



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL  
COSÍO VILLEGAS

**Expresión de carboxipeptidasas en células del epitelio respiratorio en  
pacientes con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina.**

**T E S I S**

*PARA OBTENER EL TÍTULO DE*

**ESPECIALISTA EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

PRESENTA  
**Alejandrina López Parra**

TUTORES: **Dr. Fernando Ramírez Jiménez**  
**Dr. Luis Manuel Terán Juárez**

COTUTOR: **M. C. Priyadharshini Vellore Suresh Kumar**

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dr. Juan Carlos Vázquez García  
Director de Enseñanza

---

Dra. Margarita Fernández Vega  
Subdirectora de Enseñanza

---

Dra. María del Carmen Cano Salas  
Jefa del Departamento de Formación de Posgrado

---

Dr. Luis Manuel Terán Juárez Profesor  
Titular de la Especialidad en Alergia e Inmunología Clínica

---

Dr. Fernando Ramírez Jiménez  
Asesor de Tesis

---

M. C. Priyadharshini Vellore Suresh Kumar  
Cotutor de tesis

Agradecimientos:

Especial agradecimiento al servicio de Otorrinolaringología (Dr. Alejandro Jiménez Chobillón) por las muestras proporcionadas durante procedimientos quirúrgicos.

## ÍNDICE

<b><u>ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO</u></b>	<b><u>5</u></b>
DEFINICIÓN ENFERMEDAD RESPIRATORIA EXACERBADA POR ASPIRINA	5
FISIOPATOLOGÍA	5
GENÉTICA Y EREA	8
CARBOXIPEPTIDASAS	8
CÉLULAS EPITELIALES	13
TRANSCRIPTOMA	15
SECUENCIACIÓN MASIVA	16
<b><u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>JUSTIFICACIÓN</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>HIPÓTESIS</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b><u>36</u></b>

## **ANTECEDENTES**

### **Definición EREA**

La enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA) se caracteriza por la tríada de Samter que incluye asma, rinosinusitis crónica y pólipos nasales, que se exacerbaban tras la ingestión de inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) -1 tales como aspirina y antiinflamatorios no esteroideos (AINES). (1)

Los síntomas y signos son producidos por reacciones pseudoalérgicas o no mediadas por IgE, y con frecuencia son lo suficientemente graves y difíciles de tratar, para considerar la enfermedad como un trastorno agresivo, potencialmente mortal y crónico. (2,3)

La hipersensibilidad a AINE está presente en 7% de los pacientes asmáticos adultos. Aproximadamente 14% de los pacientes con asma grave tienen EREA y esta puede presentarse sin antecedentes de atopía, asma o rinitis(4), usualmente desarrollándose en la tercera y cuarta décadas de la vida, siendo su prevalencia mayor en mujeres.

Se ha reportado una prevalencia del 16% de EREA entre los pacientes con rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal (CRSwNP). La atopía es significativamente más prevalente en pacientes con EREA (84%) o asma (85%) que en aquellos sujetos portadores de otros endotipos de CRSwNP (66%); sin embargo, en otros estudios, la presencia de atopía solo se presenta en el 30-34% de pacientes con EREA, similar a la población general. (5-7)

### **Fisiopatología**

Existen factores genéticos y ambientales que participan en el desarrollo de la enfermedad.

Las enzimas COX y 5-lipoxigenasa (5-LO) actúan como interruptores críticos para regular la producción de prostanoideos y leucotrienos, respectivamente, a partir de

un conjunto común de precursores de ácido araquidónico, la regulación de estas y otras enzimas involucradas en el metabolismo de los eicosanoides son importantes en la patogénesis de la EREA. (1)

El mecanismo subyacente más conocido de la EREA es la desregulación en el metabolismo del ácido araquidónico. (8). Se sabe que los inhibidores de la COX cambian el metabolismo del ácido araquidónico de la COX a la ruta de la 5-lipoxigenasa (5-LO) o ALOX5, aumentando la producción de cisteinil leucotrienos (CysLTs), con disminución de la prostaglandina E2 produciendo broncoconstricción e inflamación de las vías respiratorias.(9,10).

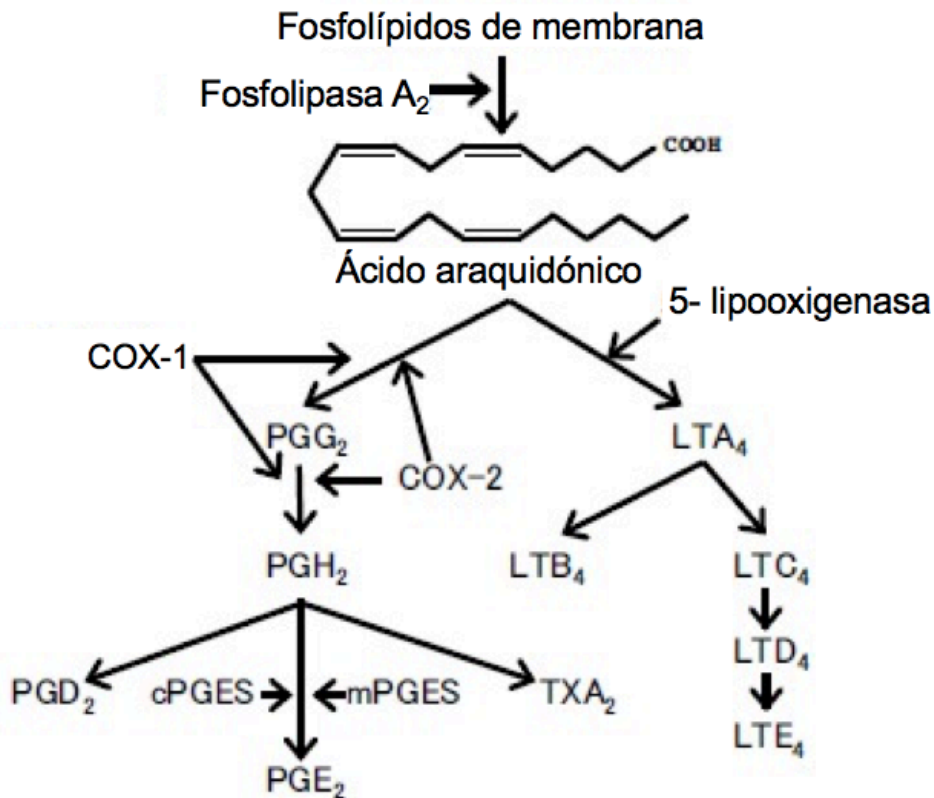
La COX-1 y COX-2 son prostaglandinas sintetasas que convierten el ácido araquidónico en prostaglandina H2, la cuál actúa como puerta de entrada a la síntesis de varios prostanoides, incluidas otras prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. La prostaglandina E2 tiene efectos pleiotrópicos mediados por cuatro diferentes receptores acoplados a proteína G (EP1-EP4); sin embargo, actuando a través del receptor EP2, ejerce efectos antiinflamatorios relevantes para EREA al afectar la activación de los eosinófilos y la degranulación de los mastocitos, también previene la contracción del músculo liso, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular. (11)

Los productos de la vía 5-lipoxigenasa se encuentran aumentados, se han detectado tres mediadores lipídicos distintos que contribuyen a la broncoconstricción observada en modelos experimentales. El LTA4 sintetizado se transforma en LTB4 por la LTA4 hidrolasa (LTA4H) y posteriormente se conjuga con el leucotrieno C4 sintetasa dependiente de calcio (LTC4S) para formar LTC4, una proteína caracterizada por varias cadenas de aminoácidos en su región terminal que puede degradarse por proteínas del citoplasma, modificando así la conformación proteica transformándola en LTD4 y LTE4. (12) (Figura 1)

La señalización está mediada, al menos en parte, a través de los receptores CysLT1 y CysLT2 acoplados a proteína G. Los niveles de LTE4 se encuentran elevados en la orina y las secreciones respiratorias de los sujetos con EREA y aumentan aún más con la provocación con aspirina. (1)

La mayoría de los estudios han demostrado un entorno de citoquinas y quimioquinas compatible con un perfil Th2; sin embargo estudios recientes sugieren un papel importante del IFN- $\gamma$  también. El ARNm de IL-4 e IFN- $\gamma$ , pero no IL-5 o IL-13, están regulados positivamente en el tejido de pólipo de EREA ya que los eosinófilos son la fuente primaria de estas citocinas. Tanto IL-4 como IFN- $\gamma$  aumentan la expresión de LTC<sub>4</sub> S en mastocitos y eosinófilos. (13)

IL-33 y TSLP pueden ser otras citoquinas importantes implicadas en la patogénesis de la EREA. Estas citoquinas similares a alarmina están reguladas positivamente en la capa epitelial de la vía aérea y se ha demostrado que son dependiente sde la expresión de CysLT en modelos de ratón. Son capaces de funcionar como un mediador de la activación de mastocitos para producir PGD<sub>2</sub>. Como una citoquina innata, IL-33 representa otro mecanismo para explicar la implicación eosinofílica y de mastocitos en ausencia de atopía mediada por IgE. (14, 15)



**Figura 1.- Metabolismo del ácido araquidónico, vía de la ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa.** Modificado de Masamichi Yamashita. Aspirin Intolerance: Experimental Models for Bed-to-Bench. Current Drug Targets (2016) 17: 1963.



## **Genética y EREA**

Estudios genéticos han revelado evidencia considerable de variación genética en la fisiopatología de la ERA en múltiples vías biológicas.

Durante las últimas dos décadas, muchos estudios de asociación genética han demostrado una fuerte asociación de variantes genéticas en genes biológicamente plausibles responsables del metabolismo del ácido araquidónico, que incluyen LTC4S, ALOX5, CYSLT1R, CYSLT2R, PTGER, TBXAS1 y TBXA2R , con el desarrollo de EREA. Otros estudios también identificaron que los genes en la respuesta inmune y las vías inflamatorias se asociaron con la reacción adversa a la aspirina, incluidos HLA-DPB1 IL-4, T-Box, FcepsilonR1, TLR3, NLRP3, ADAM33, ADORA1, ACE, CRTH2, PPARG, KIF3A, SLC6A12, SLC22A2 y CACNG6. Estos hallazgos sugieren que la variación genética adicional en las vías extra-araquidonato podría estar relacionada con el desarrollo de EREA.

La LTC4 sintasa y el ALOX5 son proteínas implicadas en la fisiopatología de esta enfermedad. La LTC4 sintasa está codificada por el gen LTC4S ubicado en el cromosoma 5 (5q35), una región que también codifica las citoquinas inflamatorias que participan en los factores que integran la ERGE, como el factor estimulante de granulocitos (FSCGM), IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y el receptor  $\beta$ -adrenérgico. (16) La mayoría de los estudios de asociación genética han agrupado los estudios de polimorfismos en cinco categorías: (1) SNP implicados en el metabolismo del AA, (2) HLA, (3) disfunción epitelial, (4) inflamación y (5) metabolismo del ácido acetilsalicílico. Sin embargo, nuevas estrategias genéticas como GWAS ayudaron a crear hipótesis sobre la participación de factores genéticos para esta entidad.(16)

## **Carboxipeptidasas**

Las primeras carboxipeptidasas estudiadas fueron aquellas involucradas en la digestión de alimentos (carboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B). Sin embargo, la mayoría de las carboxipeptidasas conocidas no están implicadas en el catabolismo; ayudan a las proteínas maduras (por ejemplo, modificación

postraduccion) o regulan procesos biológicos. Por ejemplo, la biosíntesis de péptidos neuroendocrinos como la insulina requiere una carboxipeptidasa. Las carboxipeptidasas también funcionan en la coagulación de la sangre, la producción del factor de crecimiento, la cicatrización de heridas, la reproducción y muchos otros procesos. Las metalocarboxipeptidasas son exoproteasas dependientes de zinc que hidrolizan los residuos de aminoácidos C-terminales. Con base a homologías estructurales, se pueden distinguir dos familias de metalocarboxipeptidasas: la familia A / B (que incluye carboxipeptidasa (CP) pancreática A y CPB, CPU y CPO) y la familia N / E (incluidas CPN, CPD, CPE, CPM, CPZ y CPX) . (17) También es posible una subdivisión alternativa basada en la participación de las enzimas en procesos fisiológicos específicos: las carboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B normalmente funcionan solo como enzimas digestivas, mientras que el resto de carboxipeptidasas de mamíferos, incluida la carboxipeptidasa A de células cebadas y carboxipeptidasa U (o carboxipeptidasa B de plasma), ejercen su acción en diversos procesos fisiológicos, principalmente en tejidos y fluidos no digestivos, y se los ha denominado "carboxipeptidasas reguladoras" debido a su participación en reacciones de procesamiento más selectivas. El papel de la carboxipeptidasa A puede estar relacionado con afecciones patológicas en las que se han implicado mastocitos, como respuestas alérgicas, inflamación y otras.

Con respecto a la especificidad de escisión, las carboxipeptidasas de tipo CPA tienen especificidad para escindir restos alifáticos C-terminales y ramificados, variantes de tipo CPB tienen especificidad para residuos de aminoácidos básicos, y las enzimas similares a CPO muestran especificidad por residuos ácidos C-terminales. Las carboxipeptidasas se han identificado en mastocitos humanos y murinos. Las carboxipeptidasas de mastocito tienen un peso molecular de 30 - 35 kDa y una actividad óptima a pH neutro a básico (7 - 9). (18)

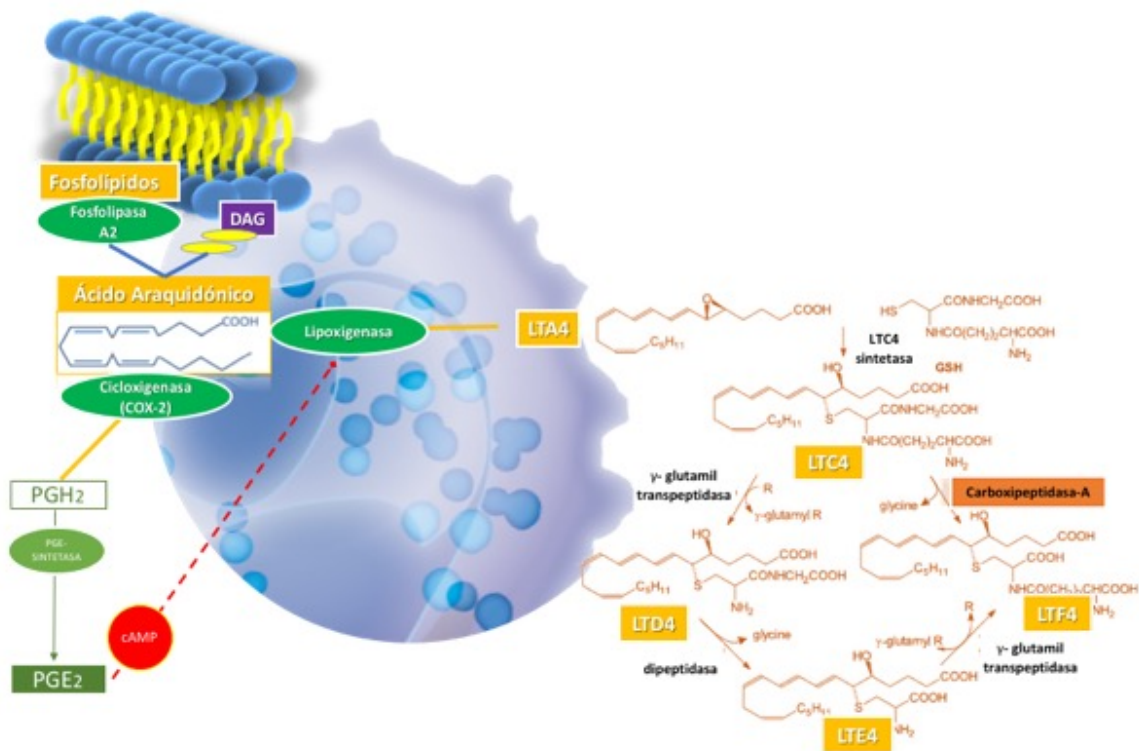
Las células cebadas juegan un papel importante como células efectoras en el asma y los trastornos alérgicos a través de mecanismos dependientes de IgG y / o IgE para liberar cantidades significativas de carboxipeptidasas y otras proteasas. (19)

Otros mediadores como histaminas, proteoglicanos, leucotrienos y prostaglandinas son producidos por los mastocitos para provocar el reclutamiento de neutrófilos y una mejor permeabilidad vascular. Los mastocitos sintetizan y almacenan en sus gránulos secretores grandes cantidades de serina proteasas, incluida la carboxipeptidasa A (CPA).(20) Sin embargo, el papel de las proteasas de mastocitos en las respuestas inflamatorias y / o inmunológicas aún no se entiende claramente.

En 2003 se realizó un estudio experimental en donde se identificó la capacidad de la CPA pancreática bovina, la cual comparte una homología de secuencia significativa con CPA de mastocitos de rata (particularmente con respecto a la conservación de residuos funcionales de aminoácidos en el sitio activo), para catalizar la conversión directa de LTC<sub>4</sub> a LTF<sub>4</sub>.

Es bien sabido que el 5,6-LTC<sub>4</sub> es un bronco- y vasoconstrictor potente y participa en varios procesos inflamatorios y de hipersensibilidad. Por otro lado, se ha informado que el leucotrieno F<sub>4</sub> es el LT de cisteinilo menos potente; por lo tanto, la transformación catalizada por CPA de 5,6-LTC<sub>4</sub> a 5,6-LTF<sub>4</sub> puede representar un mecanismo homeostático celular para eliminar estos mediadores lipídicos altamente reactivos producidos en el tejido conjuntivo y periférico por los mastocitos. De hecho, en comparación con LTC<sub>4</sub>; D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>, se ha demostrado que el LTF<sub>4</sub> es un agonista relativamente débil de la contracción del músculo liso ileal de cobayo.

Se ha postulado que la carboxipeptidasa presente en los gránulos de los mastocitos participa en los procesos inflamatorios tisulares. Es concebible que el CPA pueda estar involucrada en el metabolismo de 5,6-LTC<sub>4</sub>, que se produce durante las respuestas inflamatorias, a 5,6-LTF<sub>4</sub>, un mediador menos potente. (21) (Figura 2)



**Figura 2.- Carboxipeptidasas en la vía de los leucotrienos.**

Las células cebadas pueden ser activadas por una multitud de mecanismos que incluyen unión a IgE, exposición a anafilatoxinas o péptidos bioactivos, además de estímulo del receptor Toll-like (TLR). Esto a menudo conduce a la degranulación de compuestos preformados almacenados en el gránulo secretor de los mastocitos. Estos mediadores incluyen histamina, serotonina, citocinas, diversas enzimas lisosómicas, proteoglicanos de serglicina y grandes cantidades de varias proteasas específicas: quimasas, triptasas y MC carboxipeptidasa A (MC-CPA). (22) Además, la activación de mastocitos puede conducir a la síntesis de novo de una variedad de compuestos, incluidas las citoquinas y los mediadores lipídicos, como la prostaglandina D<sub>2</sub> y el LTC<sub>4</sub>. (23)

Se han descrito numerosos genes relacionados con las carboxipeptidasas. (Tabla 1)

**Tabla 1.- Genes relacionados con carboxipeptidasas**

Símbolo aprobado	Nombre aprobado	Sinónimo	Cromosoma
AEBP1	AE proteína de unión 1	ACLP	7p13
AGBL1	ATP/GTP proteína de unión tipo 1	FLJ32310, CCP4	15q25.3
AGBL2	ATP/GTP proteína de unión tipo 2	FLJ23598, CCP2	11p11.2
AGBL3	ATP/GTP proteína de unión tipo 3	MGC32955, CCP3	7q33
AGBL4	ATP/GTP proteína de unión tipo 4	FLJ14442, CCP6	1p33
AGBL5	ATP/GTP proteína de unión tipo 5	FLJ21839, CCP5	2p23.3
AGTPBP1	ATP/GTP proteína de unión 1	KIAA1035, Nna1, CCP1	9q21.33
CPA1	Carboxipeptidasa A1		7q32.2
CPA2	Carboxipeptidasa A2		7q32.2
CPA3	Carboxipeptidasa A3		3q24
CPA4	Carboxipeptidasa A4	CPA3	7q32.2
CPA5	Carboxipeptidasa A5		7q32.2
CPA6	Carboxipeptidasa A6	CPAH	8q13.2
CPB1	Carboxipeptidasa B1		3q24
CPB2	Carboxipeptidasa B2	CPU, PCPB, TAFI	13q14.13
CPD	Carboxipeptidasa D	GP180	17q11.2
CPE	Carboxipeptidasa E		4q32.3
CPM	Carboxipeptidasa M		12q15
CPN1	Carboxipeptidasa N subunidad 1		10q24.2
CPN2	Carboxipeptidasa N subunidad 2		3q29
CPO	Carboxipeptidasa O		2q33.3
CPQ	Carboxipeptidasa Q	LDP, PGCP	8q22.1
CPVL	Carboxipeptidasa tipo vitelogénica		7p14.3
CPXM1	Carboxipeptidasa X, miembro 1 familia 14	CPX-1, CPX1	20p13
CPXM2	Carboxipeptidasa X, miembro 2 familia 14	UNQ676, CPX2	10q26.13
CPZ	Carboxipeptidasa Z		4p16.1
PRCP	Prolicarboxipeptidasa	PCP, HUMPCP	11q14
SCPEP1	Carboxipeptidasa serina 1	RISC	17q22

## **Células epiteliales**

El epitelio de las vías aéreas conductoras es una capa epitelial pseudoestratificada que comprende células basales, ciliadas y secretoras. Las células epiteliales ya no se consideran una mera barrera física en los sitios de la mucosa, también desempeñan un papel clave en el inicio y la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

La capa mucociliar y los complejos de adhesión intercelulares proporcionan una función de barrera física. Las uniones estrechas (zonula occludens) localizadas entre los ápices de las células adyacentes restringen la difusión paracelular de electrolitos y otras moléculas

El epitelio puede producir una variedad increíblemente diversa de mediadores lipídicos, factores de crecimiento y péptidos broncoconstrictores, así como quimiocinas y citoquinas.

El epitelio es una fuente importante de metabolitos de ácido araquidónico, La ciclooxigenasa, la lipoxigenasa (LO) y la monooxigenasa son las tres enzimas principales responsables de la síntesis de eicosanoides en el epitelio de la vía aérea humana.

Además, las células inmunes, las células inflamatorias y las células fagocíticas migran y permanecen dentro del epitelio o pasan a través del lumen.

El repertorio de mediadores que las células epiteliales pueden producir, basalmente y después de la estimulación, indican su papel central en la modulación de la función de la vía aérea.

La respuesta de las células epiteliales nasales a diversos estímulos, como alérgenos inhalados y desencadenantes no alérgicos, puede desempeñar un papel en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas. Un ejemplo de esto es un estudio en el que se realizó cultivo de células epiteliales derivadas de pólipos nasales de pacientes con rinosinusitis crónica y pólipos nasales en donde se observó que las células liberan TSLP e IL-25 cuando se estimulan específicamente por poli (I: C) (análogo sintético de dsRNA viral, que se ha demostrado que imita de cerca las respuestas inflamatorias asociadas con la infección viral de las células

epiteliales de las vías respiratorias), mientras que no se pueden activar mediante la estimulación con *Dermatophagoides pteronyssinus* o extractos de *Aspergillus fumigatus*, lo que sugiere que las infecciones virales pueden mejorar la respuesta inmunológica T2 de los pólipos nasales a través de la liberación de TSLP e IL-25 por las células epiteliales.(24)

Al estar en la interfaz entre las exposiciones ambientales y el tejido subyacente, las células epiteliales de las vías respiratorias son candidatas ideales como informadoras de la patogénesis del tejido subyacente. En consecuencia las células epiteliales de las vías respiratorias se han aplicado en múltiples estudios transcriptómicos para desarrollar biomarcadores clínicamente relevantes, lo que en última instancia conduce a la terapia guiada por biomarcadores. Además, los perfiles de expresión génica pueden considerarse clínicamente en múltiples puntos de tiempo durante el curso del tratamiento para estudiar marcadores intermedios de eficacia terapéutica. (25)

La disfunción epitelial es una característica común en asma, la rinitis, la rinosinusitis crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y otras enfermedades de las vías respiratorias. En algunos casos, las deficiencias en la capacidad del epitelio para mantener la barrera inmunológica y física podrían desempeñar un papel en la susceptibilidad a estas enfermedades. Una mejor comprensión de la disfunción epitelial ayudará a identificar nuevas vías y estrategias terapéuticas en la patogenia de estas. Por ejemplo, estudios de las células epiteliales nasales en adultos y pacientes pediátricos han sido utilizadas previamente para la descripción del transcriptoma. Estos estudios han demostrado generalmente que las células epiteliales capturan ampliamente la expresión génica con relevancia para las vías respiratorias, y pueden detectar cambios asociados a la enfermedad en la expresión génica. Es probable que las respuestas de las células residentes desempeñen un papel clave en la determinación de la gravedad de la enfermedad respiratoria. (26,27)

El desarrollo de los sistemas de cultivo de células epiteliales de las vías respiratorias humanas ha hecho una contribución importante a nuestro conocimiento de las células epiteliales de las vías respiratorias. Estos sistemas celulares in vitro han permitido analizar los mecanismos bioquímicos y genéticos subyacentes a múltiples vías celulares. Además, estos sistemas de cultivo celular nos han dado la capacidad de discernir algunas de las causas de la enfermedad de las vías respiratorias.<sup>29</sup> En consecuencia, los cultivos de células epiteliales de las vías respiratorias pueden ser un modelo adecuado para el estudio de la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina.

### **Expresión de genes, transcriptoma**

Aunque el transcriptoma constituye menos del 4% del ARN celular total, es el componente más significativo porque contiene los ARN codificantes que especifican la composición del proteoma y por lo tanto determinan la capacidad bioquímica de la célula. El transcriptoma es el conjunto de genes transcritos en una célula y/o organismo el cual puede variar de acuerdo a diferentes condiciones fisiológicas y su análisis permite entender los componentes moleculares de células y tejidos que condicionan la enfermedad (28)

El transcriptoma comprende el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado en una célula, contiene información sobre todos los ARN transcritos por el genoma en un tipo específico de tejido o célula, en una determinada etapa de desarrollo y bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. Es capaz de detectar RNAs con expresiones muy bajas e identificar nuevos objetivos no reconocidos, así como proporcionar información más detallada. (29,30)



## **Secuenciación masiva (RNA-Seq)**

La técnica RNA-seq, también llamada secuenciación masiva, se refiere al uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para caracterizar el contenido de ARN y la composición de una muestra dada con la capacidad de leer cientos de megabases o gigabases de secuencias a la vez.

Con la evolución de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, el uso de la secuenciación de ARN (ARN-seq) para investigar la gran diversidad de especies de ARN abre oportunidades completamente nuevas para mejorar el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades. RNA-seq proporciona una vista en profundidad del transcriptoma, detectando una nueva variación de transcripción de ARN. RNA-seq tiene una serie de ventajas potenciales sobre los microarreglos de expresión génica, incluyendo un mayor rango dinámico de expresión, medición de cambios focales (como variantes de nucleótido único (SNV), inserciones y deleciones), detección de diferentes isoformas de transcripción, variantes de empalme y fusiones de genes quiméricos (incluidos los genes y / o transcritos previamente no identificados), y, fundamentalmente, se puede realizar en cualquier especie. (30)

RNA-seq no solo puede detectar alteraciones genómicas subyacentes en la resolución de un solo nucleótido dentro de las regiones expresadas del genoma, sino que también puede cuantificar los niveles de expresión y capturar la variación no detectada a nivel genómico, incluida la expresión de transcripciones alternativas. A diferencia de la mayoría de las plataformas históricas para la medición de ARN clínico, como microarreglos y PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR), RNA-seq es fundamentalmente una tecnología de plataforma abierta, que permite la cuantificación de especies de ARN conocidas o predefinidas y la capacidad de detectar y cuantificar variantes de transcripción de ARN raras y nuevas dentro de una muestra. (31)

Se espera que al comprender las diferencias entre los transcriptomas de células normales y enfermas será posible idear nuevas formas de tratamiento.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los recientes descubrimientos que han arrojado los estudios de asociación genética han demostrado nuevos genes candidato, sin que esto signifique que tengan una participación en su expresión. Conociendo las funciones de las carboxipeptidasas y su papel en múltiples procesos celulares es posible que la expresión de los genes que las codifican se manifiesten en enfermedades respiratorias tales como la Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina. Se prevé que las aplicaciones de la secuenciación de todo el transcriptoma en búsqueda de la expresión de los genes relacionados con las carboxipeptidasas aumenten la probabilidad de detectar nuevas variantes potencialmente funcionales y aumentar el conjunto de loci asociados logrando una mejor comprensión de los determinantes genéticos de la heterogeneidad de la EREA, mejorando así las estrategias para el desarrollo de agentes diagnósticos y terapéuticos.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los genes que codifican a las carboxipeptidasas que se encuentran expresados en las células epiteliales de los pólipos nasales de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina?

## **JUSTIFICACIÓN**

La EREA es una enfermedad subdiagnosticada y poco estudiada en la que no se han explorado los patrones de expresión del transcriptoma.

La identificación de los perfiles de expresión génica de las carboxipeptidasas en pacientes con EREA mediante análisis del transcriptomacoadyuvará a la comprensión y validación de nuevos procesos fisiopatológicos en esta enfermedad e inclusive ser la base de futuros biomarcadores candidatos implicados en su diagnóstico o eficacia terapéutica

## **HIPÓTESIS**

Existen genes relacionadas con las carboxipeptidasas que se expresan de manera específica en pólipos nasales de paciente con EREA en comparación con tejido sano.

### **Hipótesis alterna**

No existen genes relacionados con las carboxipeptidasas que se expresen de manera específica en pólipos nasales de pacientes con EREA en comparación con tejido sano.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general

Identificar los genes relacionados con las carboxipeptidasas que se expresan en las células epiteliales de pacientes con EREA.

Objetivos particulares

Asociar los genes sobreexpresados con variables clínicas características de la EREA

## **MÉTODOS**

Población de estudio: Pacientes con Enfermedad Respiratoria exacerbada por aspirina (n=12).

A. Criterios de inclusión Generales

- a) Género indistinto
- b) Mayores de 18 años

c) Mexicanos por abolengo ( ancestría de al menos 2 generaciones previas nacidas en México)

d) Consentimiento informado firmado .

#### I. Pacientes con EREA

1.- Diagnóstico de asma con base en los criterios de GINA 2018

2.- Diagnóstico de rinosinusitis crónica con poliposis nasal o antecedentes quirúrgicos de poliposis nasal.

3.- Prueba de provocación nasal a L-ASA positiva o antecedente de ingesta reciente (últimos 3 meses) de más de dos AINE diferentes con reacción adversa (síntomas nasales o broncoespasmo), documentada en expediente clínico.

#### B. Criterios de exclusión

1.- Rinosinusitis bacteriana aguda

2.- Asma no controlada

3.- Pacientes que no acepten firmar consentimiento informado.

#### C. Criterios de eliminación

1.- Material biológico deficiente en cantidad o calidad.

a) Lugar del estudio.

Este estudio se llevará a cabo en el Departamento de Inmunogenética y Asma.

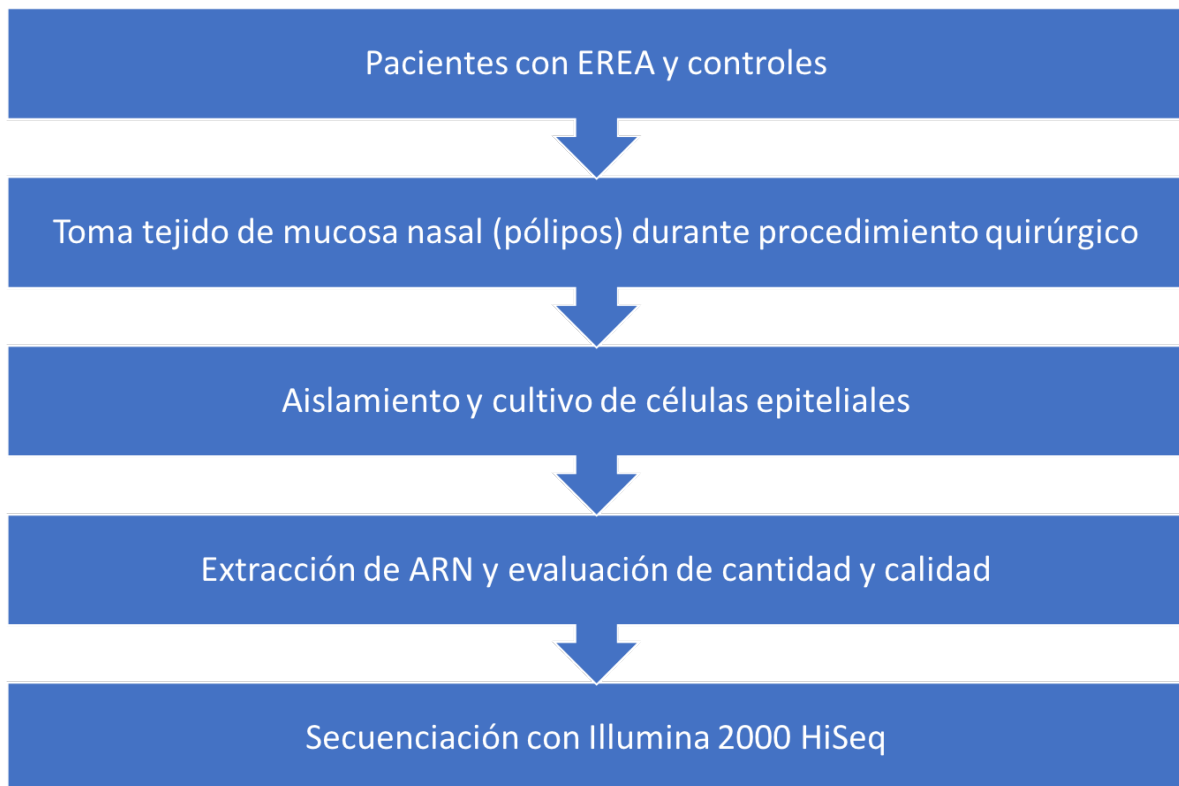
b) Descripción de la población de estudio

Muestra a conveniencia (estudio piloto), atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

c) Procedimientos del estudio.

Se obtuvo tejido nasal de 12 pacientes que fueron sometidos a polipectomía como tratamiento quirúrgico en el departamento de otorrinolaringología (Dr. Alejandro

Jiménez Chobillon). Las características clínicas de los pacientes se muestran en tabla 2. El tejido nasal fue transportado para el aislamiento de las células epiteliales y posteriormente ser procesadas para secuenciación (figura 3 muestra diagrama de flujo del estudio). Como control se tomó muestra del tejido nasal sano de los pacientes intervenidos quirúrgicamente con el fin de evitar sesgo por variabilidad genética.



**Figura 3.- Diagrama general de generación de transcriptoma**

## **Cultivo de células epiteliales nasales (NAEC).**

Las células epiteliales del tracto respiratorio se aislaron del tejido de la ucosa nasal (pólipos nasales), de pacientes con EREA y pacientes sanos sometidos a cirugía con motivos terapéuticos.

Los pólipos nasales se diseccionaron para aislar la capa epitelial, y se lavaron con solución salina para eliminar la sangre y otras impurezas, los tejidos se colocaron en 10 ml de MEM y se incubaron a 37°C. Luego, se centrifugaron suavemente a 1500 rpm durante 10 minutos a 10 °C. Posteriormente se agregó 0,25% de tripsina y se incubó a 37 ° C durante 60 minutos. El tejido se incubó luego con tampón de lisis de RBC durante 10 minutos a 37°C y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se disolvió en 4 ml de BEGM y las partículas de tejido se tamizaron para aislar las células y se incubaron durante 10 minutos con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se resuspendieron en los matraces de cultivo en medio completo (BEGM) y se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> (BEGM, Sigma). Cuando las células epiteliales alcanzaron una confluencia del 80 al 90%, se cosecharon enjuagando el matraz de cultivo con HBSS, se agitaron durante 30 segundos y se eliminaron por aspiración. El matraz de cultivo se incubó con tripsina / EDTA y se observó bajo el microscopio para redondear las células. Una vez que todas las células se liberaron del matraz, se agregó suero con medio completo y se centrifugó a 1400 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante se eliminó por completo del sedimento celular.

El sedimento se disolvió en una pequeña cantidad de PBS y se añadieron de 4 a 5 volúmenes de RNAlater y se almacenaron a -200°C hasta la extracción del RNA.

## **Obtención de RNA**

Una proporción (5 ug) de las NAEC se destinó para la preparación de RNA, se colocó en RNAlater (Qiagen) para prevenir la degradación de RNA en muestras de tejido y asegurar que el RNA intacto pudiera ser aislado en etapas posteriores. Los procedimientos de extracción de ARN se basan en la alteración de los tejidos en una solución acuosa que contiene tampones orgánicos, sales de guanidinio y

detergentes iónicos. Los amortiguadores que se usan con más frecuencia incluyen TRIS y acetato de sodio, que se agregan para ajustar y mantener el pH. Los agentes caotrópicos (compuestos que interrumpen las interacciones hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno) se agregan para desnaturalizar proteínas. Los agentes caotrópicos más comúnmente utilizados son las sales de guanidinio. El guanidinio es un fuerte desnaturizante de proteínas capaz de desnaturizar proteínas recalcitrantes tales como RNAsas. Los procedimientos de extracción de ARN han incorporado el uso de altas concentraciones (4-6 M) de tiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio. Se agregan detergentes iónicos para ayudar a solubilizar las membranas celulares y los lípidos. Los detergentes más comúnmente usados incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS), lauroil sarcosinato de sodio (sarcosil), desoxicolato de sodio y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Estos generalmente están presentes a concentraciones de 1-10%. El ARN se extrajo usando el mini kit RNeasy de Qiagen.

### **Recuperación de ARN**

Después de la homogeneización, se usan dos métodos para recuperar el ARN del lisado celular.

1) Partición líquido-líquido usando fenol / cloroformo, o 2) usando extracción en fase sólida sobre sílice. El método de partición de líquido líquido implica añadir fenol / cloroformo / alcohol isoamílico acidificado al homogenado celular. La solución resultante se mezcla vigorosamente y luego se centrifuga para separar las fases orgánica y acuosa. Generalmente, una tercera fase (la interfase) también se forma entre las fases orgánica inferior y acuosa superior. La fase superior contiene el ARN, mientras que las proteínas desnaturizadas y los lípidos se dividen preferentemente en la interfase y la fase orgánica inferior. En condiciones ácidas (pH ~ 4.8), el ADN se divide preferentemente en la fase orgánica inferior. Es importante darse cuenta de que el pH es un factor crítico en esta técnica ya que a pH más alto el ADN se divide en la capa acuosa superior, que también contiene el ARN. Después de separar las fases, se puede eliminar la capa acuosa superior con una pipeta. La extracción en fase sólida de ácidos nucleicos en presencia de altas

concentraciones de agentes caotrópicos se uniría a la sílice. Dado que tanto los ácidos nucleicos como la sílice están cargados negativamente, la interacción no se debe simplemente a las interacciones carga-carga. En cambio, se cree que la unión se debe a la formación de un puente de sal catiónica, que es promovido por compuestos caotrópicos. Este fenómeno formó la base de procedimientos diseñados para recuperar y purificar ácidos nucleicos a partir de lisados celulares. Se recuperó el ARN del lisado usando partición líquido-líquido usando TRIzol y luego seguido de extracción en fase sólida usando columnas de perlas de sílice Qiagen para producir ARN altamente purificado

### **Fragmentación**

RNA-seq se basa en el uso de secuenciación de nueva generación (del inglés, next generation sequencing [NGS]). Las plataformas de nueva generación actuales son capaces de proporcionar solo lecturas de secuencia relativamente cortas (~ 40-400 bp dependiendo de la plataforma). Por lo tanto, la mayoría de los protocolos incorporan un paso de fragmentación para mejorar la cobertura de la secuencia sobre el transcriptoma. La cadena de ARN se fragmenta mediante el uso de sonicación.

Evaluación de calidad con bioanalizador Agilent.

El ARN total que se ejecuta en un gel de agarosa desnaturizante o en el Bioanalizador 2100 de Agilent muestra dos picos ribosomales distintos que corresponden a 18S y 28S para el ARN eucariota. Las principales especies de ARNr humano (18S y 28S) se sintetizan por escisión de una unidad de transcripción común de 13 kb que es parte de una unidad genómica repetida en tándem de 40 kb. El genoma humano contiene muchos cientos de estos genes de ARNr repetidos (335 genes de ARNr, de acuerdo con la Asamblea NCBI 36), que cuando se transcriben dan como resultado niveles extremadamente altos de transcritos de ARNr. Puede haber hasta 10 millones de copias de ARNr por célula. Además de los muchos cientos de genes de rRNA, la extremadamente alta estabilidad de las transcripciones de rRNA (4-5 días) contribuye fuertemente a sus altos niveles dentro



de la célula. Si se considerara la cantidad de bases de estas especies principales de rRNA (para humanos, la especie 28S rRNA tiene 5034 bases y la especie 18S rRNA tiene 1870 bases) la relación exacta debería ser 2.7. La razón por la cual la banda 28S rRNA o pico se ve como más intensa a pesar del hecho de que hay exactamente tantas moléculas como para el rRNA 18S es porque la detección de rRNA depende de la unión (intercalación) del tinte al RNA y esto depende en el número de bases presentes en cada molécula. Así que el doble de bases unirá el doble de moléculas de colorante, lo que dará como resultado una intensidad de señal dos veces más intensa de la banda en gel o el pico de electroferograma del Bioanalizador. El bioanalizador 2100 de Agilent utiliza un laboratorio en un enfoque de chip para realizar electroforesis capilar y utiliza un colorante fluorescente que se une al ARN para determinar la concentración e integridad del ARN.

El análisis electroforético en el chip se basa en los principios de electroforesis en gel tradicionales que se han transferido a un formato de chip. El formato de chip reduce drásticamente el consumo de muestra, pero también el tiempo de separación. En general, cuando se analiza el ARN de buena calidad, la altura del pico del rRNA 28S debe ser al menos el doble del pico del rRNA 18S. Para la calidad perfecta del ARN, de hecho encontramos proporciones superiores a 2 con el Bioanalizador. ARN aislado de muestras de cultivo celular da como resultado proporciones 28S / 18S mayores que 2.

#### Preparación de la biblioteca

Construcción de la biblioteca RNA Seq Después de obtener una preparación de RNA que es adecuada para RNA-seq, el RNA debe convertirse en cDNA de doble hebra. Esto es necesario porque casi todas las tecnologías de secuenciación disponibles actualmente requieren una plantilla de ADN para la secuenciación.

#### Primer cebado de filamentos usando oligo dT

Para convertir el ARN en ADN, el ARN debe usarse como plantilla para la ADN polimerasa. La mayoría de las ADN polimerasas no pueden usar ARN como

plantilla. Sin embargo, los retrovirus codifican un tipo único de polimerasa conocida como transcriptasas inversas, que pueden sintetizar ADN usando una plantilla de ARN. Las transcriptasas inversas más comúnmente utilizadas se aislaron del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). El primer cebado implica el uso de oligo dT para cebar la síntesis de la cola poli-A que se encuentra en la mayoría de los ARNm eucarióticos maduros. Este método tiene la ventaja de que, dado que la secuencia de cebado es la misma para todos los ARNm, entonces todos deberían estar igualmente cebados independientemente de su secuencia codificante. La biblioteca seleccionada RNA-Seq en una etapa mixta, poli (A) se creó a partir de 10 mg de RNA total usando un protocolo estándar no hilado.

#### Segunda cadena de síntesis por desplazamiento de ARN

Se basa en el uso de una mezcla de ADN polimerasa I de *E. coli*, RNasa H de *E. coli* y ADN ligasa de T4. Al igual que otras polimerasas, la ADN polimerasa I de *E. coli* requiere un cebador bicatenario con un 3'-OH para iniciar la síntesis. En esta reacción, RNasa H se usa para mellar la plantilla de ARN original. Los fragmentos de ARN resultantes pueden funcionar entonces como cebadores para iniciar la síntesis del ADNc de la primera cadena. Durante la síntesis, la ADN polimerasa I de *E. coli* usa su actividad exonucleasa 5' → 3' para degradar el ARN que se aproxima. Finalmente, la T4 ADN ligasa repara las mellas que quedan del cebado inicial. Esta reacción ha sido bien caracterizada y optimizada, y es altamente eficiente. El principal inconveniente de este método es que la región correspondiente al ARN 5'-terminal se pierde. Esto tiene poco efecto en los estudios de expresión génica, pero puede ser un problema para usar RNA-seq para identificar sitios de inicio de la transcripción. Las bibliotecas se cuantificaron usando un fluorómetro Qubit (Invitrogen), y las distribuciones de tamaño se verificaron utilizando un Bioanalizador Agilent. La integridad del ARN (RIN) obtenida a partir de muestras de pacientes se determinó usando Agilent Bioanalyzer. Solo las muestras con un RIN mayor a 7 se usaron para la secuenciación.

## Adaptador adicional

Para ordenar la secuencia de los ADNc, deben agregarse secuencias adaptadoras específicas a los extremos de la amplificación clonal de las moléculas de ADNc para crear agrupaciones de moléculas idénticas que están unidas una a la otra sobre un soporte sólido. Para la plataforma Illumina, los clústeres se unen a la superficie de una celda de flujo. Se requieren dos tipos de elementos de secuencia: (1) Secuencias dependientes de la plataforma patentadas del terminal que se requieren para la amplificación clonal y la unión al soporte de secuenciación. (2) Secuencias para cebar la reacción de secuenciación. Además, varios elementos opcionales pueden estar presentes. Estos incluyen etiquetas de secuencia para permitir la multiplexación (conocidos como códigos de barras o índices), y un segundo sitio de cebado de secuencia para permitir la secuenciación de la inserción desde el otro lado (conocida como secuencia de emparejamiento final)

## RNA-seq utilizando Illumina HiSeq 2000

### Secuenciación por tecnología de síntesis (SBS)

La tecnología de secuenciamiento de Illumina, secuencia por síntesis (SBS), es la tecnología NGS (secuenciación de próxima generación) más exitosa y ampliamente adoptada en todo el mundo. Los instrumentos y reactivos de secuenciación de Illumina son compatibles con la secuenciación masiva paralela utilizando un método patentado que detecta bases individuales a medida que se incorporan en hebras de ADN en crecimiento. (Figura 4)

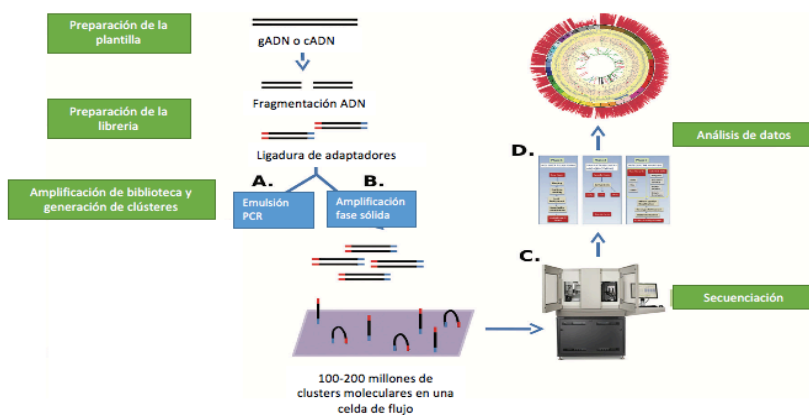


Figura 4.- Secuenciación

## RESULTADOS

Se reclutaron un total de 12 pacientes con EREA de los cuáles se obtuvo tejido polipoideo, como control se obtuvo tejido nasal sano de 8 de los 12 pacientes. Todos los pacientes recibieron esteroide oral 7 días (50mg prednisona al día) o dosis única de dexametasona 8 mg previo al procedimiento quirúrgico.

**Tabla 2.- Características generales pacientes con EREA**

	Edad/Género	Eosinófilos	IgE total	Inicio síntomas asma (años)	Inicio pólipos (años)	Inicio reacción AINE (años)	Esteroides nasal previo a cirugía
EREA (P)	37 años/F	200	55	30	29	32	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P)	41 años/F	180	27.9	NE	41	33	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P)	54 años/F	300	524	25	47	47	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P)	31 años/M	200	NE	23	27	23	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P+TS)	35 años/F	1100	57	25	32	26	Triamcinolona 220 mcg/d
EREA (P+TS)	53 años/F	600	713	43	45	45	Triamcinolona 220 mcg/d
EREA (P+TS)	73 años/M	0	412	48	44	NE	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P+TS)	33 años/F	500	129	30	27	33	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P+TS)	34 años/F	500	55	34	34	30	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P+TS)	50 años/F	500	203	47	50	48	Mometasona 200 mcg/d
EREA (P+TS)	34 años/F	700	759	NE	33	NE	Triamcinolona 220 mcg/d
EREA (P+TS)	32 años/M	900	92.3	29	31	29	Mometasona 200 mcg/d

P= póipo TS= tejido sano

Del total de pacientes con diagnóstico de EREA (n=12) , 9 pacientes (75%) pertenecían al género femenino. La mayoría de los pacientes debutaron con el cuadro clínico tanto de asma como de pólipos e inicio de reacción a AINE durante la tercera y cuarta década de la vida.

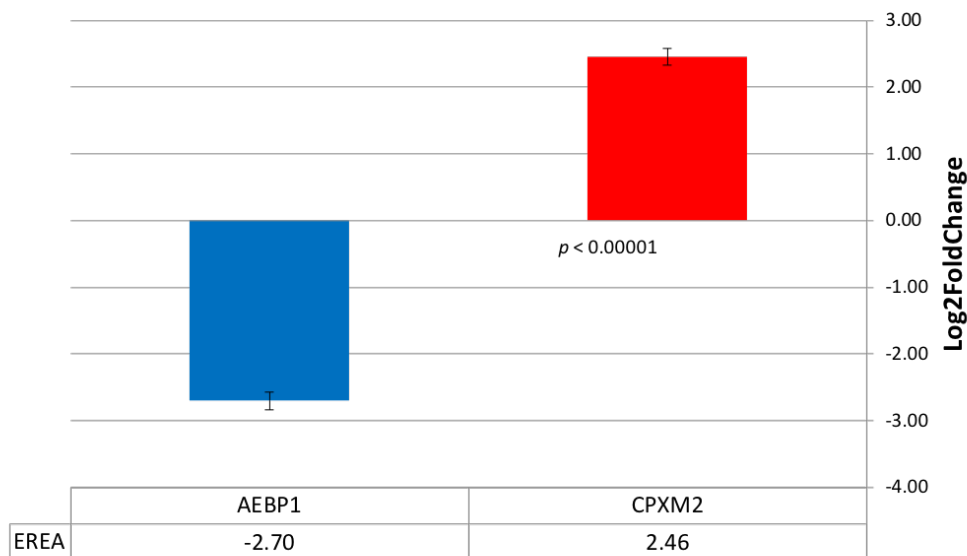
Se encontraron un total de 20 genes diferencialmente expresados: 10 genes a la alta y 10 a la baja. Interesantemente el gen top del grupo de los genes expresados a la alza y a la baja, corresponde a los genes relacionados con las carboxipeptidasas. (Tabla 3)

**Tabla 3.- Genes expresados a la alta y a la baja.**

<b>Gen</b>	<b>Log 2 FoldChange</b>	<b>p</b>
AEBP1	-2.707362703	2.03E-06
NTSR1	-2.41250456	3.69E-05
KIAA1644	-2.3470082	9.39E-05
HMCN1	-2.272646889	0.0001158
LAPTM5	-2.227142401	0.000161675
ZFPM2	-2.222829829	0.000308124
TM4SF19-AS1	-2.19263198	6.31E-05
TM4SF19	-2.028474228	0.001174304
SLC4A4	-2.026092434	0.001578034
LPXN	-1.99541383	0.000925834
CPXM2	2.465253112	2.08E-06
DMRT3	2.352825892	5.25E-05
SGSM1	2.036646455	0.000655513
MTND4LP30	1.971739709	0.003142658
HOXB2	1.968480394	0.003142658
SEC14L6	1.954274958	0.002175972
BST2	1.70261104	0.003142658
MT1DP	1.636916531	0.018544775
KANSL1-AS1	1.621560327	0.002162777
CES1P1	1.611770469	0.016071604

Se identificaron dos genes relacionados con las carboxipeptidasas, de los cuáles no se encontró evidencia previa en relación al desarrollo de EREA.

## Genes relacionados a Carboxipeptidasas en EREA



**Figura 5.- Genes relaciondas con Carboxipeptidasas.**

Del total de genes reportados únicamente dos genes se encontraron relacionados con carboxipeptidasas, el gen Carboxipeptidasa X, M14 Miembro de la familia 2 (CPXM2), mostró un regulación a la alta en pacientes con EREA con un valor de  $p < 0.5$  y el gen de proteína de unión potenciadora de adipocitos 1 (AEBP1) con una regulación a la baja y un valor de  $p < 0.5$ .

## DISCUSIÓN

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado variantes comunes asociadas con la enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA). La secuenciación del genoma completo ofrece una cobertura amplia de todo el genoma en comparación con herramientas utilizadas previamente como microarreglos, razón por la cual se eligió como método de análisis en este estudio. El estudio de los factores genéticos involucrados en el desarrollo de enfermedades complejas en poblaciones particulares, puede ser de utilidad no solo para incrementar nuestro conocimiento acerca de la etiopatogénesis y mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de estas entidades. Sino que además puede ayudar a identificar los factores de riesgo propios de las poblaciones y por ende ayudar a generar mejores estrategias para el manejo y tratamiento de los pacientes de esa población en particular.

El gen CPXM2 el cuál se identificó como un gen regulado a la alta en los pacientes con EREA, es un gen codificador de proteínas, miembro inactivo de la familia de las metalocarboxipeptidasas, localizado en el cromosoma 10 en la región 10q26.13. Presenta una amplia expresión en la vejiga urinaria (RPKM 10.5), grasa (RPKM 8.3) y otros 19 tejidos. La interacción de este gen en gene card muestra relación con otros dos genes que también pertenecen a la familia de las carboxipeptidasas; el gen ATP/GTP proteína de unión tipo 4 (AGBL4) y el gen ATP/GTP proteína de unión 1 (AGTPBP1). (32)

Se han descrito tres polimorfismos en el gen CPXM2 asociado con diferentes fenotipos, rs4246949 con colitis ulcerativa, rs869025241 carcinoma ductal de mama y el rs28360899 con fenotipos de sueño diurno.

En un estudio de asociación del genoma en donde se reclutaron 713 pacientes con Alzheimer de inicio tardío, se encontró asociación con el polimorfismo rs236967 que se encuentra en el gen CPXM2, el cual desempeña un papel importante en la integridad sináptica y la remodelación, la adhesión celular y la regulación al alza de

clusterina (CLU), un gen previamente relacionado con Alzheimer de inicio tardío. CPXM2 también está relacionado con la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia. Sin embargo, el único estudio epidemiológico para investigar este gen no identificó una asociación significativa con Alzheimer de inicio tardío, probablemente debido a los efectos moderados de este SNP.(33)

El polimorfismo rs4246949 localizado en el cromosoma CPXM2, fue identificado dentro de los nueve genes candidatos de GWAS para el riesgo de colitis ulcerativa el cuál se replicó en una cohorte de validación independiente ( $P < 0.05$ ). La colitis ulcerativa así como la enfermedad de Crohn (EC) forman parte de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que están consideradas como enfermedades crónicas inmunes del tracto gastrointestinal. Una diferencia fundamental en el sistema inmune adaptativo entre CU y EC está representada por el paradigma Th1 / Th2, que define EC como una enfermedad precursora de células Th1, donde las células Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y expresan el factor de transcripción T-bet y CU como una enfermedad de tipo Th2, donde las células Th2 están marcadas por una mayor secreción de interleucina 5 (IL-5) e IL-13 y expresión de Gata3.

Este tipo de disregulación inmune observado en la colitis ulcerativa es similar a lo encontrado en el EREA, en donde predomina el perfil de citocinas Th2. (34,35)

Más recientemente, el equilibrio entre las células Th17 y las células T helper reguladoras (Treg), definidas por la expresión de IL-17 y ROR $\gamma$ t, y la expresión de FoxP3, respectivamente, han desafiado el paradigma Th1 / Th2 convencional y proporcionado más información sobre la patogénesis de la inflamación de la mucosa en la EII. (36)

Las células Th17 se encontraron enriquecidas y predominantemente proinflamatorias en el contexto de la EII. Y las células FoxP3 + Treg, aunque aumentaron en proporción, mostraron tener funciones supresoras alteradas en la mucosa inflamada de pacientes con EII. (37)

El comportamiento de fumar, la edad de inicio del tabaquismo, el abandono del hábito de fumar y el número de cigarrillos fumados por día (DPC), están



parcialmente determinados genéticamente y tienen una heredabilidad sustancial. Se ha sugerido que numerosos loci y genes candidatos contienen marcadores genéticos que afectan los comportamientos de fumar, estudios previos de asociación de genoma completo (GWAS) han identificado numerosos polimorfismos de nucleótido único (SNP) asociados con la cantidad de cigarrillos fumados por día, el polimorfismo rs727417 localizado en el cromosoma CPXM2 mostró una asociación importante con una OR de 1.71 ( $p 9.67 \times 10^{-6}$ ).

Aunque la carboxipeptidasa que se encuentra descrita en la cascada del ácido araquidónico es la A, es probable que otras carboxipeptidasas codificadas por dicho gen, tengan participación en la regulación de la producción de leucotrienos, principales moléculas involucradas en la fisiopatología de la EREA, sin embargo esta premisa requiere ser tanto replicada en otra población con la enfermedad y validada mediante técnicas de medición tanto de forma soluble como en tejido e incluso en ensayos enzimáticos.

El segundo gen identificado en el estudio que codifica para las carboxipeptidasas, fue el gen proteína de unión potenciador de adipocitos 1 (AEBP1), el cual pertenece a la familia peptidasa M14, localizado en el cromosoma 7 en la región 7p13. Codifica un miembro de la familia de proteínas carboxipeptidasa A. La proteína codificada puede funcionar como un represor transcripcional y desempeñar un papel en la adipogénesis y la diferenciación de células musculares lisas. Los estudios en ratones sugieren que este gen funciona en la curación de heridas y el desarrollo de la pared abdominal. La sobreexpresión de este gen está asociada con glioblastoma.

Puede regular positivamente la actividad MAP-quinasa en los adipocitos, lo que conduce a una mayor proliferación de adipocitos y una diferenciación reducida de los adipocitos.

Regula positivamente la actividad de NF-kappa-B en los macrófagos promoviendo la fosforilación y la posterior degradación de I-kappa-B-alfa (NFKBIA), lo que conduce a una mayor capacidad de respuesta inflamatoria de los macrófagos.

Presenta mayor expresión en la vesícula biliar (RPKM 100.0), endometrio (RPKM 86.2) y otros 23 tejidos.

AEBP1 desempeña un papel funcional clave en la modulación *in vivo* de la adiposidad a través de la proliferación de células grasas y está involucrado en una susceptibilidad sexual específica a la obesidad inducida por la dieta mediante la vía de señalización del estrógeno. (38)

La proteína similar a la carboxipeptidasa aórtica (ACL<sub>P</sub>) sinónimo del gen AEBP1 es una proteína secretada que se asocia con la matriz extracelular (MEC). Durante la embriogénesis de ratón, el ACL<sub>P</sub> se expresa abundantemente en la MEC de tejidos ricos en colágeno, que incluyen la vasculatura, la dermis y el esqueleto en desarrollo. Se eliminó el gen ACL<sub>P</sub> en ratones mediante recombinación homóloga. La mayoría de los ratones ACL<sub>P</sub> (-/-) mueren perinatalmente debido a gastrosquisis, una grave alteración de la pared abdominal anterior y hernia de los órganos abdominales. Los ratones ACL<sub>P</sub> (-/-) que sobrevivieron hasta la edad adulta desarrollaron heridas cutáneas no cicatrizadoras. Estos resultados indican que el ACL<sub>P</sub> es una proteína de MEC que es esencial para el desarrollo embrionario y los procesos de curación de heridas dérmicas. (39)

El gen AEBP1 tiene dos isoformas: AEBP1, la más corta de las dos isoformas, y Aclp (proteína similar a carboxipeptidasa aórtica). Los ratones Aclp (-/-) demuestran un defecto de la pared ventral que es similar a la gastrosquisis en humanos. Aclp es un gen candidato potencial porque se expresa en numerosos tejidos durante el desarrollo temprano en ratones; se asocia con la matriz extracelular; y es esencial para el desarrollo de la pared abdominal y la cicatrización de heridas. Por el contrario, AEBP1 codifica una proteína intracelular implicada en respuestas proinflamatorias, y puede desempeñar un papel crítico en la apoptosis y la supervivencia celular. (40)

AEBP1 potencia la polimerización de colágeno y se une a varias fibrillas de colágeno a través de su dominio de discoidina. Estos estudios respaldan la conclusión de que las variantes patogénicas bialélicas en AEBP1 son la causa de un subtipo de Síndrome de Ehler-Danlos autosómico recesivo. (41)

La probable relación de este gen con la presencia de polipos nasales en pacientes con EREA podría explicarse por su asociación con la matriz extracelular y la polimerización del colágeno. La rino sinusitis crónica con poliposis nasal se caracteriza por una inflamación crónica y cambios en la deposición de proteínas de matriz extracelular y en la estructuración del tejido; observado como engrosamiento de la membrana basal, hiperplasia de células caliciformes y edema subepitelial, con vasos y glándulas reducidos. La fisiopatología de la formación de pólipos nasales es poco conocida, estudios previos han sugerido que la proliferación de fibroblastos y la diferenciación en miofibroblastos tiene un papel en la formación de pólipos nasales [1, 2]. Cuando se desarrollan pólipos nasales, los fibroblastos se transforman en miofibroblastos que expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y posteriormente sobreproducen componentes de ECM tales como glicosaminoglicanos, fibronectinas y colágeno tipos I, IV, VI y VII. (42)

La liberación de colágeno y el equilibrio entre las metaloproteinasas y sus inhibidores en los pólipos nasales también pueden estar mediados por TGF- $\beta$ 1.

En un estudio realizado en la Universidad de Pensilvania se investigaron las características patológicas prevalentes en el desarrollo de pólipos nasales para dilucidar el orden cronológico y la relación entre inflamación y remodelación, dentro de los resultados se encontró un aumento del número de macrófagos en el área de pólipos del cornete medio de pacientes con rinosinusitis crónica y poliposis nasal lo cual sugiere un mecanismo de defensa del huésped defectuoso en la etapa temprana de la enfermedad. Por el contrario, una respuesta fibrótica desarrolló un mecanismo de defensa que implica una mayor deposición de haces densos de fibras de colágeno en la mucosa subyacente para evitar la diseminación y la generalización del edema y la inflamación. Estos hallazgos sugieren una compleja red de procesos en la formación de los pólipos; incluyendo el daño epitelial y las reacciones de reparación, la infiltración de células de macrófagos eosinófilos y la remodelación tisular. (43)

Lo anterior sugiere que AEBP1 puede estar involucrado en la formación de colágeno de la poliposis nasal. Dentro de las limitantes de este estudio se encuentra la

necesidad de validación entre la comprobación de la síntesis de la proteína (ELISA, inmunohistoquímica) y/o ensayos enzimáticos, así como la replicación en muestras más grandes. La toma de la muestra de tejido nasal en futuros estudios podría basarse en técnicas más simples como la obtención de células epiteliales por cepillado nasal, que no impliquen el someter al paciente a un procedimiento quirúrgico lo cuál podría optimizar tiempo y recursos.

En resumen este estudio ha demostrado que existen dos genes pertenecientes a la familia de las carboxipeptidasas expresados de manera positiva y negativa en pólipos de pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina.

## **CONCLUSIONES**

El definir la arquitectura genética del EREA en la población mexicana, podría ser de gran utilidad para la generación de herramientas que permitan identificar a los individuos genéticamente en riesgo para padecer esta patología, que en conjunto con los factores no genéticos, permitirán sin duda, aplicar estrategias de manejo integral más eficientes para esta entidad.

Este es el primer estudio que reporta la presencia de genes que codifican a las carboxipeptidasas en pacientes con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina CPXM2 se expresa a la alta en pacientes con EREA y AEBP1 se expresa a la baja en pacientes con EREA como un posible mecanismo contraregulador.

La EREA continúa siendo una entidad que representa múltiples retos y de la que aún hay mucho por conocer, el seguir postulando y explorando nuevas vías que expliquen de manera más fina la fisiopatología de la enfermedad con el uso de tecnologías más avanzadas como lo es la secuenciación masiva, podría ser la pauta para la creación de nuevos métodos diagnósticos y agentes terapéuticos.

## REFERENCIAS

- 1.- Steinke JW, Wilson JM. Aspirin-exacerbated respiratory disease: pathophysiological insights and clinical advances. *J Asthma Allergy* 2016; 9:37–43.
- 2.- Woessner KM. Update on aspirin-exacerbated respiratory disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017;17(1):2.
- 3.- T.M. Laidlaw, J.A. Boyce, Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease — New Prime Suspects, *N. Engl. J. Med.* (2016) 484–488. doi:10.1056/NEJMcibr1514013.
- 4.- Rajan JP, Wineinger NE, Stevenson DD, White AA. Prevalence of aspirin exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: a meta analysis of the literature. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:676-81
- 5.- Stevens WW, Peters AT, Hirsch AG, et al. Clinical characteristics of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps, asthma, and aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy ClinImmunolPract*2017;5:1061–70.
- 6.- Kennedy JL, Stoner AN, Borish L. Aspirin-exacerbated respiratory disease: prevalence, diagnosis, treatment, and considerations for the future. *Am J Rhinol Allergy* 2016;30(6):407–13.
- 7.- Szczeklik, E. Nizankowska, M. Duplaga, Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma., *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 16 (2000) 432–436.
- 8.-Narayanankutty A, Resendiz-Hernandez JM, Falfan-Valencia R, et al. Biochemical pathogenesis of aspirin exacerbated respiratory disease (AERD). *ClinBiochem* 2013; 46:566–578.
- 9.- Liu T, Kanaoka Y, Barrett NA, et al. Aspirin-exacerbated respiratory disease

involves a cysteinyl leukotriene-driven IL-33-mediated mast cell activation pathway. *J Immunol* 2015; 195:3537–3545.

10.- Pham DL, Kim JH, Trinh TH, et al. What we know about nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Korean J Intern Med* 2016; 31:417–432.

11.- Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, et al. Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol.* 2008;181(10):7273–7283

12.- Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:145–155.

13.- Steinke JW, Liu L, Huyett P, Negri J, Payne SC, Borish L. Prominent role of interferon- $\gamma$  in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:856.e3–865.e3.

14.- Liu T, Kanaoka Y, Barrett NA, et al. Aspirin-exacerbated respiratory disease involves a cysteinyl leukotriene-driven IL-33-mediated mast cell activation pathway. *J Immunol.* 2015;195(8):3537–3545.

15.- K.M. Buchheit, K.N. Cahill, H.R. Katz, et al. Thymic stromal lymphopoietin controls prostaglandin D2 generation in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (2016) 1566–1576e5.

17.- Gandhi F, Pavón-Romero, Fernando Ramírez Jiménez, Marco Alejandro Roldán-Alvarez, Luis M. Terán & Ramcés Falfán-Valencia. Physiopathology and genetics in aspirin-exacerbated respiratory disease, *Experimental Lung Research.* 2017; 43:8, 327-335,

17.- Arolas, J.L. Vendrell J, Aviles FX, et al. Metalloproteases: emerging drug targets in biomedicine. *Curr. Pharm. Des.* 2007 ;13 (4), 349–366

18- Vendrell, J, Querol E, Aviles FX. Metalloproteinases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim.Biophys. Acta.* 2000;1477, 284–98.

19.- S.J. Galli. Mast cells and basophils *Curr. Opin. Hematol.* 7. 2000; 32–39.

20.- C. Lutzelschwab, G. Pejler, M. Aveskogh, L. Hellman. Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J. Exp. Med.* 1997; 13–29.

21.- Reddanna P, Prabhu S, Whelan J, Reddy C. Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2003; 158–163

22.- Pejler, G, Abrink M, Ringvall M, et al. Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* 2007; 95, 167–255

23.- Boyce, J.A. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol. Rev.* 2007; 217, 168– 185

24.- Boita M, Bucca C, Riva G, Heffler E, Rolla G. Release of Type 2 Cytokines by Epithelial Cells of Nasal Polyps. *Journal of Immunology Research* Volume 2016.

25.- Mertens TCJ, Karmouty-Quintana H, Taube C, Hiemstra PS, Use of airway epithelial cell culture to unravel the pathogenesis and study treatment in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017 Aug;45:101-113

26.- Poole A, Urbanek C, Eng C, et al. Dissecting childhood asthma with nasal transcriptomics distinguishes subphenotypes of disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014 Mar;133(3):670-8

27.- Zhang X, Sebastiani P, Liu G, et al. . Similarities and differences between smoking-related gene expression in nasal and bronchial epithelium. *Physiological genomics*. 2010; 41, 1–8.

28- Wolf J. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*. 2013; 13, 559–572

29.- Jacquier, A. The complex eukaryotic transcriptome: Unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat. Rev. Genet*. 2009, 10, 833–844.

30.- Byron, S.A, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Genet*. 2016, 17, 257–271

31.- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*. 2008; 5, 621–628.

32.- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CPXM2#diseases>

33.- Chen Y-H, Hsiao C-J, Jung C-C, et al. Performance Metrics for Selecting Single Nucleotide Polymorphisms in Late-onset Alzheimer’s Disease. *Scientific Reports*. 2016.

34.- Granlund A, Flatberg A, Ostvik AE, et al. Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major



differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS One*. 2013;8:e56818.

35.- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:4280–4288.

36.- Christophi GP, Rong R, Holtzapple PG, et al. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:2342–2356.

37.- Himmel ME, Yao Y, Orban PC, et al. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology*. 2012;136:115–122.

38.- Zhang, L., Reidy, S.P., Nicholson, T.E. et al. The role of AEBP1 in sex-specific diet-induced obesity. *Mol. Med*. 2005.

39.- Layne, M.D., Yet, S.F., Maemura, K., et al. Impaired abdominal wall development and deficient wound healing in mice lacking aortic carboxypeptidase-like protein. *Mol. Cell. Biol*. 2001.

40.- Feldkamp M, Bowles N, Botto L. AEBP1 Gene Variants in Infants with Gastroschisis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Sep;94(9):738-42.

41.- Blackburn, P. R., Xu, Z., Tumelty, K. E., et al. Bi-allelic alterations in AEBP1 lead to defective collagen assembly and connective tissue structure resulting in a variant of Ehlers-Danlos syndrome.. *Am. J. Hum. Genet*. 2018; 102: 696-705.

42.- Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., et al. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *American journal of rhinology*. 2000; 14, 279–290.

43.- Meng J, Zhou P, Liu Y, Liu F, Yi X, et al. The Development of Nasal Polyp Disease Involves Early Nasal Mucosal Inflammation and Remodelling. PLoS ONE. 2013; 8(12).