
Polimorfismos de nucleótidos simples V4 y T1 del gen ADAM33 en pacientes venezolanos con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Daniela Martínez¹, Diego Lema¹, Dolores Del Carmen Moreno², Alexis Hipólito García¹, Jenny Valentina Garmendia¹ y Juan Bautista De Sanctis¹.

¹Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

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

Palabras clave: asma; EPOC; ADAM33; polimorfismos genéticos (SNP).

Resumen. ADAM33 es una metaloproteinasa de la matriz extracelular involucrada en la remodelación tisular y, por ello, en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se han reportado varios polimorfismos del gen de ADAM33 asociados a la actividad enzimática. Los polimorfismos más estudiados son el V4, citosina por una guanina en la región 3' UTR, y el T1, adenina por una guanina en el exón 19 del gen. El objetivo del presente trabajo fue determinar la posible asociación de los polimorfismos de nucleótido simple de ADAM33, V4 y T1, con la presencia de asma o EPOC en pacientes venezolanos. Los polimorfismos V4 y T1 fueron analizados en 303 individuos (103 asmáticos, 100 EPOC, y 100 controles) mediante PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa y análisis de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción enzimática). La frecuencia genotípica del polimorfismo V4 fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en ambos grupos de pacientes, asmáticos y EPOC, con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0,4$) en el polimorfismo T1. Sin embargo, se evidenció una diferencia significativa ($p < 0,05$) cuando los haplotipos y diplotipos de ADAM33 V4/T1 se compararon entre los tres grupos. Se concluye que el polimorfismo ADAM33 V4 está asociado con la presencia de asma o EPOC en pacientes venezolanos.

Autor de correspondencia: Juan B. De Sanctis. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria. Caracas, Venezuela. Teléfono 212-6050545, fax 212-6932734. Correo electrónico: sanctisj@gmail.com.

Single nucleotide polymorphisms V4 and T1 of the ADAM33 gene in Venezuelan patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease.

Invest Clin 2016; 57(2): 176 - 186

Key words: asthma; COPD; ADAM33; single nucleotide polymorphism (SNP).

Abstract. ADAM33 is a metalloproteinase important in the extracellular matrix for tissue remodeling, and, consequently, in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Several polymorphisms of the ADAM33 gene have been associated with enzyme activity. One of the most studied polymorphisms is V4, cytosine for guanine in the 3'UTR region, and T1, adenine for guanine in the exon 19 of the gen. The aim of this study was to ascertain the possible association among single polymorphisms of ADAM33, V4 and T1, in Venezuelan patients with asthma or COPD. The polymorphisms V4 and T1 were analyzed in 303 individuals (103 asthmatic, 100 COPD and 100 controls) by PCR-RFLP (polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms). There was a significant difference ($P<0.05$) in the frequency of ADAM33 V4 polymorphism in both, asthmatic and COPD patients groups, as compared to controls. No significant differences ($P=0.4$) were found for T1 polymorphism. However, there were significant differences ($P<0.05$) when haplotypes and diplotypes of ADAM33 V4/T1 were compared in all three groups. It can be concluded that the polymorphism V4 of ADAM33 is associated with asthma or COPD in Venezuelan patients.

Recibido: 07-07-2015. Aceptado: 25-02-2016

INTRODUCCIÓN

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son enfermedades inflamatorias crónicas del tracto respiratorio, 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 cada enfermedad varía según el agente que la desencadena. En asma alérgica es la presencia de alérgenos, y en EPOC, el agente principal desencadenante es el humo del cigarrillo (2,3). En ambas patologías existe inflamación crónica del tracto respiratorio que modifica la matriz extracelular del

parénquima pulmonar, la cual es mediada por el incremento de la expresión de proteínas inflamatorias, entre ellas citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, enzimas y receptores (1,4). Variantes genéticas en estas moléculas juegan un factor importante en el desarrollo, establecimiento y agravamiento de estas patologías y han sido evaluadas esencialmente en poblaciones caucásicas (5,6) con solo algunos reportes de poblaciones mestizas (7).

ADAM33 pertenece a la familia de proteínas transmembrana con dominio desintegrina y metalloproteinasa importantes en el mantenimiento y función de la matriz extracelular (8,9). La proteína se expresa preferencialmente en fi-

broblastos en pulmón y células musculares lisas de la vía aérea, por tanto la actividad enzimática se relaciona con función pulmonar (8,9). Existen múltiples variantes polimórficas de nucleótidos sencillos de ADAM33 (10). Varias variantes polimórficas del gen de ADAM33, F+1, T1, S₂, ST+5 y V4 han sido relacionados con asma (10-15). El alelo S₂ ha sido asociado con el deterioro de la función pulmonar en asma (11-14). En EPOC, recientemente, se ha demostrado la presencia de seis polimorfismos asociados a la enfermedad, T1, T2, S1, Q-1, F+1 y ST+5, siendo T2, Q-1 y ST+5 los más relevantes en población europea y el resto en la población asiática (16-20).

El polimorfismo V4 (rs2787094) ha sido vinculado con el diagnóstico de asma y rinitis en la población asiática, predominantemente (13,14). Vergara y col. (21) han demostrado la presencia de seis polimorfismos de ADAM33 en pacientes asmáticos de Cartagena, Colombia. En éstos pacientes se asoció la presencia del polimorfismo V4 con la respuesta alérgica a *Blomia tropicalis*. Karimi y col. (15), en Irán, demostraron que éste polimorfismo estaba asociado a sensibilidad a gramíneas en pacientes asmáticos. Además, el mismo grupo (15) demostró una relación entre sensibilidad a ácaros y polimorfismo T1 (rs2280091). Por ello, se presume que la respuesta a alérgenos podría estar relacionada con la frecuencia de ambos polimorfismos.

Garmendia y col. (22) demostraron una alta incidencia de respuesta a alérgenos *Blomia tropicalis* y demartofagoides en pacientes con EPOC venezolanos y probablemente podría tener una relación con éstos polimorfismos.

Cada día adquiere más importancia la superposición de asma y EPOC en un mismo paciente. En este subgrupo hay que plantearse los puntos de encuentro en la fisiopatología de las enfermedades obstructivas crónicas. La identificación de diferentes polimorfismos de ADAM33 en este subgrupo pudiese cambiar el pronóstico de la enfermedad y el abordaje terapéutico (23).

Dada la importancia de los polimorfismos de ADAM33 y su posible relación con la función pulmonar, se decidió analizar los polimorfismos T1 y V4 en los pacientes venezolanos con asma o EPOC.

PACIENTES Y MÉTODOS

Población y Muestra

La población de estudio incluyó individuos mestizos venezolanos. La muestra constó de 303 individuos, de la región Metropolitana y Central del país de diferente edad y sexo, distribuidos en 103 asmáticos, 100 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 al paciente, y autorizado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela.

Criterios de Inclusión

Selección de Pacientes

Los pacientes con asma fueron diagnosticados y clasificados según las directrices de Global Initiative for Asthma (GINA) 2014 (24), y los de EPOC fueron diagnosticados y caracterizados según la Sociedades Americana y Europea de Tórax y Respiratorio (ATS/ERS) 2004 (25).

Se realizaron pruebas de función pulmonar (espirometría) a cada uno de los pacientes, con medición del Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (VEF1) y Capacidad Vital Forzada (CVF) por el personal médico calificado del Hospital Universitario de Caracas (HUC).

Selección de Controles

Se seleccionaron individuos sin patologías respiratorias, o antecedente de las mismas, y con espirometría normal.

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el estuche comercial AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la identificación de los polimorfismos de nucleótido simple del gen ADAM33, se utilizó la técnica de PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa y análisis de restricción de fragmentos polimórficos usando corte enzimático). Los polimorfismos estudiados consisten en un cambio de una base nitrogenada en su secuencia. En el caso de V4 es el cambio de una citosina por una guanina en la región 3' UTR, y para T1 es un cambio de una adenina por una guanina en el exón 19 del gen, originando cambios en los aminoácidos [Met(764)Thr]. Se emplearon cebadores específicos para cada región donde se ubican los SNP. Las condiciones de amplificación de PCR-RFLP, se basaron en el protocolo de Su y col. (12) con modificaciones de nuestro laboratorio. El amplificado para analizar el polimorfismo V4 es de 374 pb y al ser tratado con la enzima endonucleasa PstI (BioLabs) generan fragmentos de 168 pb y 206 pb para el alelo mutado G. En el alelo silvestre C no es susceptible a digestión enzimática y se mantiene el fragmento de 374 pb. Para SNP T1, se utilizó la enzima NcoI (Roche), el alelo silvestre A corresponden a dos fragmentos de 140 pb y 260 pb, y el alelo mutado G se identifica con un fragmento sin corte enzimático de 400 pb. Los fragmentos para ambas PCR-RFLP se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y su visualización mediante transiluminador UV, previo tinción del gel con bromuro de etidio.

Estadística

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. Se empleó 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 (Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (VEF1), porcentaje predictivo de volumen de expiración forzada en el primer segundo (VEF1 % Pred), capacidad vital forzada (CVF), Porcentaje predictivo de capacidad vital forzada (CVF % Pred) 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 el *odds ratio* con su intervalo de confianza de 95% y para el cálculo de la p se utilizó 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

Las características de las poblaciones estudiadas se representan en la Tabla I. Como era de esperarse, se observaron diferencias significativas en los valores de VEF1 y CVF entre pacientes y controles. Seguidamente, en la Tabla II se describen los grados de severidad de los pacientes asmáticos y con EPOC.

En la Tabla III y Tabla IV, se ilustran las frecuencias genotípicas y de los diplotipos de ADAM33 V4 y T1, observándose una diferencia significativa en el genotipo V4. En relación a la frecuencia de los diplotipos, se encontró significancia estadística como se demuestra en la Tabla IV.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICA DE CASOS Y CONTROLES

	Asmáticos n=103	EPOC n=100	Controles n=100	P
Edad	41 ± 16	64 ± 10	34 ± 12	-
Mujeres	78	54 (54)	62 (62)	-
Hombres	25	46 (46)	38 (38)	-
Fumador	4 (5)	45 (45)	11 (11)	-
No fumador	77 (75)	3 (5)	84 (84)	-
Ex fumador	20 (20)	50 (50)	5 (5)	-
VEF ₁ (L)	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,9	3,1 ± 0,6	<0,05
VEF ₁ % Pred	66,2 ± 15,3	48,1 ± 18,6	97,5 ± 8,9	<0,05
CVF (L)	2,8 ± 0,8	2,4 ± 0,9	3,9 ± 0,8	<0,05
CVF % Pred	81,9 ± 14,8	74,2 ± 19,6	96,2 ± 9,8	<0,05

Los valores corresponden a: Edad en años. Número de individuos (%). Media ± Desviación Estándar. Volumen espiratorio en el primer segundo (VEF1) en litros (L), Porcentaje predictivo de volumen de espiración forzada en el primer segundo (VEF1 % Pred), capacidad vital forzada (CVF) en litros (L), Porcentaje predictivo de capacidad vital forzada (CVF % Pred). El método estadístico aplicado fue ANOVA de un factor.

Se realizó el cálculo del *odds ratio* para los genotipos ADAM33 V4 en cada una de las patologías. Se puede observar en las tablas V y VI, que en asma existe diferencia estadística con los genotipos C/C (OR: 0,14) y G/G (OR: 2,10), mientras que en EPOC se encontró una diferencia estadísticamente significativa con el genotipo C/C (OR: 0,48). (Fig. 1).

El cálculo de *odds ratio* para los diplotipos V4/T1 en asma bronquial, resultó ser estadísticamente significativo para CCAA (OR: 1,16) (Tabla VII). En EPOC no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los diferentes diplotipos estudiados.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de VEF1 o CVF con el genotipo y/o diplotipo (p= 0,2), ni tampoco se encontró con el tipo de asma (p=0,1) o la severidad en EPOC (p = 0,1).

DISCUSIÓN

La remodelación tisular es un fenómeno común en las enfermedades respiratorias como asma y EPOC a pesar de ser generadas por diferentes agentes (1,7). El recambio celular genera variaciones importantes en la respuesta inflamatoria lo que conlleva a una baja

TABLA II
CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

Clasificación*	ASMA		EPOC	
		Casos	Clasificación [#]	Casos
Controlada		26 (25)	Grado 1	6 (6)
No Controlada		77 (75)	Grado 2	34 (34)
			Grado 3	48 (48)
			Grado 4	12 (12)
Total		103 (100)	Total	100

Número (Frecuencia %)

(*)Clasificación según criterios GINA 2014 (24).

(#) Clasificación según criterios de la American Thoracic Society (ATS) 2003 (25).

TABLA III
FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE ADAM 33

Polimorfismo	Genotipo	Asmáticos	EPOC	Controles	P
ADAM33 V4 C/G	CC	4 (4)	13 (13)	23 (23)	<0,005
	CG	32 (31)	29 (29)	30 (30)	
	GG	67 (65)	58 (58)	47 (47)	
ADAM33 T1 A/G	AA	89(86)	84(84)	80(80)	0,441
	AG	14(14)	15(15)	19(19)	
	GG	0 (0)	1 (1)	1 (1)	

Número (%). Método estadístico aplicado: Chi-cuadrado.

TABLA IV
FRECUENCIA DE LOS DIPLOTIPOS

Polimorfismo	Diplotipo	Asmáticos	EPOC	Controles	P
ADAM33 V4/T1	CCAA	4 (4)	11 (11)	20 (20)	<0,05
	CCAG	0 (0)	2 (2)	3 (3)	
	CGAA	28 (27)	26 (26)	24 (24)	
	CGAG	4 (4)	3 (3)	6 (6)	
	GGAA	57 (55)	47 (47)	36 (36)	
	GGAG	10 (10)	10 (10)	10 (10)	
	GGGG	0	1 (1)	1 (1)	

Número (%). Método estadístico aplicado: Chi-cuadrado.

respuesta terapéutica y con ello a la progresión de la enfermedad. La comprensión de los eventos desencadenantes de la remodelación celular y tisular nos permiten diseñar un mejor abordaje farmacológico del paciente dependiendo del estadio y evitando la progresión de la patología. ADAM33 es uno de los elementos importantes dentro de la remodelación tisular. Varias variantes polimórficas del gen se han descrito (10), dentro de ellas se ha reportado que F+1, T1, S_2, ST+5 y V4 son más frecuentes en pacientes con asma (10-15) mientras que las variantes T1, T2, S1, Q-1, F+1 y ST+5 son más frecuentes en pacientes con EPOC. Lamentablemente, los estudios no son concluyentes dada la variabilidad de frecuencias en diferentes poblaciones.

Dentro de las variantes de ADAM33 estudiadas, el polimorfismo V4 está relacionado con el empalme alternativo, la eficiencia del empalme y por tanto con la estabilidad del ARNm, mientras que el polimorfismo T1 es la elimina-

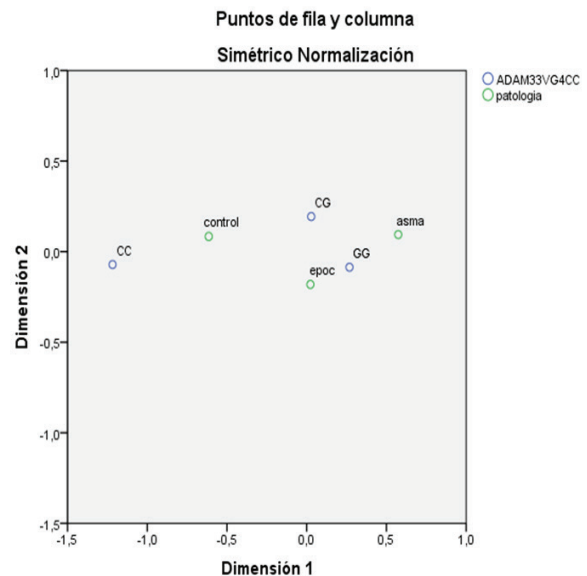


Fig. 1. Análisis de correspondencia entre patología (asma o EPOC) y frecuencia genética de V4.

TABLA V
ODDS RATIO DE LOS GENOTIPOS ADAM 33 V4 C/G Y ASMA BRONQUIAL

Polimorfismo	Genotipo	OR	IC	P
<i>ADAM 33 V4</i>	C/C	0,14	0,44 - 0,41	0,0004
	C/G	1,05	0,58-1,91	0,86
	G/G	2,10	1,19-3,69	0,01

Método estadístico aplicado: ANOVA de un factor con post test de Bonferroni

TABLA VI
ODDS RATIO DE LOS GENOTIPOS ADAM 33 V4 C/G Y EPOC

Polimorfismo	Genotipo	OR	IC	P
<i>ADAM33 V4</i>	C/C	0,48	0,22 - 1,01	0,05
	C/G	0,95	0,51-1,75	0,87
	G/G	1,55	0,89-2,72	0,12

Método estadístico aplicado: ANOVA de un factor con post test de Bonferroni

ción de un sitio de fosforilación importante para la señalización celular. En el presente trabajo, se demostró que las modificaciones en la estabilidad del mRNA que redundan en mayor cantidad de enzima secretada pueden estar involucradas en mayor recambio celular y por ende en mayor probabilidad de estar relacionado con la presencia de las dos enfermedades. A pesar de que las frecuencias polimórficas de la variante T1, relacionada con señalización celular, no son significativas, la significancia reportada con haplotipos y diplotipos sugiere que es necesario hacer un análisis más exhaustivo de los diferentes

polimorfismos. Además, se requiere de estudios longitudinales para abordar, con más detalle, la relación de ambos polimorfismos con severidad y progresión de las enfermedades.

El polimorfismo SNP V4 presenta una frecuencia alélica que varía entre distintos grupos poblacionales (26); sin embargo, nuestra población mestiza (27), según el estudio de polimorfismos del sistema mayor de histocompatibilidad, muestra una segregación particular con variantes africanas y amerindias diferentes a otras poblaciones mestizas. Los estudios estadísticos, que permiten establecer, sin lugar a

TABLA VII
ODDS RATIO DE LOS DIPLOTIPOS V4/T1 Y ASMA BRONQUIAL

	Diplotipo	OR	IC	P
	CCAA	1,16	0,05-0,49	0,0013
	CCAG	0,13	0,006-2,63	0,18
	CGAA	1,18	0,62-2,22	0,6
<i>ADAM33</i> V4/T1	CGAG	0,63	0,17-2,31	0,48
	GGAA	2,20	1,25-3,87	0,06
	GGAG	0,96	0,38-2,43	0,94
	GGGG	0,32	0,013-7,96	0,48

Método estadístico aplicado: ANOVA de un factor con post test de Bonferroni

dudas, si el polimorfismo es dominante o no, requieren un número elevado de muestras de diferentes centros clínicos del país dado lo heterogéneo de la segregación poblacional. A pesar de esa limitante, éste es el primer trabajo realizado en población mestiza venezolana, que evalúa estos polimorfismos de *ADAM33* en asma y EPOC.

La determinación de las variantes polimórficas en la población venezolana es de utilidad en la población infantil como lo destaca Vergara y col. (21) y en la población adulta como lo sugieren otros investigadores (22, 28). La presencia del polimorfismo, es un posible factor pronóstico de asma o EPOC y probablemente de la progresión a EPOC de pacientes asmáticos, no controlados, fumadores, de edad avanzada. Ambas enfermedades son altamente prevalentes en el país: asma (29) y EPOC (22).

La asociación de la variante V4 con rinitis alérgica también es llamativa y debe ser estudiado con mayor detalle (15, 21, 30). Recientemente, Dreytmüller y col. (31), revisando los diferentes abordajes terapéuticos en inflamación pulmonar y los diferentes miembros de la familia *ADAM*, enfatizan la importancia de la respuesta alérgica y la diferencia entre el modelo murino y humano. En el modelo murino no se observa relación entre las variantes polimórficas de *ADAM33* y la incidencia o severidad de asma (31). Por ello, es importante realizar estudios longitudinales con mayor número de pacientes en diferentes centros del país donde pueda analizarse la relación entre frecuencia del polimorfismo, la genética poblacional, el progreso de las enfermedades y su posible tratamiento.

Se concluye: 1) el polimorfismo V4 de *ADAM33* está relacionado con asma o EPOC

en la población mestiza venezolana, 2) el genotipo de ADAM33 V4 C/C está asociado a un riesgo disminuido de presentar asma y EPOC, 3) el genotipo de ADAM33 V4 G/G está asociado a un riesgo aumentado de presentar asma, 4) el diplotipo de GGAA de ADAM33 V4/T1 está asociado con un riesgo aumentado de presentar asma y 5) se requieren estudios con mayor población para analizar el impacto de la mutación en la población.

AGRADECIMIENTOS

Financiado Proyecto Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela proyecto de grupo (PG) 09-8803-2013/1.

REFERENCIAS

1. **Global Initiative for Asthma.** Guide for Asthma Management and Prevention. 2014 (<http://www.ginasthma.org/>)
2. **Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I.** Pathology of asthma. *Front Microbiol* 2013; 4:263-70.
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. **Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG.** Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm* 2013;2013:413735-413742.
5. **Ortiz RA, Barnes KC.** Genetics of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2015;35(1):19-44.
6. **Berndt A, Leme AS, Shapiro SD.** Emerging genetics of COPD. *EMBO Mol Med* 2012;4(11):1144-1155.
7. **Mersha TB.** Mapping asthma-associated variants in admixed populations. *Front Genet* 2015;29;6:292.
8. **Holgate ST, Davies DE, Rorke S Cakebread J, Murphy G, Powell RM, Holloway JW.** ADAM 33 and its association with airway remodeling and hyperresponsiveness in asthma. *Clin Rev Allerg Immunol* 2005; 27 (1): 23-34.
9. **Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ.** The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008; 29(5):258-289.
10. **Tripathi P, Awasthi S, Gao P.** ADAM metalloproteinase domain 33 (ADAM33): a promising target for asthma. *Mediators Inflamm* 2014;2014:572025-572032.
11. **Sharma N, Tripathi P, Awasthi S.** Role of ADAM33 gene and associated single nucleotide polymorphisms in asthma. *Allergy Rhinol (Providence)* 2011;2(2):e63-70
12. **Su D, Zhang X, Sui H, Lü F, Jin L, Zhang J.** Association of ADAM33 gene polymorphisms with adult allergic asthma and rhinitis in a Chinese Han population. *BMC Med Genet* 2008;9:82.
13. **Zheng W, Wang L, Su X, Hu XF.** Association between V4 polymorphism in the ADAM33 gene and asthma risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2015;14(1):989-999.
14. **Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Deng J.** A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis. *Hum Immunol* 2013;74(5):648-657.
15. **Karimi MR, Faridhosseini R, Abbaszadegan MR, Azad FJ, Shirkani A, Riyahi A, Montazar M, Gholamin M.** Association of ADAM33 gene polymorphisms with allergic asthma. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17(9):716-721.
16. **Li DD, Guo SJ, Jia LQ, Wen FQ.** Association of a disintegrin and metalloproteinase 33 (ADAM33) gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in the Chinese population: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13(3):6391-6397.

17. **Poon AH, Houseman EA, Ryan L, Sparrow D, Vokonas PS, Litonjua AA.** Variants of asthma and chronic obstructive pulmonary disease genes and lung function decline in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69(7):907-913.
18. **Zhang R, Li H, Zhao H, Chen W, Cheng D.** Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Respirology* 2014;19(3):312-320.
19. **Zhou DC, Zhou CF, Toloo S, Shen T, Tong SL, Zhu QX.** Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms with the risk of COPD: an updated meta-analysis of 2,644 cases and 4,804 controls. *Mol Biol Rep* 2015;42(2):409-422.
20. **Aierken H, Wang J, Wushouer Q, Shayhidin E, Hu X, Syed I, Wufuer D.** Polymorphisms of the ADAM33 gene and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis. *Clin Respir J* 2014;8(1):108-115.
21. **Vergara CI, Acevedo N, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, Gusmão L, Barnes KC, Caraballo L.** A Six-SNP haplotype of ADAM33 is associated with asthma in a population of Cartagena, Colombia. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152(1):32-40.
22. **Garmendia JV, Moreno DC, Tálamo C, De Sanctis JB.** Reactividad a aeroalergenos en pacientes con asma-EPOC en Caracas-Venezuela. *Pulmón* 2011; 2 (4) 25-28.
23. **Postma DS, Rabe KF.** The asthma-COPD overlap syndrome. *N Engl J Med* 2015;373(13):1241-1249.
24. **FitzGerald M, Bateman ED, Boulet LP, Cruz A, Haatela T, Levy M, O'Byrne P, Ohta K, Paggiario P, Pedersen S, Soto-Quiroz M, Wong G.** Pocket Guide for Asthma management and Prevention. For adults and children 5 years and older GINA. 2014. Medical Communications Resources. URL: http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_PocketGuide_2014.pdf pp8.
25. **American Thoracic Society.** European Respiratory Society. 2003. Standards for the diagnosis and management of patients with COPD. URL:<http://www.thoracic.org/copd-guidelines/2004>.
26. **1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA.** An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491(7422):56-65.
27. **Del Pilar Fortes M, Gill G, Paredes ME, Gamez LE, Palacios M, Blanca I, Tassinari P.** Allele and haplotype frequencies at human leukocyte antigen class I and II genes in Venezuela's population. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012;70(2):175-181.
28. **Wang X, Li W, Huang K, Kang X, Li Z, Yang C, Wu X, Chen L.** Genetic variants in ADAM33 are associated with airway inflammation and lung function in COPD. *BMC Pulm Med* 2014;14:173.
29. **Tovar-Villamizar I, Garcia-Lamoggia M, Meza J, Romero J.** Generalidades: El asma como problema de salud pública. Definición. Factores de riesgo. Fenotipos. *Arch Venez Puer Ped* 2010; 73:48-54.
30. **Li Z, Yan F, Yang Z, Zhou J, Chen Y, Ding Z.** Association between ADAM33 S2 and V4 polymorphisms and susceptibility to allergic rhinitis: A meta-analysis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015 Nov 24. doi:10.1016/j.aller.2015.05.013.
31. **Dreymueller D, Uhlig S, Ludwig A.** ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308(4):L325-343.