelan population with asthma or COPD.

Invest Clin 2017; 58(2): 140 - 153

Keywords: asthma; COPD; serotonin transporter; mucins; STin2; MUC7; VNTR.

Abstract. Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) are chronic inflammatory diseases. Both entities are characterized by bronchoconstriction, production of inflammatory mediators, mucus hypersecretion and inflammatory cell migration. Serotonin has immunomodulatory properties facilitating bronchoconstriction and its plasma concentration is transporter dependent (5-HTT). Mucins are glycoproteins involved in local innate immunity. The aim of this study was to assess the association between the variable number of tandem repeat polymorphisms (VNTR) of intron 2 of the serotonin transporter (5-HTT) (STin2) and MUC7 in Venezuelan asthmatic or COPD patients. The group consisted of 301 individuals (102 asthmatics, 99 with COPD and 100 controls). There were no differences in the frequencies of MUC7 polymorphisms among the groups. However, there is a significant association between some alleles and genotypes with the presence of asthma or COPD ($p < 0.001$). The STin2.9 allele had an odds ratio (OR) of 0.15 ($p=0.16$) in patients with asthma, while in patients with COPD, the STin2.10/10 and 10/12 genotypes had 0.33 ($p=0.002$) and 3.64 ($p=0.002$) OR, respectively. Regarding haplotypes, the STin2/ MUC7 10/10-6/6 is related to asthma risk (OR = 1.6, $p=0.02$) and COPD protection (OR=0.3, $p=0.006$) and 10/12-6/6 (OR=3.7, $p=0.002$), is a risk factor for COPD. In conclusion, in the Venezuelan population STin2 polymorphisms are important to define disease risk factor and consequently, the serotonin transporter is relevant to both pathologies.

Recibido: 02-11-2016 Aceptado: 27-04-2017

INTRODUCCIÓN

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto respiratorio de alta prevalencia en nuestra población, cuya consecuencia funcional es la limitación del flujo aéreo a los pulmones (1-3). La obstrucción de la vía aérea en asma es reversible, mientras que en EPOC es parcialmente reversible (1,3). Las características inflamatorias de estas enfermedades varían según el agente que la desencadena; en asma alérgica es la exposición a alérgenos,

y en EPOC, el principal desencadenante es el humo del cigarrillo (2,3). Estudios genéticos han dado información importante acerca de los múltiples loci susceptibles para cada enfermedad (4,5)

La broncoconstricción parasimpática es facilitada por la serotonina que es una amina bioactiva derivada del triptófano. La serotonina, genera una variedad de efectos biológicos por su amplio rango de receptores (14 subtipos) (6, 7). El neurotransmisor, controla el tono del músculo liso, estimula los centros de la respiración, promueve la degranulación celular y tiene

efectos inmunomoduladores (6, 7). Las plaquetas representan la mayor reserva y fuente de serotonina, en la respuesta inflamatoria aguda se activan y migran a los tejidos donde liberan este mediador facilitando el reclutamiento tisular de neutrófilos (8,9). Los macrófagos alveolares estimulados por la serotonina, secretan mayor cantidad de IL-10, óxido nítrico y prostaglandina E2 y una cantidad significativamente menor de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-12 (10). La activación del receptor 5-HT2A inhibe la inflamación mediada por el TNF- α in vivo (11). Por ende, se ha propuesto que la serotonina induce un perfil inflamatorio Th2 (10).

La concentración sérica de serotonina está determinada principalmente por su transportador transcelular, 5-HTT, codificado por el gen SCL6A4 (17q11.1-17q12). Actualmente existe una cantidad creciente de información acerca de variantes genéticas de SLC6A4 asociadas con diferentes patologías. Se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), así como un polimorfismo VNTR en su intrón 2 (STin2), el cual consiste en repeticiones en tándem de una secuencia de 17 pares de bases, siendo los alelos 9,10, y 12 los más relevantes (12).

Farjadian y col. (13) realizaron un estudio en una cohorte de 100 niños iraníes menores de 18 años con el diagnóstico de asma bronquial. Ninguna asociación fue observada entre los polimorfismos de SLC6A4 (STin2), después de la estratificación de los pacientes por edad, sexo, parámetros de espirometría, antecedentes familiares, conducta pasiva de fumar y rinitis alérgica; sin embargo, Wang y col. (14) en un estudio llevado a cabo en población china adulta, que incluyó 156 pacientes asmáticos, encontraron que los sujetos masculinos con el genotipo STin2.10/12 y el alelo STin2.10 presentaban mayor riesgo para asma. Pizzo de Castro y col. (15) evaluaron la asociación entre STin2 con el tabaquismo, 185 sujetos fumadores fueron

reclutados, y sus resultados sugieren que el genotipo STin2.10/10 y el alelo STin2.12 están asociados con el tabaquismo y dependencia a la nicotina, pero no con la respuesta al tratamiento o la severidad de la dependencia. Otros estudios avalan la asociación de este polimorfismo en pacientes con EPOC y la aparición de hipertensión pulmonar (16,17).

Las mucinas son las glicoproteínas más importantes de las secreciones de la vía aérea, formando su esqueleto molecular, poseen propiedades antimicrobianas y pueden fijar alérgenos (18). Todos los genes de mucina conocidos tienen variantes alélicas VNTR, las cuales pueden impactar en sus propiedades reológicas y de fijación de patógenos (19-21). MUC7 es una mucina pequeña, no formadora de gel, secretada por las glándulas submucosas de la vía aérea, cuyo gen, MUC7 (4q13.21), posee un VNTR de 5 a 6 repeticiones de una región de 69 nucleótidos que codifica para una región de 23 residuos de aminoácidos ricos en serina, treonina y prolina, la cual puede afectar la conformación de la proteína y, por ende, sus funciones biológicas (22,23). MUC7 interactúa con patógenos respiratorios incluyendo *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus sp* y *Pseudomonas aeruginosa* (18, 24).

Kirkbride y col. (25), determinaron el polimorfismo de MUC7 en sujetos residentes del Reino Unido pertenecientes a diferentes grupos étnicos; los pacientes fueron clasificados en tres grupos: asma atópica (n=102), asma no atópica (n=14) y atópicos no asmáticos (n=68). Los investigadores encontraron una frecuencia significativamente baja del alelo de VNTR MUC7*5 en individuos con asma atópica. Watson y col. (26), reprodujeron este hallazgo en una población asmática afroamericana-estadounidense (n=84). En un estudio longitudinal, Rousseau y col.(27) hallaron que los portadores del alelo MUC7*5 tenían menor riesgo de ser diagnosticados con asma, presentaban una mejor función

pulmonar y una menor caída del VEF1 en 10 años.

Diferentes polimorfismos han sido asociados con un incremento en el riesgo de presentar asma o EPOC (4,5). Existen pocos estudios de asociación entre dichos polimorfismos genéticos en poblaciones latinoamericanas y los resultados de los estudios en otros grupos étnicos no son siempre aplicables a nuestra población mestiza. Dada la relación de los polimorfismos de STin2 y MUC7 con el proceso inflamatorio en el tracto respiratorio, se decidió analizar los polimorfismos STin2 (STin2.7, STin2.9, STin2.10 y STin2.12) y MUC7 (*5,*6) en pacientes venezolanos con asma o EPOC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

La población de estudio incluyó individuos mestizos venezolanos. La muestra constó de 301 individuos, de la región Metropolitana y Central del país de diferente edad y sexo, distribuidos en 102 asmáticos, 99 con EPOC y 100 sujetos controles sanos que voluntariamente decidieron participar. Los pacientes pertenecían al Servicio de Neumonología del Hospital Clínico Universitario e Instituto de Inmunología, de la Universidad Central de Venezuela, Caracas. El estudio se realizó previo consentimiento informado, aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela; a todos los sujetos se les realizó una ficha médica y espirometría. Participaron en el estudio los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Los sujetos asmáticos fueron diagnosticados por los criterios del Global Initiative for Asthma (GINA) (1) y aquellos con EPOC, por las guías de la Asociación Americana de Tórax (ATS) (3).

Extracción del ADN

Las muestras de sangre fueron tomados por

venipunción con vacutainer™ (Becton-Dickinson, USA) y 4 mL fueron recogidos en tubos con EDTA, de la misma casa comercial. La muestra se centrifugó a 90 x g por 15 minutos y la capa de leucocitos fue tomada para la extracción del ADN genómico. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el estuche comercial Axy Prep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La pureza del ADN genómico fue analizada por espectrofotometría. Su integridad y su cuantificación se realizaron mediante el análisis en geles de agarosa al 3 % con tinción de bromuro de etidio. Las bandas fueron analizadas con una cámara Kodak™ (USA) con el software de referencia para el análisis de bandas (gerldocumentationsystem software Kodak™, USA). La cuantificación se realizó usando una curva patrón con 5 diluciones del ADN Lambda desde 50 ng hasta 200 ng, según el método de Green y Sandbrook (28). Todos los reactivos de análisis fueron de la casa comercial Invitrogen™ (USA).

PCR

Los segmentos de genes que incluyen los VNTR de SLC6A4 (STin2) y MUC7 fueron amplificados mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR).

Para STin2, se adoptó el protocolo de Farjadian y col. (13). Se prepararon soluciones de 20 µL que contenían 11,8 µL de agua libre de nucleasas, 0,2 µL de mezcla 10X Taq Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTP, 1 U Taq polimerasa, 10 µM de primer sentido y 10 µM antisentido y 60 ng de la muestra de ADN. La secuencia del primer sentido fue 5'-GGTCA-GTATCACAGGCTGCGAGTAG-3' y la del antisentido, 5'-TGTTCTAGTCTTACGCCA-GTGAAG-3'. Las muestras se sometieron a desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, luego de la cual se llevó a cabo la amplificación por

PCR, que consistió en 30 ciclos de 95°C por 20 s, 62°C por 30 s y 72°C por 1 min con un paso de elongación final de 10 min a 72°C.

Para la amplificación de MUC7 se modificó (agregando mayor contenido de ADN) el protocolo de Guo y col. (19). Se prepararon soluciones de 25 µL que contenían 12,9 µL de agua libre de nucleasas, 100 ng de muestra de ADN, 0,4 µM de primer sentido y 0,4 µM de antisentido, 1X Buffer (1mM (NH₄)₂SO₄, 67mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% Tween-20), 200 µM de la mezcla de dNTP, 2 mM MgCl₂, y 0,8 U de Taq polimerasa. La secuencia del primer sentido fue 5'-ATGCCACCACCATATCTTCAAG-3' y la del antisentido, 5'-GAAGTTTCAGAAGTGT-CAGGTGC-3'. Los ciclos del PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, 37 ciclos de 94°C por 30 s, 64,5°C por 35 s y 72°C por 55 s y elongación final a 72°C por 10 min.

Todos los reactivos de análisis fueron de la casa comercial Invitrogen™ (USA). Los oligonucleótidos para la PCR fueron sintetizados en la casa comercial Integrated DNA Technologies (USA) con el control de calidad de espectrometría de masa específico. Los amplificadores fueron secuenciados por el servicio de secuenciación del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), Caracas, Venezuela.

Identificación de VNTRs

Los amplificadores de STin2 y de MUC7 fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 3% por 1:30 h a 120V y al 2% por 50 min a 100V, respectivamente. En ambos casos, se utilizó un patrón de peso molecular de 100 pb (Promega Corp. USA) para la identificación de las bandas.

Las bandas de los alelos de STin2 fueron las siguientes: 214 pb (STin2.7), 248 pb (STin2.9), 265 pb (STin2.10) y 299 pb (STin2.12). Los alelos de MUC7 fueron bandas de 505 pb (MUC7*5) o 574 pb (MUC7*6).

Análisis Estadístico

Se calculó la media aritmética y desviación estándar a las variables numéricas continuas como medida de tendencia central. Las variables nominales fueron expresadas como porcentajes de frecuencia en la población.

Se empleó la prueba de χ -cuadrado de Pearson para determinar asociación entre la frecuencia de los polimorfismos estudiados en asma, EPOC y controles sanos, el análisis de varianza (ANOVA) de Fisher de un factor para determinar la existencia de diferencia significativa en cuanto a los parámetros de función pulmonar entre pacientes con asma, EPOC y controles sanos. En todos los casos se estableció un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Se realizó un gráfico de correspondencia a aquellos polimorfismos que resultaron estadísticamente significativos con la prueba de asociación. Se calculó la razón de posibilidades (odds ratio, OR) con su intervalo de confianza de 95% y para el cálculo de la p se utilizó la prueba de Bonferroni como parámetro específico para definir significancia estadística.

Se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics 20 (IBM; Nueva York, 2012) para el manejo de los datos estadísticos y la realización del gráfico.

RESULTADOS

Características poblacionales

Participaron en el estudio 301 sujetos, de los cuales 102 eran asmáticos, 99 tenían EPOC y 100 fueron controles sanos. La edad, sexo e historia de fumador así como las variables de función pulmonar se reportan en la Tabla I. Como era de esperar, se observaron diferencias significativas en los valores de VEF1 y CVF. Seguidamente, en las Tablas II y III se describen los grados de severidad de los pacientes asmáticos y con EPOC.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

Característica	Asma n=102	EPOC n=99	Control n=100	<i>p</i>
Edad (años)	40,6±16,1	64±9,87	33,7±12,27	
Sexo (% femenino)	63 (64,9)	34 (35,1)	7,92 (0,005)*	
Historia de fumador (%)	23	95	16	<0,01
CVF (litros)	2,83±0,81	2,42±0,92	3,87±0,44	<0,05
CVF (% Pred)	81,94±14,76	74,24±19,56	96,2±9,76	<0,05
VEF ₁ (litros)	1,93±0,66	1,24±0,64	3,33±0,72	<0,05
VEF ₁ (% Pred)	66,19±15,28	48,1±18,62	97,48±8,86	<0,05
VEF ₁ /CVF	0,67±0,11	0,5±0,12	0,86±0,06	<0,05

Las variables numéricas continuas se presentan como: media ± desviación estándar. Las variables nominales se presentan como porcentajes. Método estadístico aplicado: ANOVA de un factor. Diferencia significativa $p < 0,05$. Volumen espiratorio en el primer segundo (VEF₁), Porcentaje predictivo de volumen de espiración forzada en el primer segundo (VEF₁ % Pred), capacidad vital forzada (CVF), Porcentaje predictivo de capacidad vital forzada (CVF % Pred).

TABLA II
SEVERIDAD DE ASMA (GINA 2005)

Severidad de asma	Nº	%
Intermitente	10	9,8
Leve persistente	22	21,56
Moderada persistente	43	42,15
Severa persistente	27	26,47
Total	102	100

Análisis de frecuencia de genotipos de polimorfismos VNTR

La frecuencia de los polimorfismos VNTR para cada grupo de pacientes se presenta en la Tabla IV. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre los genotipos de STin2 y asma o EPOC ($p < 0,001$), pero no entre los de MUC7 y éstos grupos de pacientes ($p < 0,263$).

Se generaron gráficos de correspondencia con SPSS mediante los grupos de estudio y los

genotipos de STin2 (Fig. 1). En esta figura, la proximidad entre marcadores representa asociación entre los mismos. El grupo de EPOC parece estar asociado con el genotipo STin2.10/12 y menos asociado al genotipo STin2.10/10. El grupo de asma está más cercano con STin2.10/10.

Debido a la asociación entre los genotipos de STin2 y asma o EPOC, se calcularon los OR para cada genotipo y enfermedad, con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%), que se

TABLA III
SEVERIDAD DE EPOC (GOLD 2003)

Severidad de EPOC (Estadio GOLD)	Nº	%
1	6	6,0
2	33	33,3
3	48	48,5
4	12	12,1
Total	99	100

TABLA IV
FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE VNTR DE STIn2 Y *MUC7* EN PACIENTES
CON ASMA, EPOC Y CONTROLES

Polimorfismo	Genotipo	Asma	EPOC	Control	<i>p</i>
STin2 VNTR	9/9	2 (1,96)	6 (6,06)	8 (8,08)	<0,001
	10/10	38 (37,24)	13 (13,13)	31 (31,31)	
	12/12	53 (51,96)	44 (44,44)	45 (45,45)	
	9/10	0 (0)	7 (7,07)	5 (5,05)	
	9/12	0 (0)	5 (5,05)	2 (2,02)	
	10/12	9 (8,82)	24 (24,24)	8 (8,08)	
MUC7 VNTR	5/5	7 (6,93)	7 (7,07)	3 (3,19)	0,263
	5/6	11 (10,89)	17 (17,17)	20 (21,28)	
	6/6	83 (82,17)	75 (75,75)	71 (75,53)	

Data representa Nº (Frecuencia %). Método estadístico aplicado: Chi-cuadrado de Pearson. Diferencia significativa $p < 0,05$.

muestran en la Tabla V para asma y en la Tabla VI para EPOC. Mientras que ningún OR fue estadísticamente significativo en el caso de asma, STin2.10/10 estuvo asociado a un riesgo disminuido de presentar EPOC (OR: 0,33; IC 95%: 0,16-0,68) y STin2.10/12 con un riesgo aumentado de presentar esta enfermedad (OR: 3,64, 95% IC: 1,54-8,57), $p < 0,05$.

Análisis de frecuencia de alelos VNTR

El análisis por alelos demostró, igualmen-

te, ausencia de asociación entre los alelos de *MUC7* y asma o EPOC. Sin embargo, STin2.9 estuvo asociado a una menor probabilidad de presentar el diagnóstico de asma (OR: 0,15, IC 95%: 0,051-0,44, $p = 0,16$). STin2.10 estuvo asociado con un riesgo disminuido de presentar EPOC (OR: 0,64, IC 95%: 0,42-0,98, $p = 0,04$) mientras que STin2.12 estuvo asociado con un riesgo aumentado de presentar este diagnóstico (OR: 1,5, IC 95%: 1,01-2,24, $p = 0,043$).

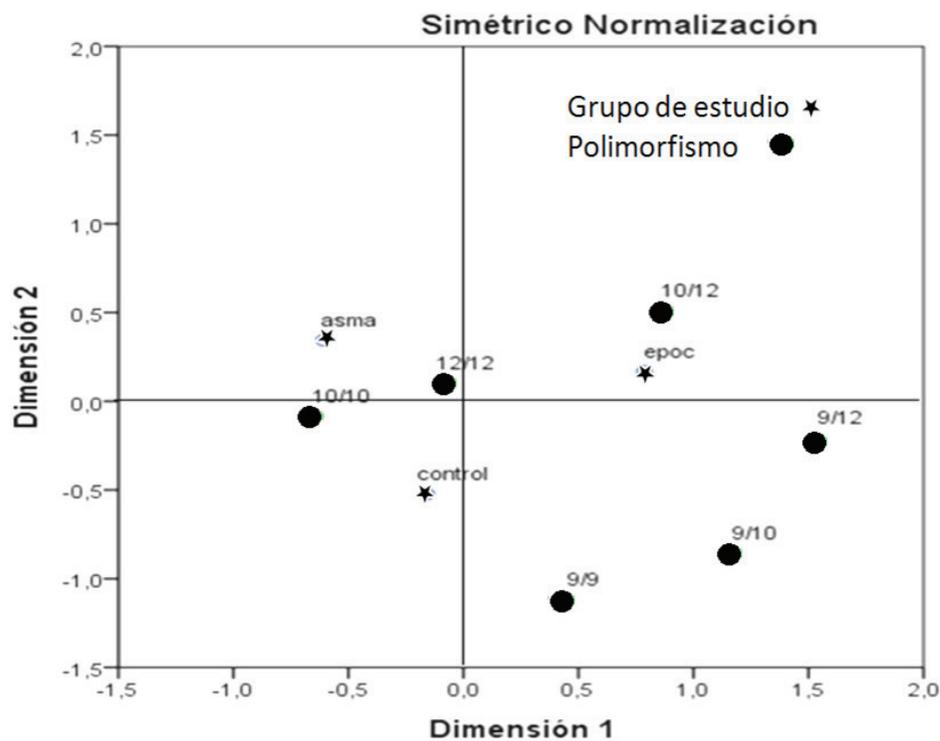


Fig.1. Gráfico de correspondencia de asociación entre genotipos de STin2 y grupos de estudio y su asociación a patología.

TABLA V
ODDS RATIOS DE VNTRs DE STin2 PARA ASMA

Polimorfismo	Genotipo	OR	IC	<i>p</i>
STin2 VNTR	9/9	0,23	0,5- 1,1	0,095
	10/10	1,3	0,7-2,3	0,37
	12/12	1,29	0,7-2,3	0,35
	10/12	1,1	0,4-3	0,85

OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza 95%.

TABLA VI
ODDS RATIOS DE VNTRs DE STin2 PARA EPOC

Polimorfismo	Genotipo	OR	IC	<i>p</i>
STin2 VNTR	9/9	0,73	0,24-2,1	0,57
	10/10	0,33	0,16-0,68	0,002
	12/12	0,96	0,54-1,68	0,88
	9/10	1,43	0,43-4,67	0,55
	9/12	2,58	0,48-13,62	0,24
	10/12	3,64	1,54-8,57	0,002

OR: Odds ratio. IC: intervalo de confianza 95%.

Análisis de frecuencia de haplotipos

Se realizó un análisis de los haplotipos STin2/MUC7 (Tabla VII), siendo los dos más frecuentes: 10/10-6/6 en pacientes con asma y el 10/12-6/6 en pacientes con EPOC. La frecuencia del haplotipo 10/10-6/6 difirió significativamente entre los dos grupos de pacientes.

DISCUSIÓN

La serotonina induce hiperreactividad bronquial en primates sensibilizados al potenciar la liberación parasimpática de acetilcolina mediante los receptores 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₄ (29). En pacientes asmáticos, se ha reportado una mayor expresión del receptor 5-HT_{2A} en células mononucleares de sangre periférica (30). Durante la crisis asmática, los pacientes tienen concentraciones séricas elevadas de serotonina y por ello, la tianeptina, fármaco que promueve la recaptación rápida de la amina, reduce los síntomas durante las crisis (31).

Dado los efectos broncoconstrictores de la serotonina, no sorprende que los pacientes con EPOC fumadores tengan concentraciones plasmáticas más elevadas de la amina que los fumadores sin EPOC (32). Sin embargo, llama la atención que las concentraciones de serotonina

no difieren entre los distintos grados de severidad de EPOC (33).

Tomando en cuenta todo lo descrito anteriormente, se sugiere que el transportador de serotonina, 5-HTT, es determinante en las concentraciones séricas de serotonina y podrían afectar los mecanismos fisiopatológicos del asma y EPOC (12, 34). Por ello, la importancia de estudiar los polimorfismos del gen. En este estudio, se escogió VNTR ya que, a diferencia de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), hay un solo VNTR posible en cada gen estudiado. El análisis es directo y disminuye el riesgo de errores estadísticos y de genética poblacional.

En los grupos estudiados, el alelo STin2.12 fue el más frecuente, seguido por STin2.10, STin2.9. El alelo STin2.7 no fue identificado en las muestras. Las diferencias más marcadas se observaron en el genotipo 10/10 y 10/12 en los pacientes con EPOC, respecto a los controles y al grupo de pacientes asmáticos.

Los resultados del presente estudio, difieren parcialmente, de los resultados presentados por Wang y col. (14), en población china. En ese trabajo (14), la frecuencia del alelo STin2.10 se asoció con el diagnóstico de asma. Ambos estudios difieren con los reportados por Farjadian y col. (13) en una población pediátrica iraní con

TABLA VII
ANÁLISIS SIMPLE DE LOS HAPLOTIPOS STin2- MUC7 VNTR

	Haplotipo	Asma	EPOC	Control	OR Asma (p)	OR EPOC (p)
	9/9-6/6	2	5	7	0,86 (0,9)	0,9 (0,9)
	9/9-5/6	0	1	1	0,98 (0,9)	1 (1)
	9/10-6/6	0	4	3	0,65 (0,5)	1 (1)
	9/10-5/6	0	3	2	0,63 (0,8)	1 (1)
	9/12-6/6	0	4	2	0,72 (0,6)	1,1 (0,9)
STin2	9/12-5/6	0	1	0	1 (1)	1 (1)
VNTR	10/10-5/5	1	0	1	1 (1)	1(1)
MUC7	10/10-6/6	31	9	19	1,6 (0,02)	0,3 (0,006)
VNTR	10/10-5/6	2	1	4	0,9 (0,9)	0,7 (0,9)
	12/12-5/5	1	3	1	0,8 (1)	1 (1)
	12/12-6/6	34	23	26	1,2 (0,5)	1 (1)
	12/12-5/6	7	7	10	1,1 (0,9)	1,1 (0,9)
	10/12-5/5	3	2	1	1 (1)	1 (1)
	10/12-6/6	5	18	4	1 (1)	3,7 (0,002)
	10/12-6/6	1	5	2	1 (1)	1,5 (0,4)

asma leve a moderada donde no se encontró asociación alguna con la enfermedad. Es posible que las discrepancias entre estos 3 estudios se deban a diferencias étnicas de las poblaciones estudiadas, así como la diferencia etaria de los grupos. El presente estudio es el único en analizar los diferentes genotipos entre pacientes asmáticos, EPOC y controles.

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre los genotipos VNTR de STin2 y ambas enfermedades ($p < 0,001$); sin embargo, el análisis post-hoc de los OR no estableció diferencia entre genotipos y el riesgo de diagnóstico de asma. Dos de los genotipos presentaron OR estadísticamente significativos para EPOC. STin2.10/12 tuvo un OR de 3,64 (IC 95%: 1,54-8,57) y STin2.10/10 un OR de 0,33 (IC 95%: 0,16-0,68) para riesgo de EPOC.

Por lo tanto, STin2.10/12 parece un factor de riesgo genético, y STin2.10/10 un factor protector, para la presentación de EPOC en la población venezolana. Los alelos que conforman estos genotipos también estuvieron asociados a un riesgo disminuido (STin2.10 con un OR de 0,64) o aumentado (STin2.12 con un OR de 1,5) para riesgo de EPOC, consistente con los OR de los genotipos en lo que están presentes. En la literatura no se encontraron estudios de asociación previos entre los VNTR de STin2 y EPOC.

La transcripción y secreción de MUC7 por células epiteliales respiratorias está relacionado a procesos infecciosos, a contaminantes ambientales y al humo de cigarrillo (35-39). En asma, la hipersecreción mucosa se debe principalmente a la metaplasia del epitelio mucoso; las glándulas submucosas (secretoras de MUC7) sólo

sufren modificaciones en las formas severas de la enfermedad (40). MUC7 está involucrada en la fisiopatología del asma, está presente en las secreciones de las vías respiratorias de niños asmáticos y no en controles sanos (41).

En la población analizada, el alelo MUC7*6 (86,06 %) fue más común que MUC7*5 (13,94%). Se han reportado los alelos MUC7*4 y MUC7*8, pero estos no fueron encontrados en este estudio. No se encontró asociación entre los genotipos o alelos de MUC7 en ninguno de los grupos estudiados.

Kirkbride y col. (25), en pacientes con ascendencia europea, India, Medio Oriente y africana, Watson y col. (26) en una población de afroamericanos estadounidenses, y Rousseau y col. (27) en una cohorte con ancestros del norte de Europa, reportaron un menor riesgo de presentar asma en los sujetos portadores del alelo MUC7*5. Rousseau y col. (27) encontraron un riesgo aumentado de presentar asma en los sujetos con genotipo MUC7*6. Así mismo, los pacientes portadores del alelo MUC7*5 tuvieron menor caída del VEF1 en 10 años (25).

A pesar que los estudios concuerdan que MUC7*5 es un factor protector para asma, en la población estudiada, no se observó una diferencia significativa. Es de hacer notar que en la literatura no se encontraron estudios de asociación entre los VNTR de MUC7 y EPOC.

El estudio de haplotipos nos permitió definir una posible asociación de las variantes polimórficas de STin2 con MUC7. Todas las frecuencias significativas de STin2 estuvieron asociadas al polimorfismo 6/6, mencionado anteriormente como factor de riesgo en asma (25-27). Por otra parte, el haplotipo 10/12-6/6 está marcadamente asociado con diagnóstico de EPOC. Sin embargo, el haplotipo STin2.10/10-6/6 es más frecuente en asmáticos y poco frecuente en EPOC, sugiriendo que el mecanismo fisiopatológico asociado a cada uno pudiera estar relacionado con la producción de mucina inducida por sero-

tonina. En la Fig. 1 se observa claramente como el genotipo 10/12 está asociado con EPOC y el 10/10 con asma. Sería interesante analizar si dichos haplotipos permiten diferenciar las patologías puras de las solapadas. El abordaje terapéutico y la respuesta al mismo en estos tres grupos difieren considerablemente.

La comprensión de los eventos desencadenantes de la broncoconstricción y la hipersecreción mucosa permiten un mejor abordaje terapéutico dependiendo del fenotipo y el estadio de la patología. En la actualidad, la coexistencia de asma y EPOC en un mismo paciente representa una población de interés para ser estudiada. Es frecuente ver la coexistencia de ambas patologías en la práctica médica. Los polimorfismos de STin2 y MUC7 pudieran ser un punto de encuentro en la fisiopatología de estas enfermedades.

Se concluye que en la población mestiza venezolana: 1) la presencia del STin2.10/10 es un factor de protección genética para EPOC, 2) el genotipo STin2.10/12 está asociado a un riesgo aumentado para EPOC, 3) el alelo STin2.9 es un factor de protección genética para asma, 4) no hubo asociación entre los VNTR de MUC7 en asma o EPOC, 5) el haplotipo STin2/MUC7 10/10-6/6 se relaciona con riesgo en asma y protección en EPOC, 6) el haplotipo 10/12-6/6 es un factor de riesgo para EPOC.

Se recomienda realizar estudios con mayor población para analizar el impacto de estas mutaciones en la población.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela por el programa estudiante investigador (Diego Lema) y el complemento financiero correspondiente. Financiado parcialmente por Proyecto CDCH PG 09-8803-2013/1 y FO-

NACIT G200500389.

REFERENCIAS

1. **Global Initiative for Asthma.** Guide for Asthma Management and Prevention. 2014. (<http://www.ginasthma.org/>).
2. **Wenzel SE.** Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012; 18(5):716-725.
3. **GOLD Committee.** Global Initiative for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Feb 2015. (<http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html>).
4. **Vercelli D.** Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008 8(3):169-182.
5. **Nakamura H.** Genetics of COPD. *Allergol Int* 2011; 60(3):253-258.
6. **Berger M, Gray JA, Roth BL.** The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009;60:355-366.
7. **Arreola R, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Velasco-Velázquez MA, Garcés-Alvarez ME, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabian S, Pavón L.** Immuno modulatory effects mediated by serotonin. *J Immunol Res* 2015; 2015:354957.
8. **Idzko M, Pitchford S, Page C.** Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(6):1416-1423.
9. **Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD.** Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 2013; 121(6):1008-1015.
10. **Müller T, Dürk T, Blumenthal B, Grimm M, Cicko S, Panther E, Sorichter S, He-rouy Y, Di Virgilio F, Ferrari D, Norgauer J, Idzko M.** 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-Cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009; 4(7): e6453.
11. **Nau F Jr, Yu B, Martin D, Nichols CD.** Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo. *PLoS One* 2013; 8(10): e75426.
12. **Murphy DL, Moya PR.** Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G \times G and G \times E differences in health and disease. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11(1):3-10.
13. **Farjadian S, Moghtaderi M, Fakhraei B, Nasiri M, Farjam M.** Association between serotonin transporter gene polymorphisms and childhood asthma. *J Asthma*. 2013;50(10):1031-1035.
14. **Wang L, Mo ZC, Wang Y, Ji YL.** Association of 5-hydroxytryptamine transporter gene polymorphism with asthma and comorbid depression. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2009;26(5):575-579.
15. **Pizzo de Castro MR, Maes M, Guembarovski RL, Ariza CB, Oda JM, Vargas HO, Piccoli de Melo LG, Watanabe MA, Berk M, Maes M.** SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study. *BMC Genet* 2014; 15:78
16. **Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, Darteville P, Housset B, Hamon M, Weitzenblum E, Adnot S.** Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003; 108(15):1839-1844.

17. **Ulrich S, Hersberger M, Fischler M, Nussbaumer-Ochsner Y, Treder U, Rus-si EW, Speich R.** Genetic polymorphisms of the serotonin transporter, but not the 2a receptor or nitric oxide synthetase, are associated with pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2010; 79(4):288-295.
18. **Voynow JA, Rubin BK.** Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009; 135(2):505-512.
19. **Guo X, Pace RG, Stonebraker JR, Com-mander CW, Dang AT, Drumm ML, Ha-rris A, Zou F, Swallow DM, Wright FA, O'Neal WK, Knowles MR.** Mucin variable number tandem repeat polymorphisms and severity of cystic fibrosis lung disease: significant association with MUC5AC. *PLoS One* 2011;6(10):e25452.
20. **Costa NR, Mendes N, Marcos NT, Reis CA, Caffrey T, Hollingsworth MA, Santos-Silva F.** Relevance of MUC1 mucin variable number of tandem repeats poly-morphism in *H pylori* adhesion to gas-tric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2008;14(9):1411-1414.
21. **Cascio S, Zhang L, Finn OJ.** MUC1 pro-tein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear fac-tor- κ B p65 and binding to cytokine promo-ters: importance of extracellular domain. *J Biol Chem* 2011;286(49):42248-42256.
22. **Fahy JV, Dickey BF.** Airway mucus func-tion and dysfunction. *N Engl J Med* 2010; 363:2233-2247.
23. **Lu W, Zhang J.** The function of mucins in the COPD airway. *Curr Pulmonol Rep*, 2013,2: 155-166.
24. **Martínez-Antón A, Debolós C, Garrido M, Roca-Ferrer J, Barranco C, Alobid I, Xaubet A, Picado C, Mullol J.** Mucin genes have different expression patterns in healthy and diseased upper airway mucosa. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(4):448-457.
25. **Kirkbride, HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash MW, Moss FM, Mitche-ll DM, Swallow DM.** Genetic polymor-phism of MUC7: Allele frequencies and association with asthma. *Eur J Hum Gen* 2001;9:347-354.
26. **Watson AM, Ngor WM, Gordish-Dress-man H, Freishtat RJ, Rose MC.** MUC7 polymorphisms are associated with a de-creased risk of a diagnosis of asthma in an African American population. *J Investig Med* 2009;57(8):882-886.
27. **Rousseau K, Vinall LE, Butterworth SL, Hardy RJ, Holloway J, Wadsworth ME, Swallow DM.** MUC7 haplotype analysis: results from a longitudinal birth cohort sup-port protective effect of the MUC7*5 alle-le on respiratory function. *Ann Hum Genet* 2006;70(Pt 4):417-427.
28. **Green MR, Sandbrook J.** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 4th ed. Vol. 1. Pag 1-14. (<http://www.molecular-cloning.com>).
29. **Moore BD, Hyde DM, Miller LA, Wong EM, Schelegle ES.** Persistence of seroto-nergic enhancement of airway response in a model of childhood asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51(1):77-85.
30. **Ahangari G, Koochak SE, Amirabad LM, Deilami GD.** Investigation of 5-HT2A gene expression in PBMCs of patients with allergic asthma. *Inflamm Allergy Drug Tar-gets* 2015;14(1):60-64.
31. **Lechin F, van der Dijns B, Orozco B, Jara H, Rada I, Lechin ME, Lechin AE.** The serotonin uptake-enhancing drug tiane-pine suppresses asthmatic symptoms in children: a double-blind, crossover, pla-cebo-controlled study. *J Clin Pharmacol* 1998;38(10):918-925.
32. **Lau WK, Chan-Yeung MM, Yip BH,**

- Cheung AH, Ip MS, Mak JC; COPD Study Group of the Hong Kong Thoracic Society.** The role of circulating serotonin in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2012; 7(2):e31617.
33. **Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, Vestbo J, Lomas DA, Calverley PM, Wouters E, Crim C, Yates JC, Silverman EK, Coxson HO, Bakke P, Mayer RJ, Celli B.** Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One* 2012;7(5):e37483.
34. **Mercado CP, Kilic F.** Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Molecular Interventions* 2010;10(4):231-241.
35. **Whitsett JA, Alenghat T.** Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2014 ; 16(1): 27-35.
36. **Roy M, Livraghi-Butrico A, Fletcher AA McElwee MM4, Evans SE, Boerner RM, Alexander SN, Bellinghausen LK, Song AS, Petrova YM, Tuvim MJ, Adachi R, Romo I, Bordt AS, Bowden MG, Sisson JH, Woodruff PG, Thornton DJ, Rousseau K, De la Garza MM, Moghaddam SJ, Karmouty-Quintana H, Blackburn MR, Drouin SM, Davis CW, Terrell KA, Grubb BR, O'Neal WK, Flores SC, Cota-Gomez A, Lozupone CA, Donnelly JM, Watson AM, Hennessy CE, Keith RC, Yang IV, Barthel L, Henson PM, Janssen WJ, Schwartz DA, Boucher RC, Dickey BF, Evans CM.** Muc5b is required for airway defense. *Nature* 2014;505(7483): 412-416.
37. **Leikauf GD, Borchers MT, Proas DR, Simpson LG.** Mucin apoprotein expression in COPD. *Chest* 2002; 121 (5 Suppl): 166S-182S.
38. **Li S, Bobek LA.** Functional analysis of human MUC7 mucin gene 5'-flanking region in lung epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2006;35(5):593-601.
39. **Fan H, Bobek LA.** Regulation of human MUC7 mucin gene expression by cigarette smoke extract or cigarette smoke and *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in human airway epithelial cells and in MUC7 transgenic mice. *The Op Resp Med J* 2010;4:63-70.
40. **Green TD, Crews AL, Park J, Fang S, Adler KB.** Regulation of mucin secretion and inflammation in asthma: a role for MARCKS protein? *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(11):1110-1113.
41. **Watson A, Troxler RF, Pena, A.** MUC7 mucin glycoprotein is present in airway secretions of asthmatic, but not control, patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(A465).