

TESIS DOCTORAL

*ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN
DE LA FILAGRINA Y SU RELACIÓN CON
DIVERSOS FENOTIPOS DE ASMA*

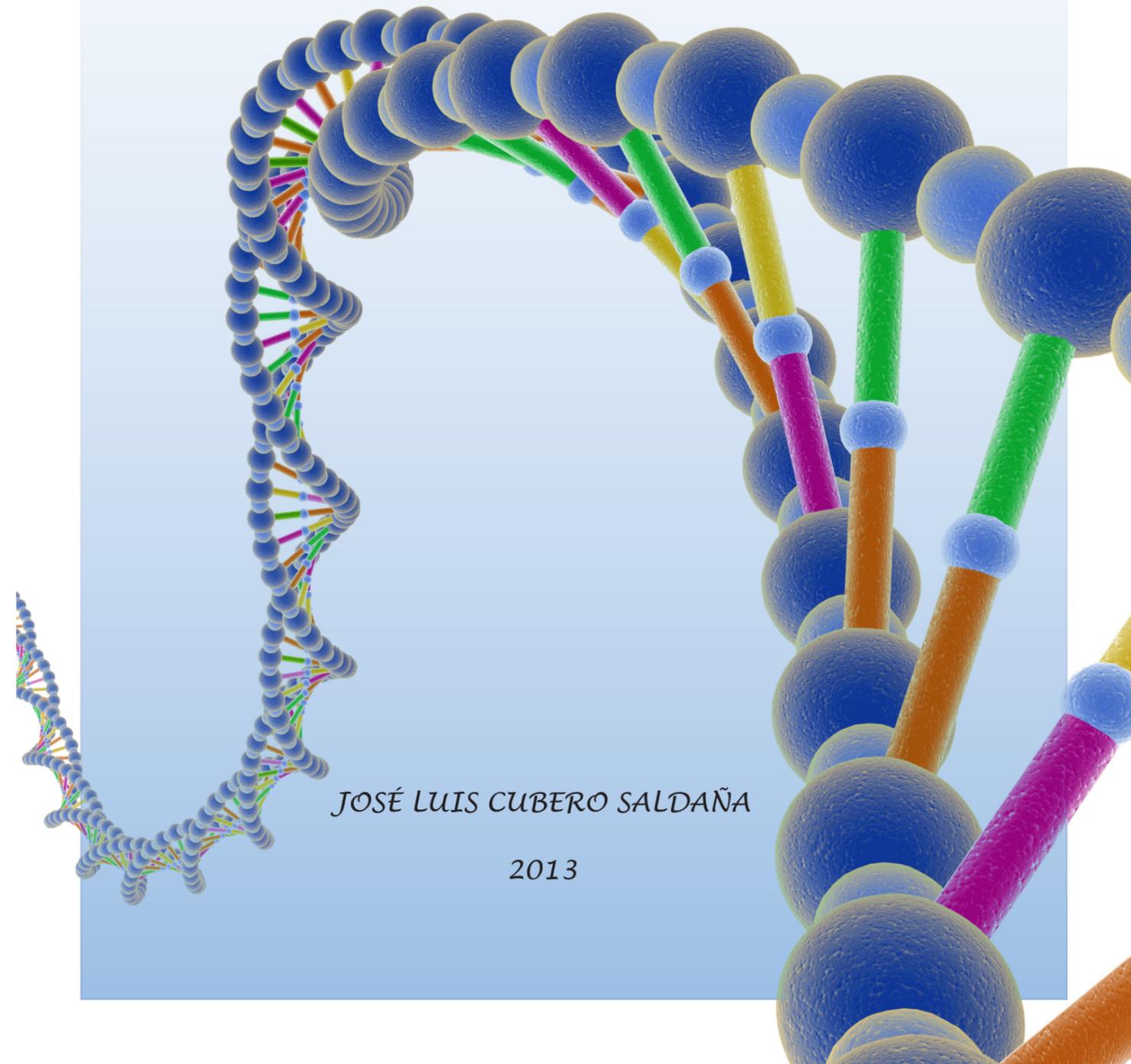
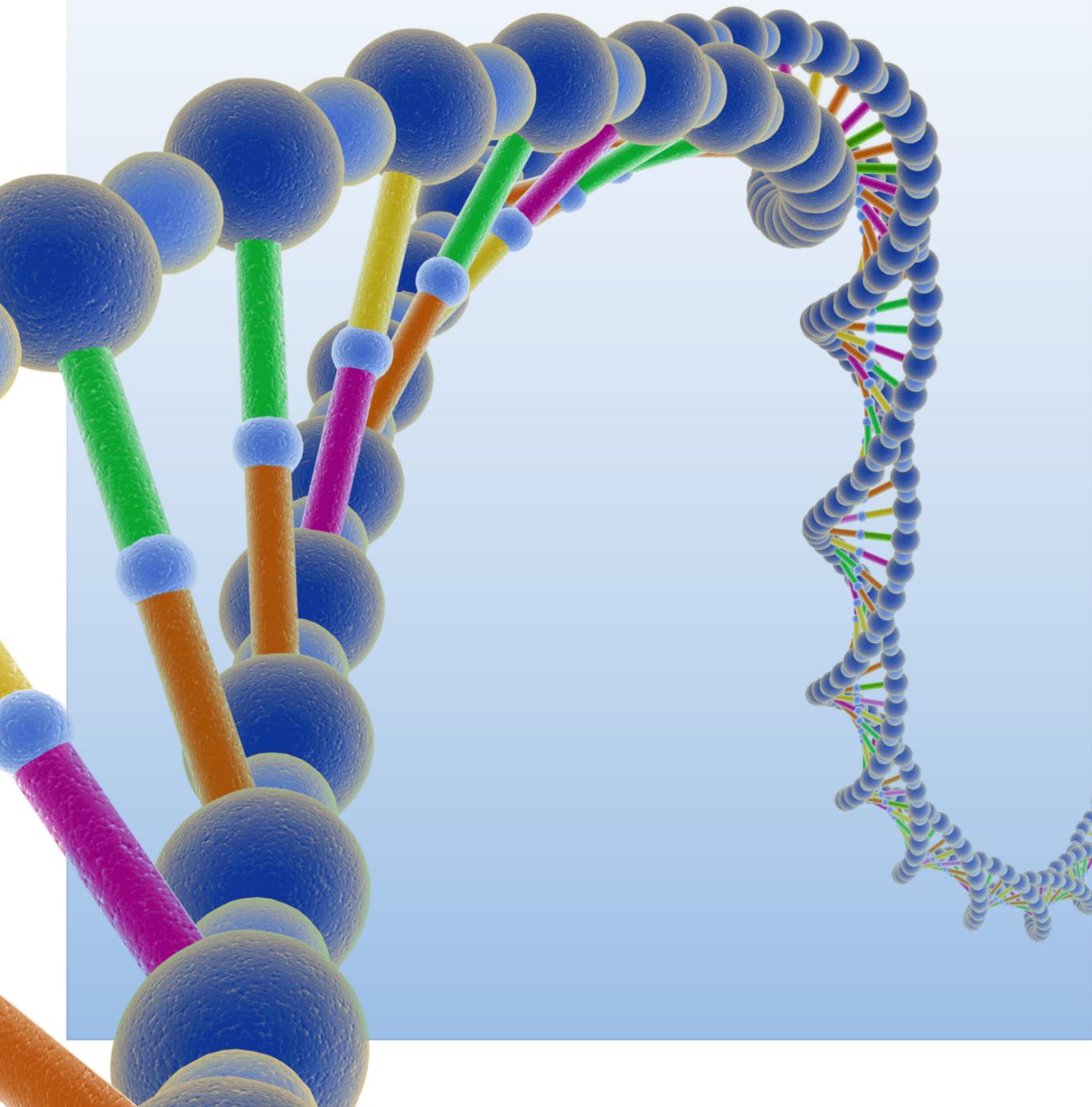
JOSÉ LUIS CUBERO SALDAÑA

2013

ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA FILAGRINA Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS FENOTIPOS DE ASMA

JOSÉ LUIS
CUBERO SALDAÑA

2013



DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

*ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL GEN
DE LA FILAGRINA Y SU RELACIÓN CON
DIVERSOS FENOTIPOS DE ASMA*

Memoria presentada por D. José Luis Cubero Saldaña para optar al
Título de Doctor

2013

El Dr. D. Carlos Colás Sanz, el Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González, la Prof^a.
Dra. Dña. María Isidoro García,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio de las mutaciones en el gen de la filagrina y su relación con diversos fenotipos de asma”, que presenta el licenciado en Medicina Don José Luis Cubero Saldaña ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a de de 2013.

Fdo: Dr. Carlos Colás Sanz

Fdo: Prof. Dr. Ignacio J. Dávila González

Fdo: Prof^a. Dra. María Isidoro García

Dedico este trabajo a Paula, mi mujer, a mi futura hija y a mi familia
por su apoyo incondicional

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han estado a mi lado en la consecución de este trabajo:

Al Dr. Carlos Colás Sanz, director de esta Tesis, por crear un estupendo equipo de trabajo con unas cualidades científicas y humanas excepcionales que me han formado como profesional. Gracias por apoyarme desde el primer momento.

Al Dr. Ignacio Dávila González, director de esta Tesis, por la confianza que me ha demostrado desde el primer día, y por sus sabios consejos.

A la Dra. María Isidoro García, directora de esta Tesis, por su apoyo, su ilusión y sus ánimos continuos, y por su completa dedicación en este trabajo.

A todos los médicos y enfermeras del Servicio de Alergia del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, sin cuya inestimable colaboración hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. David Benito Pescador, a la Dra. Catalina Sanz Lozano, a la Dra. Laura Hernández Hernández y a la Dra. Virginia García Solaesa, por sus incalculables enseñanzas y ayudas en el trabajo de laboratorio.

A todo el Servicio y Laboratorio de Alergología del Hospital Universitario de Salamanca por acogerme y hacerme sentir uno más del equipo.

A todos los pacientes que han colaborado de forma totalmente desinteresada.

A la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC) y a la Fundación Aragonesa para el Desarrollo de la Investigación en Alergología (FADIA) por su respaldo económico.

Y finalmente a mi familia, a la que no tendré nunca palabras para agradecer todo lo que me han dado.

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

Albert Einstein

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Asma	3
1.1.1. Definición	5
1.1.2. Fenotipos	8
1.1.2.1. Asma intrínseca.....	8
1.1.2.2. Asma extrínseca.....	9
1.1.2.3. Formas especiales de asma.....	10
1.1.2.4. Otros fenotipos de asma	11
1.1.2.5. Endotipos	15
1.1.3. Diagnóstico	16
1.1.3.1. Diagnóstico clínico	16
1.1.3.2. Espirometría forzada	17
1.1.3.3. Pruebas de provocación bronquial	20
1.1.3.4. Óxido nítrico en aire espirado.....	23
1.1.3.5. Otros métodos de diagnóstico de la inflamación ..	25
1.1.4. Calidad de vida en el asma.....	29
1.2. Genética del asma	34
1.2.1. Estrategias de estudio de genes asociados a asma	34
1.2.1.1. Estudios de ligamiento del genoma completo	34
1.2.1.2. Estudios de asociación de genes candidatos.....	35

1.2.1.3. Estudios de asociación en genoma completo.....	36
1.2.2. Genes asociados con el asma	39
1.2.2.1. Genes asociados con la respuesta inmune innata y su regulación.....	43
1.2.2.2. Genes asociados con la diferenciación y funciones efectoras de los linfocitos Th2.....	44
1.2.2.3. Genes asociados con la biología epitelial y la inmunidad de las mucosas	46
1.2.2.4. Genes asociados con la función pulmonar, a la remodelación del epitelio bronquial y a la gravedad de la enfermedad	47
1.2.2.5. Genes obtenidos mediante estudios de ligamiento	48
1.2.3. Epigenética del asma.....	50
1.2.3.1. Mecanismos epigenéticos	51
1.2.4. Farmacogenética del asma.....	53
1.2.4.1. β 2-agonistas.....	54
1.2.4.2. Antileucotrienos	55
1.2.4.3. Corticosteroides.....	56
1.3. Filagrina.....	57
1.3.1. Proteína.....	57
1.3.2. El gen <i>FLG</i>	60
1.3.3. Genética molecular	62

1.3.4. Asociación de las mutaciones del gen <i>FLG</i> con la dermatitis atópica.....	66
1.3.5. Asociación de las mutaciones del gen <i>FLG</i> con el asma...	71
1.3.6. Asociación de las mutaciones del gen <i>FLG</i> con la rinitis alérgica	76
1.3.7. Asociación de las mutaciones del gen <i>FLG</i> con sensibilización a alérgenos	76
1.3.8. Asociación de las mutaciones del gen <i>FLG</i> con otras enfermedades cutáneas	77
1.3.8.1. Psoriasis.....	77
1.3.8.2. Dermatitis alérgica de contacto	78
1.3.8.3. Eczema crónico de manos	78
1.3.8.4. Alopecia aerata	78
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	79
3. OBJETIVOS	83
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
4.1. Población estudiada	89
4.1.1. Grupo Atópico	89
4.1.2. Grupo Intrínseco	90
4.1.3. Grupo Control	90
4.2. Variables analizadas	90

4.2.1. Valores de la espirometría forzada y de la prueba broncodilatadora	91
4.2.2. Determinación de óxido nítrico exhalado	92
4.2.3. Pruebas cutáneas	92
4.2.4. Determinación del valor de IgE total	93
4.2.5. Gravedad del asma según la guía GINA.....	93
4.2.6. Escalón de tratamiento actual según la guía GINA.....	94
4.2.7. Cuestionario de calidad de vida miniAQLQ.....	95
4.2.8. Resultado del cuestionario de control del asma ACT.....	96
4.2.9. Evaluación de la gravedad de rinitis alérgica	96
4.2.10. Evaluación de la gravedad de rinosinusitis crónica	97
4.3. Genotipado	97
4.3.1. Extracción de ADN	97
4.3.2. Análisis de la calidad del ADN	99
4.3.3. PCR.....	100
4.3.3.1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados.....	102
4.3.3.2. Purificación	103
4.3.4. Análisis de la mutación R501X.....	104
4.3.5. Análisis de la mutación 2282del4.....	106
4.3.5.1. Digestión con la enzima de restricción DraIII.....	106
4.3.5.2. Electroforesis en gel de agarosa	109
4.3.5.3. Comprobación de los ADN mutados.....	110

4.3.5.4. Comprobación aleatoria de ADN no mutados	111
4.3.6. Control de calidad del laboratorio	111
4.3.7. Estudio “ <i>in silico</i> ”	111
4.3.7.1. Estudio de la secuencia nucleotídica de referencia	111
4.3.7.2. Análisis de las secuencias	113
4.3.7.3. Búsqueda de polimorfismos	113
4.3.7.4. Análisis de las frecuencias alélicas	114
4.3.7.5. Predicción proteica	115
4.4. Análisis estadístico	117
4.4.1. Análisis descriptivo	117
4.4.2. Análisis bivalente	117
4.4.3. Análisis multivalente	118
4.4.4. Análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas.....	118
4.4.5. Estudio de haplotipos.....	119
4.4.6. Control de calidad del análisis de los datos	119
5. RESULTADOS	121
5.1. Estadística descriptiva.....	123
5.1.1. Características de la población de estudio	123
5.1.2. Antecedentes familiares y personales de interés.....	124
5.1.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total.....	125
5.1.4. Patología nasosinusal.....	127

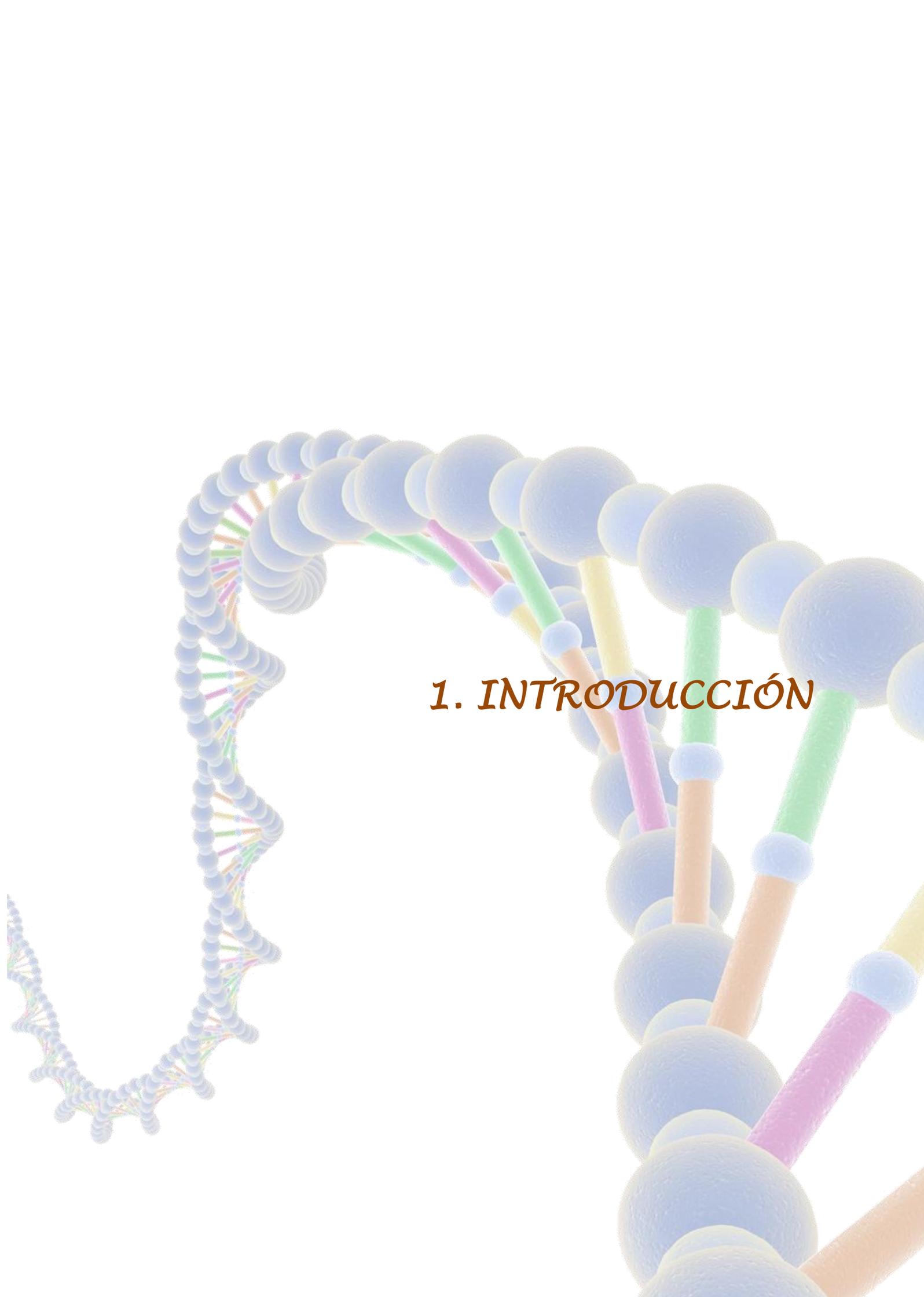
5.1.5. Características del asma.....	129
5.2. Análisis bivariante.....	136
5.2.1. Características de la población de estudio.....	136
5.2.2. Antecedentes familiares y personales de interés	137
5.2.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total	138
5.2.4. Patología nasosinusal	139
5.2.5. Características del asma.....	140
5.3. Estudio genético de <i>FLG</i>	142
5.3.1. Nuevos polimorfismos en el gen <i>FLG</i>	142
5.3.1.1. c.1741A>T	148
5.3.1.2. c.1747C>A.....	154
5.3.1.3. c.1594C>T.....	154
5.3.1.4. c.1607T>A.....	155
5.3.1.5 c.1676A>G.....	155
5.3.1.6. c.1494G>C	156
5.3.1.7. c.1560G>A.....	156
5.3.1.8. c.1603T>C	157
5.3.1.9. c.1632C>T	157
5.3.1.10. c.1807G>A.....	157
5.3.2. Estudio de las mutaciones R501X y 2282del4	158
5.3.2.1. Características de la población de estudio	159
5.3.2.2. Antecedentes familiares y personales de interés.....	161

5.3.2.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total	161
5.3.2.4. Patología nasosinusal	163
5.3.2.5. Características del asma	164
6. DISCUSIÓN	169
6.1. Características de la muestra estudiada	171
6.2. Estudio genético	180
7. CONCLUSIONES	191
8. BIBLIOGRAFÍA	195
9. ANEXOS	217
9.1. Anexo 1	219
9.2. Anexo 2	229

TABLA DE ABREVIATURAS

5-LO: 5-lipoxigenasa	EIA: asma inducida por el ejercicio
AAQOL: <i>Adolescent Asthma Quality of Life Questionnaire</i>	EPO: peroxidasa del eosinófilo
ACT: <i>Asthma Control Test</i>	EPOS: <i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps</i>
ADN: ácido desoxirribonucleico o DNA	EPX: proteína eosinofílica X
ADRB2 : receptor β 2-adrenérgico humano	ERS: <i>European Respiratory Society</i>
AINE: antiinflamatorios no esteroideos	EuroQoL: cuestionario <i>European Quality Of Life</i>
AIR Index: <i>Asthma Impact Record</i>	EVA: Escala Visual Analógica
ANOVA: análisis de la varianza	FcϵR1: receptor de alta afinidad de la IgE
AQLQ: <i>Asthma Quality of Life Questionnaire</i>	FcϵRII: receptor de baja afinidad de la IgE
Arg: arginina	FEF25-75: flujo espiratorio forzado entre el 25% y el 75% de la FVC
ARIA: <i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>	FeNO: fracción exhalada de óxido nítrico
BAL: líquido del lavado broncoalveolar	FEV1/FEV6: cociente entre FEV1 y FEV6
BIE: broncoconstricción inducida por ejercicio.	FEV1/FVC: cociente entre FEV1 y FVC
BTS: <i>British Thoracic Society</i>	FEV1/VC: cociente entre FEV1 y VC
CAQ: <i>Childhood Asthma Questionnaire</i>	FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo
CCL: <i>CC-chemokine</i>	FEV6: volumen espiratorio forzado en 6 segundos
COX: ciclooxigenasa	FPRP: <i>False Positive Report Probability</i>
CVRS: calidad de vida relacionada con la salud	FVC: capacidad vital forzada
CysLT1: receptor de leucotrienos cisteinílicos 1	GATA3: <i>GATA-binding protein 3</i>
DCA: <i>Diary for Caregivers of Asthmatic Children</i>	GINA: <i>Global Initiative for Asthma</i>
DNA: ácido desoxirribonucleico o ADN	GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
DNMT: metiltransferasas del DNA	GSTM1: Glutation-S-Transferasa M1
EAACI: <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>	GSTP1: Glutation-S-Transferasa P1
ECP: proteína catiónica del eosinófilo	GWA: estudios de asociación en genoma completo
ECRHS: <i>European Community Respiratory Healt Survey</i>	HAT: acetiltransferasas de histonas
EDC: <i>Epidermal Differentiation Complex</i>	HDAC: desacetilasas de histonas
EDN: neurotoxina derivada del eosinófilo	His: histidina
	HLA-II: complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
	HRB: hiperreactividad bronquial
	IgE: inmunoglobulina E

IL: interleuquina
ISAAC: *International Study of Asthma and Allergy in Children*
Kb: 1000 pares de bases
LT: leucotrieno
LTA: linfotóxina- α
LTA4H: LTA4 epoxi-hidrolasa
LTC4S: sintetasa de leucotrieno C4
LWAQ: *Living with Asthma Questionnaire*
MBP: proteína básica principal
MEF25: flujos espiratorios forzados al 25%
MEF50: flujos espiratorios forzados al 50%
Mini-AQLQ: *Mini Asthma Quality of Life Questionnaire*
MMEF: flujo medio mesoespiratorio
MPO: mieloperoxidasa
NO: óxido nítrico
NOD1: *Nucleotide-binding oligomerization Domain containing 1*
NOD2: *Nucleotide-binding oligomerization Domain containing 2*
NOS1: sintetasa de óxido nítrico 1
OMS: Organización Mundial de la Salud
OR: *Odds Ratio*
PACQLQ: *Paediatric Asthma Caregivers Quality of Life Questionnaire*
PAF: factor activador de las plaquetas
PAQLQ: *Paediatric Asthma Quality of Life Questionnaire*
Pb: pares de bases
PC₂₀: concentración necesaria para inducir un deterioro del FEV1 del 20%
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PG: prostaglandina
PGD2: prostaglandina D2
PGE2: prostaglandina E2
PHD: *Plant HomeoDomain*
PTGER2: receptor de prostaglandina E2
QOL-RIQ: *Quality-Of-Life for Respiratory Illness Questionnaire*
SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SF12: cuestionario *Short Form 12*
SF36: cuestionario *Short Form 36*
SGRQ: *St. George's Respiratory Questionnaire*
SIP: cuestionario *Sickness Impact Profile*
SNP: polimorfismos de un único nucleótido
STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
STAT6: *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*
TBXA2R: receptor del tromboxano A2
TGFB1: *Transforming Growth Factor β 1*
TGF- β : *Transforming Growth Factor β*
Th: linfocito T colaborador
THH: tricohialina
TLR: receptores *Toll-like*
TNC: tenascina-C
TNF: factor de necrosis tumoral
VC: volumen corriente
VPN: valor predictivo negativo
VPP: valor predictivo positivo



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Asma

El asma como síntoma se recoge ya en el papiro de Ebers en 3500 A.C. y fue Hipócrates quien primero usó esta palabra para describirlo como una enfermedad. Maimónides es reconocido como el primer autor de una monografía sobre el proceso. Su etimología proviene del latín *asthma* y ésta a su vez del griego *ἄσθμα*, que significa “jadeo”.

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias en la que intervienen numerosas células y elementos celulares. La inflamación crónica se asocia con hiperreactividad bronquial, que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, principalmente nocturnos o a primeras horas de la mañana. Estos episodios se encuentran habitualmente asociados a una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea espontánea o por acción farmacológica (1).

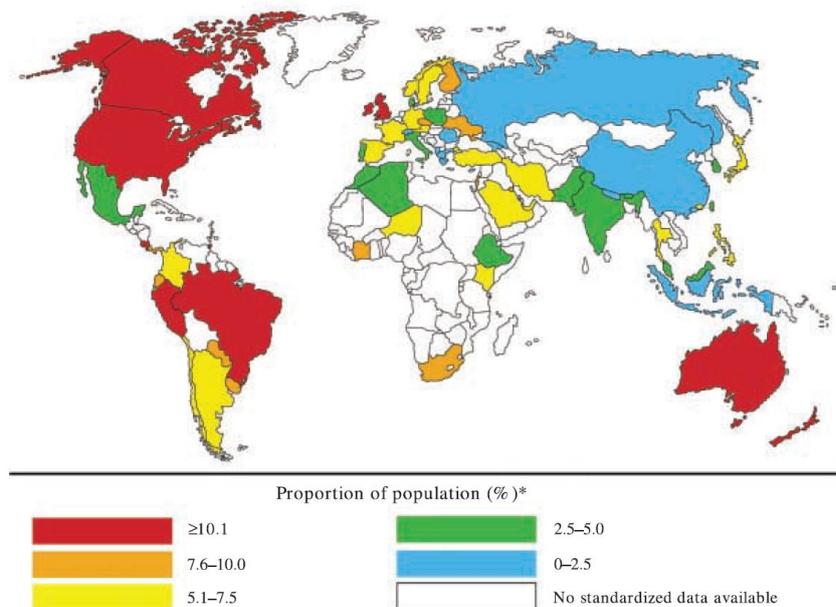


Ilustración 1. Mapa mundial de la prevalencia de asma. Tomado de Masoli y cols. (2).

Se estima que en todo el mundo existen aproximadamente unos 300 millones de asmáticos (3). La distribución a nivel mundial no es homogénea en todos los países, de manera que la prevalencia oscila entre el 1-18% en los distintos países (2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al año se producen 250.000 muertes debidas al asma, lo que supone un 1% del total de muertes por enfermedad (3).

La prevalencia del asma en España se encuentra entre el 4,3% y 16,3% en niños (4, 5) y entre el 1,4% y el 3,4% en adultos (6). Esta enfermedad es la manifestación más frecuente de alergia después de la rinitis. Hasta la actualidad, se han elaborado varios cuestionarios epidemiológicos: cuestionario del *International Study of Asthma and Allergy in Children* (ISAAC) (4, 5), el cuestionario de la *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS) (7) y otros estudios realizados en Inglaterra (8), Australia (9), Estados Unidos (10) y Nueva Zelanda (11). Todos ellos refieren que se ha producido un aumento de prevalencia del asma (4, 5, 12). Algunos autores siguen sosteniendo que la falta reiterada de estandarización de los métodos de estudio epidemiológico y la escasez de estudios que han utilizado marcadores objetivos del asma hacen que siga habiendo insuficientes indicios para demostrar que la prevalencia del asma ha aumentado. También propugnan que el aumento de los casos notificados solo refleja el cambio en la conducta diagnóstica de los médicos o la mejor identificación de la enfermedad por parte de los padres. No obstante, en los estudios en los que se han verificado los síntomas referidos por el paciente, aunque la prevalencia de los diagnósticos de asma ha aumentado (lo que indica cierto sesgo hacia una mayor detección de la enfermedad), sí se ha constatado un aumento real de prevalencia. Asimismo, también lo han hecho la prevalencia de los síntomas y la utilización de los servicios sanitarios debido a esta enfermedad (13).

Los costes que supone el asma son sustanciosos, tanto en términos económicos: costes de tratamiento y hospitalización; como sociales (14): se estima que el asma es una causa frecuente de ausencia del puesto de trabajo en muchos países industrializados, incluyendo Australia, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos (15).

1.1.1. Definición

El asma bronquial es una enfermedad caracterizada por la inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial a diferentes estímulos y una obstrucción bronquial variable espontáneamente o con tratamiento. Es, por su morbimortalidad, la patología crónica más importante en la infancia, con una prevalencia que además ha aumentado en los países occidentales en las últimas décadas y cuyas exacerbaciones o crisis son un motivo de consulta, tanto ambulatoria [en la Comunidad de Madrid, las estimaciones describen una incidencia anual de 3,5 episodios por cada 100 habitantes de 0 a 14 años y de 0,6% en los mayores de 14 años (16)] como hospitalaria [en España, alrededor del 1 % del total de urgencias atendidas en el hospital en la población mayor de 14 años son consecuencia de esta enfermedad (17, 18), cifra que se incrementa si consideramos también a la población infantil]. Este aumento ha sido objetivado en numerosos estudios tanto extranjeros como nacionales, entre ellos el citado estudio ISAAC. La prevalencia del asma en la infancia parece estar aumentando en los países industrializados de forma constante desde los años setenta, siendo la magnitud de este incremento mayor en los países anglosajones (5).

El asma es un síndrome complejo con múltiples fenotipos, tanto en niños como en adultos. Su desarrollo depende de la interacción de factores genéticos, ambientales y una gran variedad de desencadenantes específicos y no específicos. El asma es una enfermedad en la que la interacción de los factores ambientales a edades tempranas es crucial para el posterior desarrollo de una enfermedad crónica y persistente. La identificación de estos factores es esencial para el desarrollo de estrategias de prevención primaria eficaces, que deben ir enfocadas a evitar la aparición de estos eventos en la infancia. De ahí la importancia de realizar el estudio alergológico en los niños para objetivar posible hipersensibilidad a algún aeroalérgeno. La sensibilización a alérgenos comunes puede iniciar y mantener el proceso inflamatorio de la vía aérea que conduce al desarrollo de asma (19, 20).

Para que la inhalación del alérgeno inicie una respuesta inflamatoria mediada por la IgE en las vías respiratorias, debe ser captado por las células dendríticas, que migran a los nódulos linfáticos donde presentan el antígeno

procesado a las células T. Las células presentadoras de antígenos son cruciales en el inicio y control de la inflamación alérgica, presentan el antígeno a los linfocitos CD4+.

La interacción entre estas células y el tipo de respuesta inmune está influenciada por la presencia o ausencia de determinadas citocinas. La presencia de IL-4, IL-5, IL-13 (patrón de citocinas Th2) induce a las células B a la producción de IgE. Existe un gran número de citocinas que participan y regulan la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias en el asma.

La IgE producida y liberada por las células B se une a su receptor de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de los mastocitos tisulares o los basófilos periféricos y a los receptores de baja afinidad (FcεRII o CD23) presentes en linfocitos, eosinófilos, plaquetas y macrófagos. En el caso del receptor de alta afinidad, cuando el alérgeno interacciona al menos con dos moléculas de IgE, unidas cada una a su receptor de membrana, se produce la activación celular y la liberación de mediadores preformados, junto con la producción de nuevos mediadores. Tanto los mastocitos como los basófilos pueden liberar IL-13 e IL-14 –y, además, expresar CD40L-, induciendo una mayor síntesis de IgE y potenciando la reacción inflamatoria alérgica (21).

Los eosinófilos son estimulados principalmente por la IL-5 y, a su vez, producen IL-3, IL-5, GM-CSF y, en fase de activación, segregan proteínas proinflamatorias como la proteína básica principal (MBP), la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN), peroxidasas y la proteína catiónica (ECP). La MBP del eosinófilo está directamente relacionada con el daño del epitelio de la vía respiratoria, intensificando la hiperreactividad bronquial e induciendo la desgranulación de basófilos y nuevos eosinófilos, incrementando la gravedad del asma (22, 23).

Los principales factores que contribuyen a la morbimortalidad del asma son un diagnóstico tardío y un tratamiento inadecuado. El infradiagnóstico del asma está favorecido por una búsqueda tardía de asistencia médica, poca atención a los síntomas o por un diagnóstico erróneo (confusión con síntomas propios de una infección bronquial). El infradiagnóstico del asma conlleva, así

mismo, un mal tratamiento y, como consecuencia, un incremento en su morbimortalidad (24, 25).

Asma e hiperreactividad bronquial no son sinónimos. La hiperreactividad bronquial es una de las características fisiopatológicas del asma y su manifestación clínica, el broncoespasmo, uno de los puntos a combatir en el tratamiento de la crisis asmática.

Los estudios longitudinales muestran que solo una pequeña proporción de las personas con asma presenta síntomas de manera continuada a lo largo de la vida, mientras que, en la mayoría de los casos, el asma adopta una presentación sintomática intermitente, con periodos variables de actividad (26).

La expectativa de vida de la población, en los países desarrollados y gracias a los cambios acontecidos en política socio-laboral y sanitaria en las últimas décadas, ha supuesto un progresivo aumento en la longevidad de los ciudadanos. Debido a ello han surgido enfermedades crónicas y discapacidades que antes no tenían lugar. Es por ello que los futuros objetivos estratégicos se dirigen, no tanto al aumento en los años de vida, sino a la calidad o valor del tiempo de vida, en definitiva, al bienestar subjetivo de la persona (27). La medición de la salud debe incluir, no solo el análisis del estado de salud, sino también la utilidad que el paciente hace de ésta y la satisfacción que le produce (28). La definición del término calidad de vida es complicada. La calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) es el componente de la calidad de vida global que está determinado principalmente por la salud del individuo y puede ser influenciado por las intervenciones médicas. Las consecuencias producidas por cualquier enfermedad vienen determinadas, no solo por el daño anatómico-fisiológico y el deterioro funcional presentes, sino también por la valoración personal que el propio sujeto realiza sobre las repercusiones que ese daño y ese deterioro ocasionan en su equilibrio psicológico y grado de bienestar, de acuerdo con su percepción e interpretación. En el fondo, el concepto de CVRS, que es una valoración multidimensional, refleja la definición que la Organización Mundial de la Salud otorga al término salud: el estado de completo bienestar físico, mental y social, y no meramente la ausencia de enfermedad (29). Por ello en personas con enfermedades de larga evolución, como las enfermedades

alérgicas, incluida el asma, la valoración de la CVRS es aún más relevante, dado el carácter muchas veces crónico de las mismas.

1.1.2. Fenotipos

Entendemos por “fenotipo” el conjunto de características observables en un individuo que resultan de la interacción entre los genes que posee (genotipo) y el medio ambiente.

Tradicionalmente, se ha clasificado el asma en dos fenotipos: asma extrínseca (también llamada atópica o alérgica) e intrínseca (o no alérgica), dependiendo de los estímulos que la desencadenen.

1.1.2.1. Asma intrínseca

El término “asma intrínseca” fue propuesto por Rackemann (30) para denominar al asma que afectaba a los pacientes que presentaban pruebas cutáneas negativas con los alérgenos inhalantes conocidos. Sin embargo, durante los años siguientes esta enfermedad se ha considerado como un proceso con identidad propia y diferente del asma alérgica, y se le han asignado una serie de características, como cursar con valores de inmunoglobulina E (IgE) sérica total normales, comenzar en la edad adulta, ser más frecuente en mujeres y la tendencia a la asociación con poliposis nasosinusal e intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos.

Es indudable que el asma alérgica puede comenzar también en la edad adulta y se ha encontrado que entre el 48 y el 80% de los individuos adultos con asma están sensibilizados a algún inhalante (31-33). Finalmente, la intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos se observa también en los pacientes con asma alérgica (34). En consecuencia, la única característica clínica exclusiva del asma intrínseca es la ausencia de sensibilización a los inhalantes conocidos.

En el líquido del lavado broncoalveolar (BAL) de los pacientes asmáticos tanto intrínsecos como extrínsecos se encuentra un aumento del número de

linfocitos, mastocitos y de eosinófilos, así como evidencia de activación de los macrófagos, en comparación con los controles no asmáticos. Las biopsias bronquiales muestran un aumento del número y de la activación de los mastocitos, de los macrófagos, de los eosinófilos y de los linfocitos T (35).

1.1.2.2. Asma extrínseca

El término “asma extrínseca” se ha aplicado clásicamente a los pacientes en los que se puede objetivar una sensibilización a algún aeroalérgeno y que además pueda haber una relación entre la clínica del paciente y la exposición al mismo.

Los pacientes que presentan un fenotipo atópico del asma frecuentemente asocian otras enfermedades como dermatitis atópica, rinitis alérgica, alergia alimentaria, etc. y es habitual que el asma sea una de las manifestaciones finales de la "marcha alérgica" (con este término que pretende definir la historia natural de las enfermedades alérgicas que siguen la secuencia de sensibilización, aparición de los síntomas, persistencia de éstos durante unos años o décadas y, en ocasiones, tendencia a la remisión con la edad). La atopia se refiere a esa predisposición a padecer rinitis, asma y dermatitis atópica asociada a la producción de IgE específica frente a alérgenos.

La inflamación en el asma alérgica está dirigida por la respuesta IgE frente a los alérgenos específicos. Esta respuesta inflamatoria alérgica se caracteriza por una intensa infiltración celular resultante de la activación de las células residentes y de las células circulantes que son reclutadas a las vías respiratorias. Una importante característica del infiltrado inflamatorio es la naturaleza multicelular de la reacción que, principalmente, está compuesta por eosinófilos pero incluye además neutrófilos, linfocitos y células mononucleares en un grado variable. Mientras que los eosinófilos, los neutrófilos y los linfocitos T son reclutados de la circulación, los mastocitos, los macrófagos y las células dendríticas son células residentes de la vía respiratoria.

Las células dendríticas procesan el alérgeno y se lo presentan a las células T. En respuesta a los alérgenos, los linfocitos T producen una serie

restringida de citocinas. En particular, las citocinas implicadas en la respuesta alérgica (IL-4, IL-5) son sintetizadas por los linfocitos Th2, subtipo de las células T CD4+ o colaboradoras. El otro subtipo, las células Th1, se han involucrado en la defensa contra virus y antagonizan la respuesta alérgica. Los pacientes atópicos sintetizan en mayor medida IL-4, que favorece la respuesta Th2 y la síntesis de la IgE, a la vez que bloquea la respuesta Th1 (21).

Las células T colaboradoras no son la única fuente de citocinas favorecedoras de la respuesta alérgica, por el contrario, los mastocitos, los basófilos, los eosinófilos, las células T supresoras, los fibroblastos y las células del músculo liso pueden sintetizar IL-4, IL-5, IL-9 o IL-13, todas ellas codificadas en la región 5q del cromosoma 5 (36).

La liberación de proteasas neutras por los mastocitos activados, por la vía del receptor de la IgE, puede activar los receptores de las células endoteliales y epiteliales que, a su vez, lleva a la producción de citocinas y moléculas de adhesión que, selectivamente, reclutan eosinófilos y neutrófilos al foco de la inflamación. Los eosinófilos desempeñan un papel importante en la patogénesis del asma alérgica (37). Secretan, además de proteínas catiónicas, múltiples mediadores inflamatorios incluyendo citocinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor transformador de crecimiento (TGF)- β , prostaglandina E2 (PGE2), leucotrienos cisteinílicos, factor activador de las plaquetas (PAF), así como moléculas de oxígeno reactivas, péptidos citotóxicos y enzimas de degradación, como la elastasa y la colagenasa (38). Así, la respuesta inflamatoria es la causante directa de los procesos de daño y de reparación tisular.

1.1.2.3. Formas especiales de asma

Sobre una base común de inflamación crónica de las vías respiratorias y de la obstrucción variable al flujo aéreo, la enfermedad afecta a todas las edades y condiciones de la vida. Existen características diferenciales de la enfermedad a lo largo de la vida, pudiendo hablar de asma en la infancia, asma en la edad avanzada y asma en el embarazo (39).

La enfermedad puede presentarse con diferente intensidad, desde las formas más leves, como es el caso de los pacientes que solo presentan síntomas al realizar esfuerzos físicos (asma inducida por ejercicio físico) a las presentaciones que, aunque hoy en día son afortunadamente una minoría, pueden comprometer la vida del paciente (asma grave, que aglutina a un conjunto de formas clínicas como el asma refractaria, asma inestable, asma de riesgo vital, asma de difícil control, etc.) (39).

1.1.2.4. Otros fenotipos de asma

A lo largo de los años han ido añadiendo otros fenotipos a los ya clásicos “intrínseco” y “extrínseco” acuñados por Rackemann, como el asma inducida por aspirina, asma ocupacional, asma lábil, asma irreversible, ...

Wenzel (40), en su revisión de 2006, proponen tres categorías de fenotipos dependiendo de: criterios clínicos o fisiopatológicos; los relacionados con factores o estímulos desencadenantes y, por último, definidos por factores pato-biológicos (inflamatorios).

a) Fenotipos basados en características clínicas y funcionales:

- Gravedad del asma.
- Predisposición a frecuentes exacerbaciones.
- Obstrucción crónica al flujo aéreo.
- Resistencia a corticoides.
- Edad de comienzo:
 - fenotipo de inicio precoz (<12 años).
 - fenotipo de inicio tardío (>12 años).

b) Fenotipos relacionados con el tipo de estímulo/factor de riesgo o desencadenante:

- Ácido acetilsalicílico y antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

- Alérgenos medioambientales: fenotipo alérgico.
- Ocupacionales o irritantes.
- Menstruación.
- Ejercicio físico.

c) Fenotipos inflamatorios:

- Eosinofílico.
- Neutrofílico.
- Pauci-granulocítico.

Tal como se puede apreciar en el diagrama de Venn de la Ilustración 2 los distintos fenotipos comparten características comunes que hacen que la diferenciación entre unos y otros en la práctica diaria no sea tan sencilla.

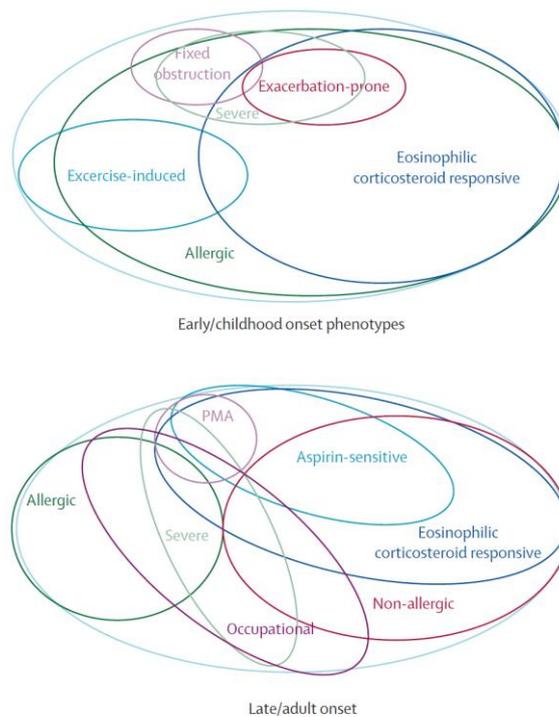


Ilustración 2. Diagrama de Venn tomado de Wenzel (40).

Recientemente Wenzel (41) en su revisión de 2012 concreta más y propone 5 fenotipos importantes divididos en dos grandes grupos, basándose en los estudios de Haldar y cols. (42), Moore y cols. (43) y Siroux y cols. (44):

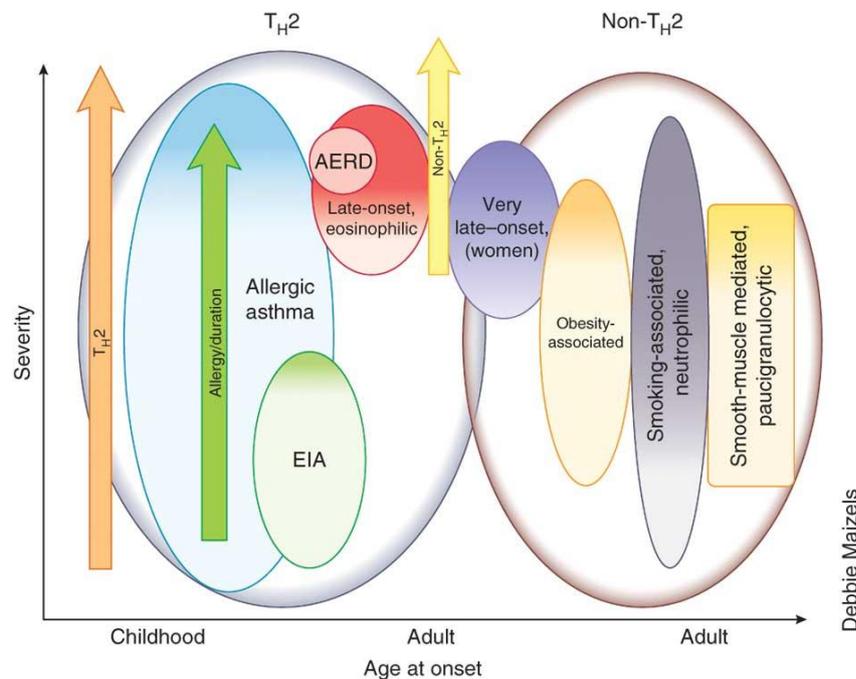


Ilustración 3. Esquema tomado de Wenzel (41) en el que aparecen los distintos fenotipos propuestos en su revisión. El tamaño relativo de la elipse de cada fenotipo refleja el porcentaje de pacientes a los que afecta. Los colores de cada uno hacen referencia a la gravedad del asma.

1) Asma $Th2$: corresponde a la mayoría de las asmas. Producida por una respuesta inmunitaria $Th2$, por lo que está fuertemente asociada con la atopia, alergia, reacciones de hipersensibilidad tipo I, inflamación eosinofílica y la respuesta a corticoides.

1a) Asma de inicio precoz (*early-onset allergic asthma*): se inicia normalmente en la infancia. Está asociada a otras enfermedades alérgicas (como rinitis alérgica y dermatitis atópica). Los pacientes presentan sensibilizaciones a aeroalérgenos que se correlacionan con la clínica. La intensidad puede ser de leve a grave. Suele haber antecedentes familiares de asma.

1b) Asma eosinofílica persistente de inicio tardío (*late-onset persistent eosinophilic asthma*): El inicio suele ser en edad adulta. Presentan una eosinofilia en esputo refractaria al tratamiento con corticoides. Frecuentemente está asociada a sinusitis, pólipos nasales o enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (*aspirin-exacerbated respiratory disease* o AERD). No suelen correlacionarse con una respuesta alérgica a pesar de presentar sensibilizaciones a aeroalérgenos. No suele haber antecedentes familiares de asma. Suelen ser asma graves.

1c) Asma inducida por ejercicio físico (*Exercise-induced asthma* o *EIA*): se refiere al asma cuyos síntomas son experimentados después del ejercicio. No está claro el mecanismo inmunológico e inflamatorio por el que se produce. Suelen presentar un asma de intensidad leve y experimentan una broncoconstricción reactiva al ejercicio continuo, sobretodo en condiciones ambientales secas y frías.

2) Asma no-Th2: no está claro el mecanismo inmunológico por el que se produce. La respuesta al tratamiento con corticoides suele ser pobre.

2a) Asma relacionada con la obesidad (*obesity-related asthma*): suele ser más frecuente en mujeres de mediana edad. Presentan un asma muy sintomática. La pérdida de peso puede producir un importante descenso de síntomas, así como de la hiperreactividad bronquial.

2b) Asma neutrofílica (*neutrophilic asthma*): presentan neutrofilia en el esputo y un asma grave (con un descenso en el FEV1 y atrapamiento aéreo importantes). La relación de este fenotipo con el tabaquismo no está clara. Se cree que pueden responder bien al tratamiento con antibióticos macrólidos. En los pacientes en los que coexiste neutrofilia y eosinofilia en esputo la gravedad del asma suele ser mucho mayor.

2c) Otros posibles fenotipos: se han identificado otros posibles fenotipos no-Th2 que podrían ser definidos en un futuro:

-Asma de inicio muy tardío (*very late-onset asthma*): afecta fundamentalmente a mujeres.

-Asma asociada con el tabaquismo (*smoking-associated asthma*).

-Asma pauci-granulocítica (*smooth-muscle mediated, pauciglanulocytic asthma*): la presencia de inflamación es escasa y se produce por una importante contracción del músculo liso.

1.1.2.5. Endotipos

Recientemente se han descrito varios endotipos de asma. El término de “endotipo” (contracción de “endofenotipo”) hace referencia a un subtipo de una enfermedad que se define funcionalmente y patológicamente por un mismo mecanismo molecular.

El asma, como otras enfermedades crónicas, es una enfermedad heterogénea y genéticamente compleja, lo que contribuye a su variabilidad y manifestaciones diversas. En el asma pueden diferenciarse varios endotipos (45, 46) específicos con distintos rasgos clínicos, bajo los que subyacen causas moleculares diversas y distintas respuestas al tratamiento.

Se han postulado un total de 6 endotipos (46), cuyas características principales pueden apreciarse en la Ilustración 4:

-Asma sensible a aspirina (*Aspirin-sensitive asthma*).

-Miosis broncopulmonar alérgica (ABPM / *Allergic bronchopulmonary miosis*).

-Asma alérgica (*Allergic asthma*).

-Sibilantes en preescolares (*Asthma-Predictive Indices-positive preschool wheezer*).

-Asma grave hipereosinofílica de comienzo tardío (*Severe late-onset hypereosinophilic*).

-Asma en esquiadores de fondo/deportistas de élite (*Asthma in cross-country skiers*).

Endotype of the asthma syndrome	Disease characteristics							Proposed mechanism
	Clinical characteristics	Biomarkers	Lung physiology	Genetics	Histopathology	Epidemiology	Treatment response	
Proposed endotype	History, physical examination, comorbidities	Eosinophilia, FeNO, SPT, IgE	BHR, FEV ₁ , reversibility	SNPs and pathways	Tissue/lung characteristics	Prevalence, risk factors, and natural history	Response or lack of response to a specific treatment	Specific biological pathway or process
Aspirin-sensitive asthma	Polyposis, often more severe asthma	Often eosinophilic, increased urinary LTs	Response to aspirin challenge	LT-related gene polymorphisms	Often eosinophilic	Adult onset, severe disease poor prognosis, prevalence 2% to 5%	Responds to anti-LT, especially 5-LO inhibitors	Likely eicosanoids-related
ABPM	Severe, mucus production, adult/long disease duration	Blood eosinophilia, markedly elevated IgE and specific IgE	Less reversible/fixed airflow obstruction	HLA and rare CF variants	Bronchiectasis/eosinophils and PMNs, bronchocentric granulomatosis	Long duration/adult onset/poor prognosis	Glucocorticoids, antifungals, possibly omalizumab	Colonization of airways
Allergic asthma (adults)	Allergen associated symptoms/allergic rhinitis	Positive SPT, elevated IgE/elevated FeNO	Specific allergic bronchospasm	T _H 2 pathway SNPs	Eosinophils, SBM thickening	Childhood onset, history of eczema	Responds to glucocorticoids and omalizumab, possible IL-4/13 pathway inhibition	T _H 2-dominant
API-positive preschool wheezer	>3 episodes per year, 1 major or 2 minor characteristics	Often >4% eosinophils in blood (minor), aeroallergen-specific IgE	Potential increased risk of loss of lung function	Unknown	Unknown	Mother or father with asthma	Responds well to daily inhaled glucocorticoids	T _H 2-dominant
Severe late-onset hypereosinophilic	Severe exacerbations, late-onset disease	Peripheral blood eosinophilia	Bronchodilator-resistant, episodic fall in lung function, steroid-sensitive	No evidence	High blood eosinophil count and eosinophils in tissue	Approximately 20% of severe asthma populations	Glucocorticoid-sensitive, often oral steroid-dependent, responds to anti-IL-5	Nonatopic, otherwise unknown
Asthma in cross-country skiers	Mild to moderate severity, symptoms mostly related to exercise, URTI commonly reported	FeNO normal, normal blood eosinophil count, increased LTE ₄ in urine	Methacholine and or exercise positive, usually negative to mannitol or AMP challenge	Unknown	SBM thickening with low-grade noneosinophilic inflammation, increased neutrophils in sputum related to training intensity or duration, BALT in airway mucosa	15% to 25% of elite skiers, highest prevalence among those training in a cold, dry environment	Responds poorly to inhaled glucocorticoid treatment, improves when training intensity diminishes	Cold, dry air induces chronic stress to the airways, subclinical viral infections?

BALT, Bronchus-associated lymphoid tissue; BHR, bronchial hyperresponsiveness; CF, cystic fibrosis; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; LT, leukotriene; LTE₄, leukotriene E₄; 5-LO, 5-lipoxygenase; SBM, subepithelial basement membrane; SNP, single nucleotide polymorphism; SPT, skin prick test; URTI, upper respiratory tract infection.

Ilustración 4. Tabla tomada de Lötvall y cols. (46) en la que aparecen las características de los 6 endotipos descritos.

1.1.3. Diagnóstico

1.1.3.1. Diagnóstico clínico

El asma cursa con una inflamación de las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial y conlleva asociada una obstrucción al flujo aéreo, reversible de forma espontánea o con tratamiento. Los pacientes asmáticos presentan episodios recurrentes de:

- Sibilancias, dificultad respiratoria de predominio espiratorio, sensación de opresión torácica...

- Tos, que puede acompañarse de sibilancias o ser la única manifestación en algunos casos.

- Empeoramiento de los síntomas por la noche o al amanecer.
- Síntomas desencadenados por infecciones virales, exposición alérgica, ejercicio o contaminación.
- Mejoría sintomática con el uso de inhaladores agonistas β_2 .

El asma es, ante todo, un cuadro clínico cuya expresión puede variar de unos pacientes a otros y en el tiempo en cada paciente, dependiendo del estado individual de la persona y de su ambiente.

En cada paciente se debe recoger la gravedad y frecuencia de las crisis, la necesidad de medicación intercrisis, los despertares nocturnos y la afectación de la vida diaria. Se debe interrogar específicamente acerca del predominio horario o estacional de los síntomas así como acerca de la influencia de factores desencadenantes.

La anamnesis no estaría completa sin una indagación de los antecedentes asmáticos y alérgicos familiares y personales. La presencia de familiares de primer grado asmáticos incrementa el riesgo de esta enfermedad, así como la existencia de atopia nos hará sospechar que el asma pueda tener una etiología alérgica.

Finalmente, en la exploración física valoraremos si existen signos de gravedad, signos asociados como eczema, valoración de la mucosa nasal, hipertrofia de cornetes...

1.1.3.2. Espirometría forzada

El estrechamiento de la vía respiratoria puede ser detectado como una alteración obstructiva de la ventilación durante la maniobra espiratoria. Este defecto obstructivo de la ventilación se define por una reducción en el FEV1 (volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada) proporcionalmente mayor a la disminución de la FVC (capacidad vital forzada).

El FEV1 es muy reproducible y tiene un buen coeficiente de variabilidad intrasujeto (3-5%) en individuos normales (47).

En cualquier caso, una espirometría normal es habitual en muchos pacientes asmáticos. Este hecho es especialmente frecuente en los niños, incluso en aquellos afectados de asma moderada (48).

La FVC, el FEV1 y el cociente FEV1/FVC son los parámetros básicos usados en la interpretación espirométrica, minimizando la aparición de falsos positivos o negativos. La interpretación básica limitada a estos tres parámetros evita el problema de la interpretación en base a multitud de mediciones.

La FVC es el volumen de aire expulsado durante la espiración forzada e indica capacidad pulmonar.

El FEV1 es la porción de FVC expulsada en el primer segundo de la maniobra y representa el flujo.

El cociente FEV1/FVC es la medida más importante para determinar la presencia de una alteración ventilatoria obstructiva. Es el porcentaje de la capacidad vital forzada que se espira en el primer segundo y está disminuido en los procesos obstructivos. Es por lo tanto el volumen de aire expulsado en el primer segundo respecto del máximo volumen que puede ser expulsado en una espiración forzada. De forma clásica se ha considerado el punto de corte de este cociente en 70% (por debajo del cual se consideraría que existe obstrucción), pero, en menores de 20 años, el corte establecido puede considerarse 75-80% (1).

Se puede clasificar el grado de obstrucción en leve, moderado o grave según el valor porcentual del FEV1 (leve: 65-80%, moderado: 50-64%, grave: 35-49 y muy grave: menor del 35%) (49).

En las obstrucciones leves o moderadas los valores de FVC y VC (volumen corriente) son similares. Sin embargo, en los casos de obstrucción grave, la FVC es muy inferior al VC por el atrapamiento aéreo y la compresión dinámica de la vía respiratoria, de forma que el cociente FEV1/FVC es inferior al FEV1/VC, subestimando el valor real de la obstrucción. En estos casos algunos

autores proponen sustituir el FEV1/FVC por el cociente FEV1/FEV6, que muestra una sensibilidad del 95% y una especificidad del 97% (50, 51).

Además, la característica fundamental que realmente define la enfermedad es la variabilidad de la función, que podremos documentar en muchos casos mediante el análisis de la respuesta a los broncodilatadores. Los parámetros que se deben emplear son la FVC o el FEV1. Un incremento en valores absolutos igual o superior a 200 ml, asociado a un incremento de al menos el 12% de los valores porcentuales respecto a los teóricos, se considera una respuesta broncodilatadora positiva en los adultos (52). Recientemente, se ha propuesto establecer el punto de corte de la respuesta broncodilatadora positiva, en el caso de los niños, en un incremento del 9% del valor porcentual del FEV1 (53). En muchas ocasiones solo se podrá documentar la reversibilidad después de un tratamiento intensivo con corticoides inhalados o incluso con corticoides orales. Por último, hay que recordar que muchos pacientes con asma grave o muchos años de evolución presentan frecuentemente una obstrucción bronquial no reversible.

El PEF es el flujo espiratorio máximo que se consigue con un esfuerzo máximo después de una inspiración forzada máxima y constituye la medida más extendida para determinar la obstrucción al flujo aéreo. Es un índice tanto del calibre de las vías respiratorias centrales como de la fuerza ejercida por los músculos espiratorios.

Otros parámetros que se obtienen de la curva espirométrica son el flujo espiratorio forzado entre el 25% y el 75% de la FVC (FEF25-75), que valora con una alta sensibilidad la obstrucción de las vías aéreas más finas, y los flujos espiratorios forzados al 50% y al 25% de la FVC (MEF50, MEF25).

El patrón obstructivo en la curva flujo-volumen presenta una morfología con una convexidad hacia el eje del volumen.

Para valorar la espirometría es básico que esté bien realizada, precisándose unas condiciones mínimas de realización de la prueba (54, 55).

1.1.3.3. Pruebas de provocación bronquial

Una característica del asma es el incremento de la reactividad de la vía aérea a los estímulos físicos, químicos o farmacológicos. Existe una relación estrecha entre la hiperrespuesta o hiperreactividad bronquial (HRB) y la gravedad del cuadro (56). La reagudización del asma tras exposición antigénica o un cuadro viral se asocia con un incremento de la HRB (57), que mejora con el tratamiento corticoideo inhalado (58).

La hiperrespuesta bronquial es la capacidad de las vías respiratorias para responder rápida e intensamente a múltiples estímulos no inmunológicos. Tiene un aspecto clínico, que refleja la obstrucción bronquial ante una gran diversidad de estímulos no alérgicos de poca intensidad, como son los medicamentos broncoconstrictores, las sustancias químicas irritantes, la osmolaridad o el aire frío (hiperreactividad bronquial no específica). Viene motivada por una disminución de la permeabilidad bronquial a la corriente de aire en respuesta a estos estímulos (59-61). Frente a esta HRB inespecífica se describe la HRB específica o alérgica, desencadenada por la exposición a un alérgeno inhalado por un sujeto sensibilizado al mismo.

La respuesta al broncoconstrictor se ha expresado mediante la PC_{20} (concentración necesaria para inducir un deterioro del FEV1 del 20%). Los estímulos se pueden clasificar en dos categorías:

- Estímulos directos, que inducen obstrucción actuando directamente sobre receptores localizados en el músculo liso bronquial (histamina, metacolina y carbacol). Son los más utilizados en clínica (62-64).

- Estímulos indirectos, que inducen la liberación de mediadores por determinadas células inflamatorias (histamina, leucotrienos, prostaglandinas) que son los que inducen la broncoconstricción (alérgenos, suero salino hipertónico, hiperventilación isocápnic, ejercicio físico, adenosina 5'-monofosfato o manitol) (65, 66).

La broncoconstricción que se produce tras el estímulo directo o indirecto presente en la HRB puede ser debida a un umbral de excitabilidad particularmente bajo, a un acortamiento excesivo de la fibra muscular, a un aumento de la contractibilidad o a una hipertrofia o hiperplasia del músculo liso (67).

El incremento de la hiperrespuesta bronquial se mide en la práctica clínica habitual mediante el test de ejercicio o por la respuesta a la histamina o a la metacolina (68). El método más común de presentar los resultados se basa en la interpolación de la dosis o concentración del agente usado capaz de provocar un descenso del FEV1 o del PEF del 20% (69).

a) Métodos directos

Los dos métodos empleados por la mayoría de los investigadores son:

-Inhalación de cantidades conocidas del agonista a través de un dosímetro activado por la inspiración (70).

-Inhalación de concentraciones conocidas del agonista durante un tiempo predeterminado en el transcurso de una ventilación corriente (71-73).

b) Métodos indirectos

Hace más de 30 años Jones describió los efectos del ejercicio sobre las resistencias de las vías respiratorias en niños con asma (74). La broncoconstricción inducida por el ejercicio se refiere generalmente al asma inducida por el ejercicio (EIA). Dado que actualmente no se acepta que el ejercicio sea un inductor de asma, sino un factor incitador, la denominación más adecuada sería broncoconstricción inducida por ejercicio (BIE).

A principios de los años 70, se identificaron los factores que determinaban la amplitud y la severidad de la respuesta de las vías respiratorias al ejercicio, como son el tipo de ejercicio, su intensidad y la duración, así como el intervalo entre la última crisis/reagudización del asma y el ejercicio. A la vez se pudo comprobar que lo más importante era el nivel de ventilación alcanzado y mantenido durante el ejercicio. También se investigó el efecto de la temperatura

y del vapor de agua en el aire inspirado, comprobándose que la BIE podía inhibirse por completo cuando se respira el gas a saturación de vapor de agua y a temperatura corporal. Se concluía afirmando que el estímulo para producir BIE era la temperatura, la carga de agua o ambos factores en el aire respirado durante el ejercicio (75, 76).

Posteriormente, se ha demostrado que la pérdida de agua era superior a la pérdida de temperatura de las vías respiratorias como estímulo de BIE. La evaporación del vapor de agua produciría una hiperosmolaridad transitoria de la superficie líquida de las vías respiratorias y esta hiperosmolaridad contribuiría a la liberación de los mediadores inflamatorios del mastocito (77, 78). Estos mediadores producen la contracción del músculo liso pero, sobre todo, producen enlentecimiento de la circulación capilar y edema, mecanismos que explican en mayor medida la disminución del calibre de las vías respiratorias (79, 80). Ambas hipótesis son lógicas para explicar la BIE, pero no se dispone de argumentos científicos suficientes para apoyar una u otra (81).

En el laboratorio de función pulmonar el ejercicio puede realizarse mediante bicicleta ergométrica o mediante cinta rodante. La estandarización de dichos protocolos ha sido recogida por la *European Respiratory Society* en las normas publicadas en 1993 por Sterk y cols. (69) y revisadas por Freed en 1995 (82).

El uso de manitol inhalado está adquiriendo cada día más relevancia en nuestro medio como estímulo indirecto de la hiperrespuesta bronquial desde que fue aprobado para su uso en Europa en 2007. Es un azúcar del grupo de los polialcoholes que actúa como fármaco osmótico, captando agua de las vías respiratorias cuando se administra inhalado y reproduce, por lo tanto, una situación de exposición a un ambiente seco. Comenzó a aplicarse en el estudio del asma en 1994, pero hasta 1997 Anderson y cols. no publicaron su protocolo (66). La respuesta a la inhalación de manitol se correlaciona muy bien con la respuesta a la inhalación de metacolina (66, 83), histamina (84), aire frío (84) o adenosina 5'-monofosfato (85). En el caso de la BIE, el manitol está ganando mayor importancia, dado que ha demostrado ser más seguro que el test de ejercicio físico y el test de hiperventilación hipercápnica, por la curva dosis-

respuesta y porque el descenso de FEV1 ocurre antes en el caso del manitol comparado con ellos (86).

1.1.3.4. Óxido nítrico en aire espirado

La aplicación de métodos no invasivos como el estudio de marcadores en aire exhalado ha aumentado el conocimiento de los mecanismos del estrés oxidativo y del papel de los antioxidantes en el asma.

Los estímulos alérgicos inducen la generación de citocinas (IL-5) y la activación eosinofílica y otros como las endotoxinas, las infecciones y los productos de la contaminación ambiental inducen citocinas (IL-8) y activación neutrofílica.

A partir de cualquiera de estas vías se generan productos reactivos del oxígeno, de manera que las células inflamatorias liberan elevadas concentraciones de superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (-OH), ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HBrO) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez pueden generar una gran cantidad de radicales libres en la vía aérea (87).

Existe también un exceso de productos reactivos de nitrógeno (RNS) que conducen a la formación de óxido nítrico (NO). Este NO reacciona con oxígeno (O_2) para formar peroxinitrito ($OONO^-$), que genera los efectos nocivos de la peroxidación lipídica (87):

- Daño de las células epiteliales.
- Contracción del músculo liso.
- Aumento de la reactividad bronquial.
- Aumento de la producción de moco.
- Activación de las células epiteliales.
- Incremento de la permeabilidad vascular.

Entre los marcadores estudiados, la detección en el aire exhalado de óxido nítrico (FeNO) ha sido la más estudiada y con la que se ha establecido una estandarización en su determinación (88).

El método en tiempo real (*on-line*), en el que por quimioluminiscencia se van determinando, tras la reacción con el ozono, los valores del óxido nítrico en aire espirado a medida que el paciente respira, es el que ha alcanzado mayor difusión. Se recomienda realizar las mediciones con un flujo de 50 ml/seg. Se aconseja que cuando estén previstas otras exploraciones funcionales respiratorias, la medición de óxido nítrico se determine previamente, porque de lo contrario disminuyen sus niveles.

Para evitar la contaminación con el aire procedente de la orofaringe, que presenta unos valores más elevados de NO, el paciente debe exhalar el aire contra una resistencia que favorezca el cierre del velo del paladar. Se emplean habitualmente incentivos visuales para ayudar a mantener el flujo en un nivel constante.

Existe una gran reproducibilidad en las determinaciones, con diferencias que suelen ser menores al 10%.

Las concentraciones de óxido nítrico no presentan variaciones diurnas y parecen independientes de la edad y el sexo. La edad influye aparentemente solo en los menores de 12 años.

Los niveles de FeNO parecen estar relacionados con la inflamación eosinofílica y podrían ser útiles para monitorizar la respuesta y el cumplimiento del tratamiento en los pacientes con asma (89).

La concentración de óxido nítrico exhalado depende de varios factores:

- Capacidad celular de generación.
- Grado de difusión desde la pared a la luz bronquial.
- Flujo de aire bronquial.
- Ventilación alveolar.

La concentración de FeNO con un flujo de 50 ml/s en individuos sanos es menor de 50 ppb, en los niños este parámetro se ha establecido en 25 ppb. No obstante, en todas estas determinaciones hay que tener en cuenta todos esos factores que pueden modificar las concentraciones de FeNO: hábito tabáquico, ejercicio físico, ciclo menstrual, alcohol, cafeína, polución ambiental, infecciones respiratorias y diversos fármacos.

La consideración del óxido nítrico como marcador inflamatorio del asma se debe a que sus concentraciones se modifican en relación a estímulos proinflamatorios y al efecto de los fármacos antiinflamatorios.

Diversos estudios demuestran que, en los pacientes con asma alérgica, la exposición a los alérgenos se asocia con un aumento de la concentración de FeNO (90, 91). No obstante, de estos estudios se extrae que más que un índice de la existencia de asma, el aumento de la concentración de FeNO es la consecuencia de la presencia de alergia o de atopia.

Otro aspecto es su utilidad, como hemos comentado previamente, para identificar la respuesta favorable al tratamiento con esteroides inhalados en los individuos asmáticos y como posible marcador del cumplimiento en los respondedores.

Otros marcadores de aire exhalado como el monóxido de carbono, el peróxido de hidrógeno o los hidrocarburos liberados en la peroxidación lipídica carecen de estudios suficientes y están lejos de emplearse en clínica.

1.1.3.5. Otros métodos de diagnóstico de la inflamación

El uso del fibrobroncoscopio, el lavado broncoalveolar y la biopsia han supuesto una revolución en la comprensión del asma. Estudios de biopsia en sujetos con asma leve (92), moderada y ante exposición alérgica o viral (93, 94) han contribuido a un mejor conocimiento del papel de la inflamación en el asma. En todos los grados de asma existen cambios inflamatorios en las vías respiratorias; por ello la supresión de la inflamación es el objetivo principal de todos los tratamientos modernos de asma. Por lo tanto, los métodos capaces de

valorar el estado inflamatorio de los pacientes serán muy útiles para el diagnóstico y tratamiento del asma.

Desde el punto de vista anatomopatológico (95), los principales hallazgos son la presencia de tapones de moco y el aumento de los eosinófilos en la vía aérea. Además existe una lesión epitelial intensa con descamación e hipertrofia de células caliciformes, edema y aparición de miofibroblastos en la mucosa y un engrosamiento de la capa de músculo liso. En estadios más avanzados existen signos de cicatrización con un engrosamiento de la membrana basal y signos de fibrosis.

También existe un infiltrado celular, fundamentalmente de eosinófilos y linfocitos T, la mayoría de los cuales muestran signos de activación, evidenciada por la expresión de los marcadores de superficie (96).

En estudios en los que se ha buscado contrastar la intensidad de la respuesta celular con otros marcadores de gravedad, como el grado de eosinofilia y de linfocitos T o la respuesta broncoconstrictora a la histamina, se ha objetivado que todos estos marcadores se relacionan estrechamente con la gravedad de la enfermedad (97, 98). Las biopsias de los sujetos con asma extrínseca tienen características histológicas similares a aquellos que presentan asma intrínseca (99), asma ocupacional secundaria a elementos químicos de masa molecular baja (100, 101) y asma inducida por irritantes (102). Todo ello sugiere que la inflamación representa en el asma una respuesta final común a un número amplio de agentes inductores.

Se ha observado un incremento de los eosinófilos en sangre periférica y en esputo (reflejado en un aumento de los mediadores activos de eosinófilos) y de los linfocitos T en sangre periférica en los cuadros de reagudización asmática (103, 104).

Las características clínicas del asma son, en gran parte, efectos secundarios de la inflamación persistente de las vías respiratorias que involucra a muchas células. Algunas, como los mastocitos, están presentes en la fase aguda y subaguda del asma, mientras que otras, como los eosinófilos y los macrófagos actúan en la fase crónica. Se puede hablar entonces de una

inflamación mastocitaria y otra eosinofílica (105). Los mediadores de la inflamación subaguda provocan broncoconstricción, edema e hipersecreción mucosa, mientras que los mediadores de la inflamación crónica producen cambios en las vía respiratorias que inducen, en último término, una obstrucción irreversible y una remodelación de las mismas.

Los productos biológicos de las células inflamatorias se pueden medir utilizándose como marcadores y monitores del proceso inflamatorio. Entre ellos destacan los reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1. Marcadores biológicos de las células implicadas en la inflamación del asma.

Célula	Marcador biológico	Efecto funcional
Eosinófilo	MBP, ECP, EPO, EPX/EDN	Proteínas citotóxicas
Mastocito	Triptasa, Histamina	
Neutrófilo	MPO	
Linfocitos T	IL-3; IL-5	Mediadores de la inflamación crónica
Linfocitos	IL-8; GM-CSF	
Monocitos/Macrófagos	IL-8	
Todas las células inflamatorias	Histamina Leucotrienos (LTC ₄ , PAF) Prostaglandina (PGD ₂)	Mediadores de la inflamación subaguda.

(ECP) proteína catiónica eosinofílica. (MBP) proteína básica principal. (EPO) peroxidasa eosinofílica. (EPX/EDN) proteína eosinofílica X/neurotoxina derivada del eosinófilo. (MPO) Mieloperoxidasa. (IL) Interleuquina. (GM-CSF) Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. (LTC₄) Leucotrieno C₄. (PAF) Factor activador plaquetario. (PGD₂) Prostaglandina D₂.

La accesibilidad de la sangre periférica ha permitido desarrollar estudios diversos sobre la inflamación en el asma, fundamentalmente con eosinófilos. Los granulocitos eosinófilos tienen un papel indiscutible en la inflamación por su

capacidad de producir leucotrienos y segregar proteínas tóxicas que se depositan en la mucosa bronquial. La gravedad del asma se correlaciona mejor con la subpoblación de eosinófilos hipodensos (eosinófilos de baja densidad que tienen aumentada su actividad citotóxica) que con la eosinofilia en sangre total (106, 107).

Aunque todas las proteínas del gránulo del eosinófilo tienen potencial utilidad como marcadores de la inflamación mediada por eosinófilos en el asma, existen pocos datos que sugieran que alguna de estas proteínas tenga propiedades específicas que puedan hacer a una de ellas más apropiada que otras para el diagnóstico o la monitorización del asma.

Algunos de los metabolitos del ácido araquidónico son eliminados por la orina. Este compuesto puede metabolizarse por dos vías: una, la vía de la ciclooxigenasa (COX), que induce la producción de prostaglandinas y tromboxanos, y otra, la vía de la 5-lipoxigenasa (5-LO), que genera leucotrienos (LTA₄→LTB₄→LTC₄→LTD₄→LTE₄).

Una proporción de leucotrienos cisteinílicos es excretada en orina bajo la forma de LTE₄ y hay autores que han destacado el interés de su determinación en orina (108). Sin embargo, la medida del LTE₄ en orina refleja el aspecto global de la producción de leucotrienos y no necesariamente la producción a nivel pulmonar. Además, existen otros factores que pueden variar sus niveles (109).

Los leucotrienos cisteinílicos producen diferentes efectos fisiopatológicos en relación con el asma (110, 111):

- Producen broncoconstricción.
- Disminuyen la movilidad ciliar dificultando el barrido del moco.
- Aumentan la secreción mucosa.
- Prolongan la vida de los eosinófilos.
- Aumentan la permeabilidad vascular y la infiltración de células inflamatorias en el pulmón, amplificando la producción de una gran variedad de mediadores (112).
- Alteran el intercambio gaseoso.

1.1.4. Calidad de vida en el asma

En el asma, como en el resto de las enfermedades alérgicas, la calidad de vida está apreciablemente alterada. Los pacientes que la sufren ven limitadas su actividad laboral, las actividades de ocio y el descanso nocturno. Incluso en los países occidentales desarrollados de nuestro entorno, los pacientes diagnosticados y tratados de asma con arreglo a directrices internacionales, experimentan limitaciones en las actividades cotidianas. Son datos obtenidos en amplias encuestas epidemiológicas realizadas en Europa (113) y posteriormente en zonas de EEUU y Asia-Pacífico (114). Una de cada 5 personas ven limitadas sus expectativas laborales por la enfermedad y más de la tercera parte tiene dificultades para realizar actividad física, deporte o un descanso nocturno normal. Otros estudios ofrecen datos más decepcionantes, concretamente en EEUU, donde el 90% de los asmáticos admite tener limitaciones en su vida a causa del asma (115). En los niños, la situación no parece mucho mejor. Datos de encuesta telefónica revelan que más de la tercera parte tiene síntomas diurnos, y el 28% presenta síntomas nocturnos. Casi el 30% limita sus actividades deportivas y el 43% falta a clase algún día por este motivo. Se trata, también, de niños diagnosticados y tratados de asma en Europa (116).

La evaluación de la calidad de vida en el asma ofrece información complementaria a otros parámetros, clínicos, funcionales o fisiopatológicos. Los parámetros clínicos tradicionalmente empleados para evaluar el estado del asma y su control ofrecen una correlación moderada o débil con los datos obtenidos de los cuestionarios de calidad de vida. Esta relación es más consistente con los dominios o aspectos relacionados con la esfera sintomática (disnea, limitación de ejercicio físico, etc.) que con los que contemplan situaciones anímicas o relaciones del individuo con el entorno. En un estudio ya clásico, Juniper y cols. (117) compararon parámetros típicamente empleados para valorar el estado del asma, como los valores de FEM matutino o vespertino, recuentos de síntomas, consumo de beta-adrenérgicos a demanda o la propia medida del FEV1, con los datos obtenidos del cuestionario de calidad de vida AQLQ-Juniper (*Asthma Quality of Life Questionnaire de Juniper*) (118). Los autores observaron que el dominio de síntomas ofrece un coeficiente de correlación mejor (en torno a 0,5) que el dominio de actividades o de relación ambiental. Otro estudio realizado por

Colás y cols. (119) comparó los datos obtenidos de la aplicación del AQLQ-Marks (*Asthma Quality of Life Questionnaire de Marks*) (120), validado en nuestro idioma (121), con los valores de espirometría, consumo de medicación y concentraciones de proteína catiónica del eosinófilo (ECP) sérica en 35 pacientes con asma de diversa gravedad. Algunos valores espirométricos, como el MMEF y el consumo de medicación, ofrecieron una correlación moderada, con un coeficiente de correlación en torno a 0,4, con las dimensiones del cuestionario de calidad de vida relativas a la disnea y restricción social. El resto no ofrecía correlaciones significativas. Tampoco existe correlación entre respuesta a metacolina y puntuaciones de AQLQ-Juniper (122, 123).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, que se repiten en otros muchos estudios (124-126), parece claro que la información que nos proporcionan los cuestionarios de calidad de vida es diferente de la que nos proporcionan los recuentos de síntomas y los valores espirométricos. Datos publicados por Boulet y cols. (127) aún van más lejos, y observan como las puntuaciones obtenidas en los cuestionarios de calidad de vida de los pacientes no se correlacionan con los parámetros de función pulmonar ni con el grado de eosinofilia en el esputo. Los autores solo obtienen una correlación moderada entre las puntuaciones de estos cuestionarios y las correspondientes a la valoración de los síntomas. Además, los parámetros funcionales respiratorios no solo no se correlacionan con los de calidad de vida en observaciones puntuales, sino que tampoco lo hace su evolución en el tiempo. Así, hay experiencia demostrativa de que la reducción progresiva en FEV1, que se observó en un grupo de asmáticos, no se siguió de una reducción en las puntuaciones de cuestionarios específicos de calidad de vida (128). En consecuencia, se podría pensar que los cuestionarios de calidad de vida recogen otros aspectos de la enfermedad asmática que pasan desapercibidos con los métodos clínicos tradicionales de evaluación y que ambos no son excluyentes sino complementarios, contribuyendo a tener una visión más global del paciente. Lo que experimentan los asmáticos en el sufrimiento de su enfermedad no se puede suplantar con valores espirométricos, ni con el grado de eosinofilia en esputo, ni los recuentos de síntomas o de consumo de medicación.

Por otro lado, la información obtenida de los cuestionarios de calidad de vida no es ajena a la evolución clínica del asma: los pacientes con enfermedad más grave presentan mayor deterioro en las puntuaciones (120, 129-131), mientras que los casos leves y los asintomáticos se asemejan a la población general (132). Además, reflejan con gran precisión los cambios que se producen en la intensidad del asma a lo largo del tiempo.

Tabla 2. Relación de los cuestionarios de calidad de vida específicos de asma más utilizados.

Población	Cuestionario	Validado en Español
Adulta	AQLQ-Juniper (<i>Asthma Quality of Life Questionnaire de Juniper</i>) (118)	Sí (133, 134)
	Mini-AQLQ (<i>Mini Asthma Quality of Life Questionnaire</i>) (130)	
	AQLQ-Marks (<i>Asthma Quality of Life Questionnaire de Marks</i>) (120)	Sí (121)
	SGRQ (<i>St. George's Respiratory Questionnaire</i>) (135)	Sí (136)
	QOL-RIQ (<i>Quality-Of-Life for Respiratory Illness Questionnaire</i>) (137)	
	LWAQ (<i>Living with Asthma Questionnaire</i>) (138)	
	AIR Index (<i>Asthma Impact Record</i>) (139)	
Niños y adolescentes	PAQLQ (<i>Paediatric Asthma Quality of Life Questionnaire</i>) (140)	Sí (141)
	PACQLQ (<i>Paediatric Asthma Caregivers Quality of Life Questionnaire</i>) (142)	
	DCA (<i>Diary for Caregivers of Asthmatic Children</i>) (143)	Sí (144)
	CAQ (<i>Childhood Asthma Questionnaire</i>) (145)	
	AAQOL (<i>Adolescent Asthma Quality of Life Questionnaire</i>) (146)	

La investigación sobre calidad de vida en asma se ha visto impulsada de forma extraordinaria durante las pasadas décadas, con el desarrollo de cuestionarios específicos, perfectamente consolidados en la actualidad. En la

Tabla 2 se presenta una relación de los más conocidos (SGRQ (135), LWAQ (138), AQLQ de Juniper (118), Mini-AQLQ (130), AQLQ de Marks (120), AIR Index (139), QOL-RIQ (137), CAQ (145), AAQOL (146), PAQLQ (140), PACQLQ (142), DCA (143)).

De ellos, solo están validados en castellano SGRQ (136), AQLQ de Juniper (133, 134) y AQLQ de Marks (121), en lo que respecta a adultos, y PAQLQ de Juniper (141) y DCA (144) para niños y adolescentes. También se han utilizado múltiples cuestionarios genéricos para medir calidad de vida en el asma, como SIP (147), SF 36 (148), SF 12 (149), EuroQol (150) o NHP (151), casi todos ellos validados en España, como se puede ver en las referencias.

Sin duda, el cuestionario de mayor difusión y aceptación para evaluar la calidad de vida en el asma es el diseñado por Juniper y cols. y llamado AQLQ-M (McMaster), o simplemente AQLQ de Juniper (118). Posee un equilibrado reparto del peso de los distintos dominios tanto del área física como psicológica, lo que le otorga una moderada correlación con otros parámetros, clínicos y funcionales respiratorios para la evaluación del asma. Consta de 32 ítems que hacen referencia a las últimas 2 semanas y que estudian 4 dimensiones de la salud: síntomas (12 ítems), limitación de actividades habituales (11 ítems), función emocional (5 ítems) y estímulos ambientales (4 ítems). El cuestionario proporciona una puntuación global, que es la media para todos los ítems, y una puntuación para cada dimensión, que es la media de los ítems correspondientes. Tiene la peculiaridad de que una puntuación más reducida implica mayor deterioro en la calidad de vida (las opciones de respuesta para cada ítem se sitúan en una escala equidistante de 7 puntos, donde 1 corresponde a la máxima limitación y 7 a la ausencia de limitación), al revés de lo que sucede con otros cuestionarios específicos para el asma. Por otro lado, ha sido sólidamente validado y probado en castellano (133, 134). Otro atractivo más es que tiene establecida la frontera entre las modificaciones clínicamente significativas, en contra de las puramente estadísticas, tal como se explica más adelante. Su principal inconveniente radica en la necesidad de satisfacer derechos de autor para su utilización, lo que contribuye a encarecer los trabajos en los que se use. También en su contra está el tiempo de cumplimentación, que es de una media de 13 minutos [por ejemplo, el AQLQ de Marks (120) tiene una media de 8

minutos]. Para paliar este problema, la misma autora ha desarrollado una versión reducida del mismo, con solo 15 ítems llamado Mini-AQLQ (130), que se cumplimenta aproximadamente en 7 minutos, y que continua estudiando esas 4 dimensiones de la salud: síntomas (5 ítems), limitación de actividades habituales (4 ítems), función emocional (3 ítems) y estímulos ambientales (3 ítems).

En lo relativo al asma infantil, el cuestionario más empleado, y único validado en España es el PAQLQ (140). Comparte la mayoría de las propiedades psicométricas que el AQLQ de Juniper (118) y tiene un formato similar, lo que no resulta extraño al haber estado diseñados ambos por los mismos investigadores. Su cumplimentación la realiza el paciente, con o sin ayuda del entrevistador y se ha probado su utilidad de 7 a 17 años. Los niños de menor edad tropiezan con dificultades en la comprensión de las preguntas y las respuestas, por lo que no es fácil desarrollar cuestionarios específicos para ellos. En esta etapa de la vida, la edad influye decisivamente en los aspectos de la enfermedad que más preocupan al paciente, de manera que lo que puede resultar sumamente importante para un niño de 13 años puede ser totalmente irrelevante para otro de 7 años. El PAQLQ ofrece ventaja en este aspecto al permitir que el paciente elija, a la hora de rellenar el cuestionario, las actividades más representativas para él. La cumplimentación de sus 23 ítems resulta bastante ágil, no ocupando, generalmente, más de 15 minutos.

Un problema que merece especial atención es la interpretación de las modificaciones que reflejan la calidad de vida en mediciones seriadas a lo largo del tiempo. De la misma manera que el incremento de unas decenas de mililitros, en determinaciones seriadas del FEV₁, puede alcanzar significación estadística y sin embargo, el valor clínico de dicho cambio puede ser escasamente relevante, las variaciones en puntuación de los cuestionarios de calidad de vida pueden resultar estadísticamente significativas sin que sean clínicamente trascendentes. Además, cuando se utilizan muestras muy grandes, es relativamente sencillo obtener modificaciones estadísticamente significativas, sin que por ello resulten clínicamente relevantes. Algunos cuestionarios han establecido la frontera para considerar los cambios como clínicamente, además de estadísticamente, significativos. El parámetro se define como MID (diferencia mínima importante) y su valor para el cuestionario AQLQ de Juniper (118) se ha

establecido en 0,5 puntos para cada dominio (152). Cuando se rebasa esta diferencia, el paciente empieza a percibir el cambio en su estado de salud. Su cálculo se realiza mediante fórmulas matemáticas, basándose en los promedios de los incrementos o reducciones que tienen lugar en los distintos dominios, cuando el paciente refiere mejoría o empeoramiento de su enfermedad. Cambios superiores a 1 punto se consideran importantes y a partir de 1,5 puntos, muy importantes (152).

1.2. Genética del asma

El componente hereditario del asma y la atopia se ha estudiado desde los primeros años del siglo XX (153-156), al observar un agrupamiento familiar de las enfermedades atópicas. Hoy día no existe duda alguna acerca de la contribución de los genes a la etiología de las enfermedades alérgicas. Los estudios familiares y en gemelos han demostrado repetidamente la influencia de los genes en el desarrollo de la atopia (157, 158).

La atopia es una enfermedad de origen genético multifactorial, al igual que la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes. Todas estas enfermedades muestran un patrón hereditario que no puede ser clasificado de mendeliano simple, es decir, no existe un único gen causante de la enfermedad, sino que hablamos de un conjunto de genes que confieren susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.

1.2.1. Estrategias de estudio de genes asociados a asma

La influencia de la genética en el asma se ha ido estudiando a lo largo de los años con el desarrollo de la técnica utilizando distintos enfoques.

1.2.1.1. Estudios de ligamiento del genoma completo

El primer estudio de este tipo relacionado con la alergia fue llevado a cabo por Cookson y cols. en 1989 (159). Posteriormente, en 1996, Daniels y cols. (160) publicaron el primer trabajo enfocado al estudio del asma.

Este tipo de estudios consisten en estudiar familias con individuos enfermos: se examinan marcadores genéticos distribuidos a lo largo de todos los cromosomas y la búsqueda se centra en regiones que contienen un número más elevado del esperado de alelos que coinciden en los sujetos afectados. Si se encuentra una región de este tipo (que a menudo abarca 20-30 millones de pares de bases y contiene cientos de genes) sugiere que en algún lugar de esta región hay un alelo que predispone a padecer dicha enfermedad. Esa región pasa a ser considerada ligada a dicha enfermedad y los genes que contiene pasan a ser candidatos posicionales para un estudio más exhaustivo.

El uso de este tipo de estudios tiene la ventaja de poder identificar nuevos genes y rutas implicados en patologías complejas sin disponer de hipótesis *a priori*, pero los resultados de este tipo de análisis son enormemente difíciles de interpretar: la mayoría de las regiones cromosómicas ligadas al asma presentan múltiples *loci* candidatos, cada uno de los cuales podría ejercer un pequeño efecto en la susceptibilidad. Un ejemplo de ello es la región 5q31-32, que ha sido asociada a asma y atopia en numerosos estudios, que incluye 14 genes que han sido relacionados con asma, atopia o fenotipos intermedios como *IL4*, *IL13*, *CD14*, *ADRB2* o *SPINK5*.

Una desventaja notable de este tipo de estudios es la dificultad que han mostrado para ser replicados, así como su restringida capacidad para poner de manifiesto *loci* que confieran un riesgo de efecto limitado en la patología (161). Además, requieren la inclusión de un elevado número de familias para poder encontrar asociaciones. En la actualidad se tiende más a realizar estudios de asociación en genoma completo.

1.2.1.2. Estudios de asociación de genes candidatos

Estos trabajos se basan en el estudio de una selección de genes que intervienen en la patogenia de la enfermedad o de los que se ha sospechado su asociación mediante estudios de ligamiento. Consisten en la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos de controles y pacientes sin relación de parentesco.

Se trata de un método con mayor capacidad para detectar polimorfismos que confieran un riesgo moderado a la enfermedad que los estudios de ligamiento (161), sin necesidad de aumentar el tamaño de la muestra del estudio. Otra ventaja de estos estudios de asociación es el diseño: resulta más sencillo reclutar para un estudio un número alto de individuos enfermos que no tengan relación de parentesco que obtener una colaboración de múltiples familias. Además, a igual número de individuos emparentados y no emparentados, el poder estadístico es mayor si los individuos no son familia (162).

Una desventaja de este tipo de estudios de asociación de casos y controles deriva de la posible estratificación de las poblaciones, que podría dar lugar a diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles que no se debieran a la enfermedad. Aunque se pueden emplear métodos que permitan detectar y minimizar el efecto de la mezcla étnica, lo ideal es estudiar poblaciones no estratificadas, lo cual se vuelve cada vez más complejo debido a los efectos migratorios. Por otro lado el hecho de que se seleccionen los posibles genes candidatos a priori limita la identificación de nuevos marcadores.

1.2.1.3. Estudios de asociación en genoma completo

Más recientemente, los avances a gran escala de la genómica han hecho que se desarrollen nuevas estrategias para abordar el estudio de enfermedades complejas. Este es el caso de los estudios de asociación en genoma completo (GWAS, que corresponde a las siglas en inglés *Genome Wide Association analysis*), en los que se analizan cientos de miles de polimorfismos repartidos por todo el genoma en busca de las variantes que se asocien a la susceptibilidad de padecer una determinada enfermedad compleja o alguno de sus síntomas. Este tipo de estudios es posible gracias a que actualmente se comercializan micromatrices (*microarrays*) que permiten genotipar un gran número de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en miles de pacientes y controles con un coste asumible.

El primer trabajo de este tipo para estudiar el asma (en concreto el asma infantil) fue publicado en 2007 por Moffatt y cols.(163). Estudiaron más de 317.000 SNP en 994 niños asmáticos y 1.243 controles y encontraron una asociación con la región 17q21.1 (región de 206 kbp en el que se pueden encontrar *STAT3*, *CRHR1*, *ITGB3*, *TBX21* y *ORMDL3*).

Posteriormente, se han publicado otros estudios de este tipo con asma, encontrando diversas asociaciones. En la siguiente tabla se resumen las asociaciones más significativas:

Tabla 3. Resumen de las asociaciones más relevantes encontradas en los diferentes estudios GWA que se han llevado a cabo con asma. Modificada de Akhbir y cols. (164).

Genes	Estudio GWA
<i>CRB1</i> <i>DENND1B</i> <i>C1orf53</i>	Sleiman y cols. (165)
<i>ERO1LB</i> <i>ANTXR1</i> <i>PROC</i> <i>HNMT</i> <i>NRG1</i> <i>DNAJC1</i> <i>IKZF3</i> <i>IKZF3</i> <i>ZPBP2</i> <i>GSDMB</i> <i>ORMDL3</i> <i>C21orf94</i> <i>MAGEE1</i>	Moffatt y cols. (163)
<i>IL18R1</i> <i>SMAD3</i> <i>IL2RB</i>	Moffatt y cols. (166)
<i>HLA-DQB1</i>	Moffatt y cols. (166) y Li y cols. (167)
<i>RNGTT</i> <i>ZNF618</i> <i>PRKG1</i> <i>C14orf180</i>	Mathias y cols. (168)
<i>IL33</i>	Moffatt y cols. (166) y Gudbjartsson y cols. (169)

De los anteriores cabe destacar el estudio llevado a cabo en 2010 por Moffatt y cols. (166) dado que se incluyeron 10.365 personas diagnosticadas de

asma y 16.110 controles procedentes de 23 estudios individuales. Se trata de un *large-scale consortium-based GWA*, que es el equivalente a los meta-análisis en los estudios *GWA*. Este estudio identificó *IL1R*, *IL1RL1/IL18R1*, *HLA-DQ*, *IL33*, *SMAD3* e *IL2RB*. Confirmó la asociación encontrada previamente de *ORMDL3* y *GSDMB* pero, específicamente, en el asma de inicio en la infancia.

Las ventajas de este tipo de estudios son evidentes, ya que permiten conocer genes candidatos asociados a un riesgo moderado (161). Sin embargo, como con cualquier nuevo método de análisis, es importante no sobreestimar la capacidad de los estudios de genoma completo. En primer lugar, hay que ser muy cuidadoso en la selección de la población que se va a estudiar: es necesario que los pacientes estén uniformemente caracterizados con criterios clínicos que no presenten ambigüedad, lo cual se complica cuando se analizan poblaciones que incluyen miles de pacientes. Dicha caracterización es especialmente importante en los controles: los individuos que se seleccionen como controles en este tipo de estudios deben tener unas características fenotípicas muy bien determinadas y caracterizadas. En segundo lugar, para poder identificar los alelos de interés, es necesario contar con muestras de tamaño adecuado; las muestras pequeñas no permiten alcanzar un poder aceptable y las muestras muy grandes pueden proporcionar asociaciones espurias. La necesidad de trabajar con muestras lo suficientemente grandes, independientemente de su buena caracterización, puede llevar a una enorme heterogeneidad en las influencias ambientales así como en el origen étnico de los pacientes, aspectos estos muy importantes en el desarrollo de enfermedades complejas como el asma (170). Además, de este tipo de estudios se obtiene una gran cantidad de datos para cuyo análisis se requieren plataformas informáticas muy potentes y cuyo análisis estadístico supone un reto muy complicado para los bioinformáticos, que deben desarrollar herramientas estadísticas que permitan distinguir resultados verdaderamente positivos, estableciendo controles que eviten los falsos positivos. Todos estos factores contribuyen a proporcionar resultados que, en muchos casos, no han podido ser replicados, por lo que deben ser tomados con precaución.

El desarrollo de este tipo de estudios ha supuesto una revolución en el estudio de las enfermedades complejas, sin embargo, los resultados obtenidos

hasta ahora no han sido tan relevantes como se esperaban, ya que en la mayoría de ellos se encuentran asociaciones que ya se conocían (171).

1.2.2. Genes asociados con el asma

El número de genes que se han relacionado con el asma es muy extenso. Hoffjan y cols. (172), en 2003, analizan los trabajos publicados hasta el momento y descubren un total de 64 genes que han sido relacionados con el asma en al menos un estudio independiente. Posteriormente Ober y cols. (173) en 2006 amplían esta lista a 118 genes y Zhang y cols. (174) en 2008 añaden 53 genes más, llegando a un total de 171 genes candidatos hasta ese momento.

En la Tabla 4 podemos observar estos genes candidatos, ordenados por su localización cromosómica y las variaciones asociadas a asma o atopia que se han descrito.

Muchos de estos genes se han asociado con asma o atopia en un número pequeño de estudios, por lo que, si analizamos los genes que han sido replicados con mayor frecuencia, la lista se reduce de forma considerable. En la Tabla 5 se pueden ver los genes en los que se ha encontrado una asociación entre ciertos polimorfismos y asma en al menos 3 estudios independientes de más de 150 casos y 150 controles.

La mayoría de estos genes que se han asociado a asma o atopia codifican moléculas que forman parte de la respuesta inmune inflamatoria o intervienen en alguna de sus manifestaciones: respiratorias (sibilancias, hiperreactividad bronquial, parámetros de la función respiratoria), inmunológicas (niveles séricos de IgE total o específica, atopia) o clínicas (dermatitis atópica y/o eczema, rinoconjuntivitis).

Tabla 4. Genes asociados a asma o atopía en al menos un estudio. Datos obtenidos de las revisiones de Hoffjan y cols. (172), Ober y cols. (173) y Zhang y cols. (174).

Gen	Región chr	Variación descrita	Gen	Región chr	Variación descrita
PTGER3	1p31	1388T>C, -1709T>A	PAFAH	6p12	Val279Phe, Ile198Thr, Ala379Val
CLCA1	1p22	haplotipos	IL17F	6p12	rs763780, rs763780
GCLM	1p22	-588C/T, -23G/T	FYN	6q21	-93A/G; Ex12+894T/G
VCAM1	1p21	-1594 T/C	IFNGR1	6q23	Intron 2, Val14Met, Leu467Pro
GSTM1	1p13	+/nulas	ESR1	6q25.1	IVS1-1505A/G, IVS1-1415T/C, IVS1-397C/T, IVS1-351G/A, exon1+30T/C
CHIA	1p13	Lys17Arg, rs3818822, haplotipos	NOD1	7p15	múltiples SNPs, haplotipos, In/del intron 9
FLG	1q21.3	R510X, 2282del4, S2554X, 3321delA, R2447X, S3247X, 3702delG	GPRPA	7p14	haplotipos, SNP546333, SNP585883, SNP563704, SNP522363, rs323922
LELP1	1q21	(GT) _n , rs7534334	AOAH	7p14-12	múltiples SNPs, haplotipos
DAP3	1q22	-20632 G/T	CCL26	7q11	2497 T/G, 77 C/T, 716 A/G, 1579 G/A, haplotipos
SELP	1q24	Val640Leu	CCL24	7q11	1265 A/G, 179 T/C, 275 C/T, haplotipos
COX2	1q31	-765 G/C	CFTR	7q31	ΔF508, 5T/7T/9T, Missense mutations, haplotipos
IL10	1q32	-571C/A, -1082 A/G, 4299 T/C (3'UTR), haplotipos	NOS3	7q36	STRP Intron 4, Glu298Asp, -922 A/G
TGFB2	1q41	94862T>A; -109-->ACAA ins	DEFB1	8p23	-1816 T/C, IVS+692 G/A, haplotipos
AGT	1q42	M235T	NAT2	8p22	Slow acetylation genotypes
CHRM3	1q43	haplotipos	SFTPC	8p21	haplotipos
ACP1	2p25	*A/*B	RIP2	8q21	-980T/G
KCNS3	2p24	rs1031771, rs1031772, haplotipos	IKAP	9q31	Cys1072Ser, Pro1158Leu, haplotipos, múltiples SNPs
IL1RL1	2q11	-26999 G/A, -27639 A/G	TLR4	9q33	Asp299Gly, Thr399Ile, haplotipos
IL1A	2q13	4845 G/T, haplotipos	C5	9q33	Ile802Val, 1632 C/T, 2404 G/A, haplotipos
IL1B	2q13	-511C/T, 3953 C/T, haplotipos	GATA3	10p14	haplotipos
IL1RN	2q13	VNTR intron 2, múltiples SNPs, haplotipos	NK2R	10q11-21	7853G>A
DPP10	2q14	múltiples SNPs, haplotipos	CXCL12	10q11	800 G/A
HNMT	2q22	Thr105Ile	ALOX5	10q11	(GGGCCG) _n promoter, haplotipos
STAT4	2q22	90089 T/C, haplotipos	PLAU	10q24	rs2227564, rs2227566, rs4065, haplotipos
CTLA4	2q33	-318C/T, 49A/G, -1147C/T, (AT) _n 3'UTR, múltiples SNPs	CAT	11p13	C-262T
ICOS	2q33	-1413 G/A, -693 G/A	BDNF	11p13	-270C/T
IL8RA	2q35	M31R, R335C	FCER1B	11q12	Ile181Leu, Leu181/Leu183, Gly237Glu, Rsalin2, RsaIex7, -109C/T, STPR intron 5, haplotipos
IL5RA	3p26	-80 G/A, -5993 A/G, -480_482delGGT	CRTH2	11q12	1544 G/C, 1651 G/A, haplotipos
PPARG	3p25	Pro12Ala; C1431T, haplotipos	CC16/CC10	11q12	38A/G, STRP intron1, haplotipos
CCR2	3p21	Ile64Val	GSTP1	11q13	Ile105Val
CCR3	3p21	51T/C	IL18	11q23	-656T/G, -137G/C, 113T/G, 127C/T, -133C/G, 105 A/C, -148 G/C, 13925 A/C
CCR5	3p21	Δ32	C3AR1	12p13	1526 G/A
TLR9	3p21	-1237C/T, 1635G/A, múltiples SNPs, haplotipos	AICDA	12p13	7888C/T, 465 C/T
CX3CR1	3p21.3	rs938203, rs2669849, rs1050592, T280M, V249I, haplotipos	VDR	12q13	múltiples SNPs, 117 C/T, haplotypes
CSTA	3q21	C+344T	STAT6	12q13	2964G/A, (GT) _n exon 1, 1570C/T, (CA) _n promoter, 2892 C/T, 12888 T/C, múltiples SNPs, haplotipos
MYLK	3q21	Pro147Ser, haplotipos	IRAKM	12q14	rs1624395, rs1370128, haplotipos
CD86	3q21	Ile179Val	IFNG	12q15	(CA) _n intron 1
COL29A1	3q22	haplotipos	LTA4H	12q22	rs2660845
TLR10	4p14	1031 G/A, 2322 A/G	NOS1	12q24	(CA) _n exon 29, STRP intron 2, (AAT) _n , 3391C/T, 5266C/T
TLR6	4p13	Ser249Pro	SFRS8	12q24.33	rs1051219, rs1051233, rs755437
PDGFRA	4q11-q13	rs1800810, haplotipos	FLAP	13q12	(A) _n , 218 A/G, -336 G/A, IVS2+12C/A, IVS2+105T/C
VEGFR2	4q11-q12	V297I, haplotipos	CYSLTR2	13q14	Met201Val (601 A/G), -1220 A/C, IVS2-37A/G
MUC7	4q13	VNTR	PHF11	13q14	rs2247119, rs1046295, múltiples SNPs, haplotipos
IL8	4q13	-251 A/T, 781 C/T, 1633 C/T, 2767 A/T	TCRA/D	14q11	VA8.1
CXCL9	4q21	rs2869460, rs2276886	CMA1	14q11	BstXI, -1903 G/A, (TG) _n (GA) _m , haplotipos

Gen	Región chr	Variación descrita	Gen	Región chr	Variación descrita
CXCL10	4q21	rs2869462	PTGDR	14q22	-549T>C, -441C>T, -197T>C, haplotipos
CXCL11	4q21	rs12649185	PTGER2	14q22	uS5 (Promoter), uS5b, uS7, haplotipos
SPP1	4q22	5891C/T, 7052T/C	ECP	14q24-31	-393C/T, haplotipos
PGDS	4q22	Intron 2 11A/C	AACT	14q32	Thr15Ala
GSNOR	4q23	rs28730619, rs1154404	IGHG	14q32.3	IGHG*bf/*bf
IL2	4q27	rs2069762, rs2069763, haplotipos	IL16	15q26.3	-295 T/C
IL15	4q31	haplotipos	SOCS1	16p13.13	-1478CA>del, haplotipos
EDNRA	4q31	His323His	MRP1	16p13.1	rs119774
TLR2	4q31	-16934 A/T, Arg753Glu, -196-147del, -191 G/A, 597 T/C, 1350 T/C	IL4RA	16p12	Ile50Val, Glu375Ala, Cys406Arg, Ser478Pro, Gln551Arg, Ser786Pro, -3223 C/T, múltiples promotor SNPs, haplotipos
IRF2	4q35	haplotipos	CARD15	16q12	Arg702Trp, Gly908Arg, 3020insC, rs1077861, rs3135500, haplotipos
PTGER4	5p13	-1254A>G	IL27	16p11	g.-964A > G
IL3	5q23	Ser27Pro	NOS2A	17q11	(CCTTT) _n , 5' VNTR, D346D
CSF2	5q23	Ile117Thr, 545G/A, 3606T/C, -677C/A, -1916T/C	CCL2	17q12	-2518A/G
IRF1	5q23	(GT) _n intron 7	CCL11	17q12	Ala23Thr, -426C/T, -384A/G, -1328 G/A
IL5	5q23	-746 T/C	CCL5	17q12	-403A/G, -28C/G, haplotipos
IL13	5q23	-1112C/T, Gln130Arg	ORMDL3	17q12-21	rs9303277, rs11557467, rs8067378, rs2290400, rs7216389, rs4795405, rs8079416, rs4795408, rs3894194, rs3859192
IL4	5q23	-589C/T, +33C/T, VE6523, 3017G/T, (GT) _n intron 2, (CA) _n intron 2, STRP intron 2, haplotipos	STAT3	17q21	G3363a16, rs1026916, rs957971, haplotipos
IL9	5q31.1	GT repeat	CRHR1	17q21	rs242941, rs1876828, haplotipos
CD14	5q31	-159C/T, -810 A/C, -1359G/T, -2839 A/G (rs2569193), 1437 C/G	ITGB3	17q21	múltiples SNPs, haplotipos
DCNP1	5q31	c.-1289C>T	TBX21	17q21	His33Glu, -1993 T/C, -7947 A/G, c.2122, c.21126, múltiples SNPs, haplotipos
UGRP1	5q32	-112G/A	ACE	17q23	In/del
SPINK5	5q32	Glu420Lys, Asn368Ser, múltiples SNPs	FCER2	19p13.3	T2206C
ADRB2	5q32-34	Arg16Gly, Gln27Glu, múltiples SNPs, haplotipos	TBXA2R	19p13	924T/C, 795 T/C, haplotipos
ITK	5q31-32	rs451494, rs365171	C3	19p13	Arg102Gly, 4896 C/T, haplotipos
IL12B	5q31-33	CTCTAA/GC, 1188A/C, Ser226Asn, 4237 G/A, haplotipos	IL12RB1	19p13	-111 A/T, -2 C/T
TIM4	5q33.3	haplotipos	TGFB1	19q13	-509C/T, Arg25Pro, Leu10Pro, (CT) _n (CA) _m , haplotipos
HAVCR1	5q33	5509_5511delCAA, 5383_5397del, Rs2277025, múltiples SNPs, haplotipos	SCCE	19q13	In/del (AACC)
HAVCR2	5q33	Arg140Leu, rs11134551, rs11742259, 3'UTR, -574 T/G, haplotipos	PTGIR	19q13	1915T>C, haplotipos
CYFIP2	5q33	múltiples SNPs	ADAM33	20p13	múltiples SNPs, T1 T/C, S_2, haplotipos
LTC4S	5q35	-444A/C, IVS1-10C/A	MMP9	20q11.2-13.1	2127G/T, 5546G/A, haplotipos
EDN1	6p24	4124C/T	CD40	20q12-13.2	-580G >A, -1C>T
HLA-G	6p22	múltiples SNPs	CYP24A1	20q13	haplotipos
LTA	6p21	NcoI (intron1), -753G/A, haplotipos	IFNGR2	21q22	Gln64Arg
TNF	6p21	-308G/A, -238 G/A, -857C/T, haplotipos	RUNX1	21q22.3	-208G/C, -1282G/A
HLA-DRB1	6p21	Multi-SNP alleles	MIF	22q11	(CATT) _n Promoter, -173 G/C, haplotipos
HLA-DQA1	6p21	Multi-SNP alleles	GSTT1	22q11	A/null
HLA-DQB1	6p21	Multi-SNP alleles	TIMP1	Xp11	Ile158Ile, haplotipos
TAP1	6p21	Gly637Asp, Accl	CXCR3	Xq13	C.12+234 G/A
HLA-DPB1	6p21	Multi-SNP alleles	CYSLTR1	Xq13.2-21.1	927T/C, G300S, haplotipos
HLA	6p21	Multi-locus haplotipos	IL13RA1	Xq24	1398A/G, -1050C/T
MICB	6p21.3	AluYMICB DD, AluYMICB II			

Tabla 5. Genes asociados a asma en al menos 3 estudios de más de 150 casos y 150 controles. Datos obtenidos de Obeidat y cols. (175).

Gen	Nº de poblaciones
<i>ADRB2</i>	5
<i>CCL11</i>	3
<i>CCL5</i>	3
<i>CD14</i>	4
<i>CYSLTR2</i>	3
<i>EDN1</i>	3
<i>FCER1B</i>	9
<i>GSTP1</i>	8
<i>IL10</i>	4
<i>IL13</i>	8
<i>IL4</i>	11
<i>IL4 R</i>	7
<i>ITGB3</i>	3
<i>LTA</i>	3
<i>NAT2</i>	3
<i>NOD1</i>	4
<i>PAFAH</i>	3
<i>PTGDR</i>	5
<i>TLR9</i>	3
<i>TNF</i>	17
<i>UGB (CC10)</i>	4
<i>VDR</i>	3

Se puede realizar una división de estos genes en cuatro categorías fundamentales, en función del papel que desarrollen (176), ver Ilustración 5:

- Genes asociados con la respuesta inmune innata y su regulación.
- Genes asociados con la diferenciación y funciones efectoras de los linfocitos Th2.
- Genes asociados con la biología epitelial y la inmunidad de las mucosas.
- Genes asociados con la función pulmonar, la remodelación del epitelio bronquial y la gravedad de la enfermedad.

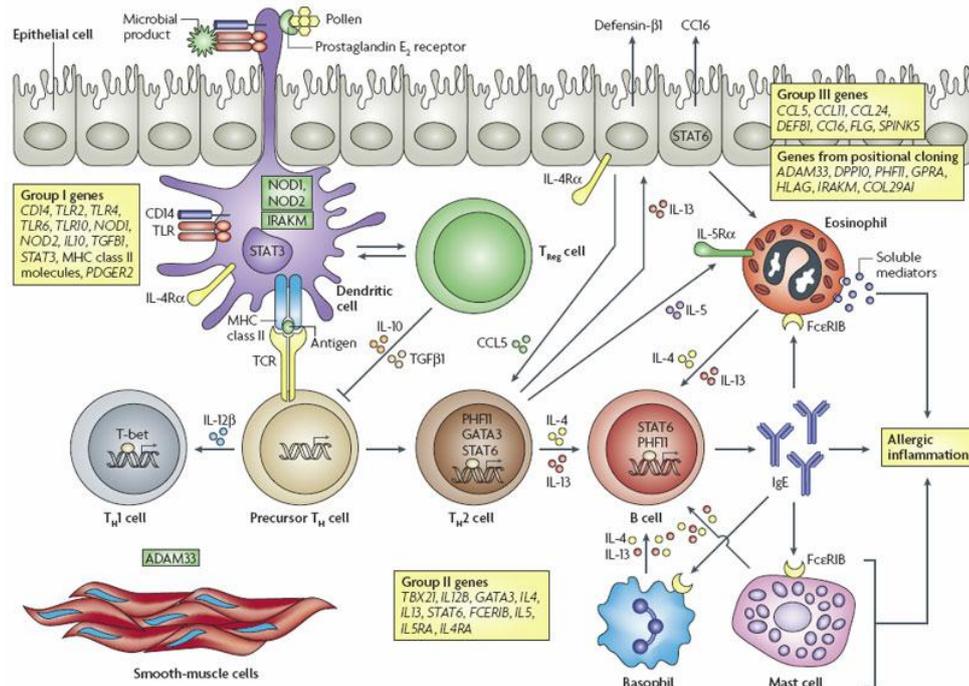


Ilustración 5. Esquema tomado de Vercelli (176) en el que se puede apreciar la función de los genes más relevantes.

Debido a la enorme cantidad de genes identificados se describirán en cada apartado los de mayor relevancia y que hayan sido replicados en al menos 5 estudios. Además se describirán otros genes obtenidos mediante estudios de ligamiento por clonación posicional.

1.2.2.1. Genes asociados con la respuesta inmune innata y su regulación

El primer grupo de genes se encuentran en la interfase de la detección de la inmunidad innata y su regulación y están involucrados en el desencadenamiento de la respuesta inmune.

La inflamación alérgica y la regulación de la IgE están muy influenciadas por polimorfismos en genes que codifican receptores de reconocimiento de patrones y receptores extracelulares como CD14 (177), receptores *Toll-like* como

TLR2 (178), TLR4 (179, 180), TLR6 (181) y TLR10 (182); y receptores intracelulares como NOD1 (*Nucleotide-binding oligomerization Domain containing 1*) (183) y NOD2 (también conocido como CARD15) (184). Estos receptores reconocen moléculas microbianas y activan los primeros mecanismos de defensa del organismo frente a ellos. También se han encontrado polimorfismos en estos receptores en otras enfermedades complejas como la enfermedad inflamatoria intestinal (185, 186) o patologías cardiovasculares (187) en las que, al igual que en el asma, el componente inflamatorio de la respuesta innata es muy importante.

Se ha encontrado asociación entre el asma y determinadas variantes en genes de citocinas inmunorreguladoras como IL-10 (188) o TGFB1 (*Transforming Growth Factor-β1*) (188, 189), así como genes de factores de transcripción como STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (190), que media los efectos inhibitorios de IL-6 en las células dendríticas.

Ha quedado de manifiesto el importante papel que juega la presentación antigénica en la respuesta alérgica dependiente de IgE mediante estudios que muestran una asociación relevante con los alelos DR, DQ y DP (191) del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (HLA-II).

Por último, el receptor de prostaglandina E₂ (PTGER2) también se ha relacionado con el asma (192). En este sentido se cree que los fitoprostanos del polen (moléculas bioactivas que se asemejan a la prostaglandina E₂ endógena) podrían actuar directamente en las células dendríticas, aumentando la expresión de IL-12 y favoreciendo la respuesta Th2 (193).

1.2.2.2. Genes asociados con la diferenciación y funciones efectoras de los linfocitos Th2

El segundo grupo de genes incluye genes que regulan la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo Th2, proceso clave en el desarrollo de asma y de atopia.

La diferenciación de un linfocito CD4+ (precursor de linfocitos Th1 o Th2) hacia Th2 requiere la inducción del factor de transcripción GATA3 (*GATA-binding protein 3*), mediada por señales provocadas por la interacción de IL-4 con IL-4R α y mediada también por STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*). La actividad de GATA3 parece estar inhibida por el factor de transcripción T-bet (que es un inductor de la diferenciación a Th1) (194). Se han asociado con asma, alergia y a la respuesta al tratamiento con corticoides variantes de *GATA3* (195), *TBX21* (gen que codifica T-bet) (196), *IL-4* (197, 198), *IL4RA* (199), *STAT6* (200) e *IL12B* (gen que codifica la subunidad p40 de la IL-12) (201).

La IL-13 es una de las principales citocinas efectoras de la respuesta alérgica. De hecho, es suficiente para mediar todas las características cardinales de la respuesta Th2 en modelos bronquiales de animales (hiperreactividad bronquial, infiltración de células inflamatorias, aumento de secreción de moco y fibrosis de la vía respiratoria) (202, 203). Es la única citocina, junto con la IL-4, capaz de inducir la síntesis de IgE. La expresión de IL-13 y de sus receptores está incrementada en el tracto respiratorio de los pacientes con asma y rinitis (204, 205). Además, la IL-13 se expresa en la placenta (206) y es secretada de forma activa por las células T durante el período neonatal (207), un momento crítico para el desarrollo de la susceptibilidad a la enfermedad alérgica. El papel central de las citocinas que favorecen la respuesta Th2 en el asma ha sido enfatizado en estudios farmacológicos, demostrando que la administración local de una variante de IL-4 que inhibe la unión de IL-4 e IL-13 a la cadena α del receptor de IL-4 disminuye de forma sustancial los síntomas de asma producidos por la inhalación de alérgenos (208). Debido a estas características, el gen *IL-13* es uno de los genes candidatos más estudiados en el asma y alergia:

- El polimorfismo +2044GA (IL-13 Arg130Gln, rs20541) provoca el cambio de la arginina de la posición 130 por glutamina, dando lugar a una variante de *IL13* con actividad biológica aumentada (209). Este polimorfismo está asociado con niveles plasmáticos elevados de IgE (210-213), asma (214), atopia (214, 215) y dermatitis atópica (211, 216, 217).
- El polimorfismo -1112CT (rs1800925), presente en la región promotora de *IL13*, se ha asociado a asma, dermatitis atópica y al riesgo de desarrollar

sensibilización alérgica (218-221), probablemente debido a que produce un aumento de síntesis de IL-13 (222).

Los polimorfismos en las vías de transmisión de señales de Th2 podrían influir sobre la síntesis de IgE dependiente de células T, así como la amplificación de IgE dependiente de citocinas Th2 expresadas por basófilos y mastocitos mediada por la activación del receptor de alta afinidad de la IgE (FcεR1). Por ello, determinados polimorfismos presentes en el gen que codifica la cadena β del FcεR1 (*FCER1B*, también conocido como *MS4A2*) han sido muy estudiados (223). Éstos podrían afectar a la expresión del receptor (224) y a la liberación de mediadores inflamatorios dependientes de IgE por los mastocitos. También pueden afectar a la expresión de citocinas Th2 en otras células distintas de los linfocitos T y a la presentación de antígenos dependiente de IgE por las células dendríticas.

La fase efectora de la inflamación alérgica también depende de la interacción entre la IL-5, producida por las células Th2 y el receptor IL-5RA de las células progenitoras de eosinófilos. La IL-5 induce el desarrollo de los eosinófilos, que podrán ser reclutados hacia las vías respiratorias por quimiocinas producidas por las células epiteliales y convertirse en una importante fuente de citocinas Th2. Los polimorfismos en *IL5* e *IL5RA* se han asociado con el asma y la atopia (225, 226), pero no de forma tan intensa como en el caso de otros polimorfismos de otros genes de la respuesta Th2.

1.2.2.3. Genes asociados con la biología epitelial y la inmunidad de las mucosas

El tercer grupo de genes se expresa en las células epiteliales y por ello en la interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa.

El epitelio secreta quimiocinas como CCL5 (*CC-chemokine 5*, también conocida como RANTES), que atrae a células T y a eosinófilos; y CCL11, CCL24 y CCL26 (conocidas como eotaxinas 1-3), que atraen de forma muy potente a los eosinófilos. El epitelio también secreta péptidos antimicrobianos (como defensina β1) y CC16, que inhiben la diferenciación hacia Th2 actuando sobre las células

dendríticas. Todos los correspondientes genes han sido relacionados con asma y atopia (227-230).

La expresión de SPINK5, que actúa como molécula protectora frente a las proteasas liberadas por los mastocitos o los alérgenos, es exclusiva del epitelio. Mutaciones en este gen dan lugar al Síndrome de Netherton (una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente caracterizada por un defecto en la función epitelial y que cursa con eczema) (231). También se han asociado variaciones en este gen, como el SNP Glu420Lys, con asma y eczema (232).

Por último cabe destacar el gen de la filagrina (*FLG*), proteína clave en la barrera epidérmica y de la que hablaremos en profundidad posteriormente.

1.2.2.4. Genes asociados con la función pulmonar, a la remodelación del epitelio bronquial y a la gravedad de la enfermedad

El cuarto grupo de genes es más heterogéneo y comprende genes asociados a la función pulmonar, la remodelación bronquial y la gravedad de la enfermedad.

Cabe destacar el gen del receptor β 2-adrenérgico humano *ADRB2* (233) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (234), que son los que han sido replicados en mayor número de estudios asociados a asma.

También se han asociado al asma *TGFB1* (189), *LTC4S* (*leukotriene C₄ synthase*) (235), Glutathion-S-Transferasas (*GSTP1* y *GDTM1*) (236, 237), receptor del tromboxano A₂ (*TBXA2R*) (238), *ALOX5* (*arachidonate-5-lipoxygenase*) (239), linfotoxina- α (*LTA*, también conocido como *TNFB*) (234), tenascina-C (*TNC*) (240) y sintetasa de óxido nítrico 1 (*NOS1*) (241).

Algunos de estos genes (como *LTC4S*, *ALOX5* o *ADRB2*) parecen tener importancia en las necesidades de tratamiento y están siendo investigados de forma sistemática en los estudios de farmacogenética, tratando de identificar variantes que determinen patrones de respuesta farmacológica (242).

1.2.2.5. Genes obtenidos mediante estudios de ligamiento

Este tipo de genes merece un apartado individual, ya que se trata de *loci* que antes de ser identificados en estudios de ligamiento no se pensaba que pudieran tener relación con el asma. Estas asociaciones deben confirmarse y tratar de relacionarlos con las rutas patogénicas del asma.

El primer gen descrito mediante estudios de ligamiento fue *ADAM33*, que codifica una desintegrina y metaloproteasa implicada en la remodelación bronquial del asma. Este gen fue identificado en un estudio de ligamiento llevado a cabo en 460 familias de Reino Unido y Estado Unidos (243). Se identificó una región que incluía unos 40 genes en el brazo corto del cromosoma 20 con ligamiento significativo con el asma y la hiperreactividad bronquial. Tras un análisis posicional de la región se identificó *ADAM33* como la fuente de la señal de ligamiento. La asociación de *ADAM33* con el asma y la función pulmonar se ha confirmado en distintas poblaciones de diferentes etnias (244). La identificación de *ADAM33* ha supuesto un importante paso adelante porque este gen apunta a nuevas rutas patogénicas del asma. A diferencia de otros genes candidatos, *ADAM33* es expresado por fibroblastos pulmonares y células del músculo liso bronquial. También está preferentemente expresado durante la diferenciación morfogénica de los pulmones humanos y murinos, sugiriendo una función ligada al papel de la unidad epitelial-mesenquimal durante el desarrollo pulmonar (244).

El gen *PHF11* (*Plant Homeodomain Finger protein 11*) también se ha asociado con la gravedad del asma (245), además de con los niveles de IgE. Está localizado en la región 13q14 y codifica una proteína de la familia PHD (*Plant HomeoDomain*), caracterizadas por presentar en su estructura uno o más dedos de zinc. Esta proteína ejerce su función en el núcleo, interaccionando con las histonas y modificando la transcripción génica (246).

El gen *DPP10* (*Dipeptidyl-Peptidase 10*) se encuentra ligado al asma y a la hiperreactividad bronquial. Está localizado en la región 2q14, pero un estudio más concienzudo de esa región mostró que la asociación se limitaba a los exones iniciales del gen, que codifica un homólogo de dipeptidil-peptidasa

involucrada en la escisión de péptidos terminales de citocinas y quimiocinas (247).

El gen *GPRA* (*G-Protein-coupled Receptor for Asthma susceptibility*, también denominado *NPSR1* y *GPRA154*) está codificado en la región 7p14. Se identificó al ser uno de los dos genes que estaba dentro una región de 133kb localizada mediante estudio de ligamiento, y se demostró que presentaba una distribución de isoformas de la proteína diferente en los sujetos sanos y asmáticos. En 3 cohortes de Finlandia y Canadá se relacionaron varios SNP con niveles elevados de IgE y asma (248).

El gen *HLA-G* (una molécula de HLA de clase I codificada en la región 6p21) fue asociado con la predisposición a padecer asma en un estudio de ligamiento llevado a cabo en familias blancas de Estados Unidos (249). Se expresa fundamentalmente en células fetales y en la interfase materno-fetal, colaborando con la inmunosupresión que tiene lugar en el embarazo. Se ha detectado HLA-G soluble a nivel bronquial en algunos pacientes asmáticos, pero no en sujetos sanos (250), lo que sugiere que este gen puede estar regulado al alza en sujetos asmáticos.

Se han identificado 6 SNP en el gen *CYFIP2* (*Cytoplasmic Fragile X mental retardation protein Interaction Protein 2*) localizado en la región 5q33 asociados al desarrollo de asma. Además su expresión se encuentra incrementada en los linfocitos de personas homocigotas para un determinado haplotipo) (251).

El gen *IRAKM* (*IL-1 Receptor-Associated Kinase-M*) es un inhibidor de las rutas de TLR y IL-1R, localizado en la región candidata 12q13-24. Se han asociado varios SNP al asma (252). Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que se expresa notablemente en células epiteliales bronquiales, sugiriendo una posible relación entre el aumento de activación del sistema inmune innato y la inflamación crónica de las vías respiratorias (252).

1.2.3. Epigenética del asma

En las últimas décadas se ha producido un paulatino incremento de las enfermedades atópicas, tanto en frecuencia como en gravedad, principalmente en los países occidentalizados (253, 254), sin haberse esclarecido todavía las causas.

Hasta ahora hemos descrito la genética del asma como cambios en las bases del ADN que provocan la aparición de variantes que tienen una consecuencia sobre el riesgo de desarrollar una patología. No obstante, el efecto de estos polimorfismos por separado sobre el fenotipo de asma parece ser limitado, por lo que se han realizado estudios de haplotipos o diplotipos y epistasia (interacción génica entre diferentes genes para una determinada característica).

El incremento en las enfermedades atópicas ha tenido lugar en un período tan corto que parece poco probable que se deba únicamente a factores genéticos, que necesitan bastante más tiempo para asentarse en las poblaciones (255). En este sentido, en la última década se ha desarrollado el área de la epigenética que, según el Diccionario de la Lengua, se define como el estudio de la epigénesis, o cambios en un organismo a causa de alteraciones en la expresión de la información genética sin modificación génica.

La epigenética podría proporcionar el nexo entre el medio ambiente y la genética en el contexto de las enfermedades complejas. Son tres las razones que indican esta posibilidad (256). En primer lugar, las modificaciones epigenéticas influyen sobre el fenotipo. En este sentido, explicaría por ejemplo por qué los gemelos homocigotos presentan discordancias fenotípicas en el 25% de los casos, el fenómeno de la impronta (*imprinting*), los efectos del sexo o la distinta edad de comienzo de una enfermedad. En segundo lugar, las modificaciones epigenéticas se pueden heredar. Así, algunos cambios epigenéticos se pueden transmitir a lo largo de distintas divisiones celulares, como se ha descrito con el patrón de acetilación de las histonas en clones de células T humanas (257). Por último, los factores ambientales pueden inducir modificaciones epigenéticas, pudiendo ser el período embrionario y fetal el momento más crítico (por lo que las exposiciones maternas a algunos agentes

ambientales durante el embarazo podrían favorecer el desarrollo posterior de asma).

1.2.3.1. Mecanismos epigenéticos

Existen diversos mecanismos epigenéticos que implican cambios en la capacidad de transcripción de las secuencias del DNA. Los principales son la metilación del DNA y las modificaciones de las histonas, pero también existen otros procesos como los microRNA, los pequeños RNA de interferencia o los RNA no codificantes (258):

1) Metilación del DNA:

La metilación del DNA es la mejor conocida de las modificaciones epigenéticas y se produce en todas las células eucariotas. Consiste en la adición de un grupo metilo en la posición C5 de las citosinas de las islas de nucleótidos CpG. Esto se debe a la acción de unas enzimas denominadas metiltransferasas del DNA (DNMT). En el ser humano se han descrito cinco DNMT, implicadas en la metilación *de novo* o en el mantenimiento de la misma. Estas islas CpG se encuentran distribuidas por todo el genoma, pero son especialmente frecuentes en las regiones promotoras.

Cuando el DNA está metilado, se impide la unión de los factores de transcripción y se favorece la unión de proteínas que inhiben la transcripción (259). También afecta a la accesibilidad, que a su vez depende de la posición del nucleosoma y del desensamblado parcial de las histonas.

2) Modificación de las histonas:

En las células eucariotas el DNA se encuentra “empaquetado” por pequeñas proteínas básicas de 11-12Kd denominadas histonas, de las que existen cinco clases (H1 ligadora o de unión, H2A, H2B, H3 y H4 o nucleosomales). Cerca de un 20% de las histonas está constituido por lisina o arginina, aminoácidos que les confieren su carácter básico. A través de las cargas positivas de las cadenas laterales de estos aminoácidos las histonas se unen a los grupos fosfato del DNA, que están cargados negativamente. Dos

histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman un octámero; alrededor de él se enrolla dos veces una hebra de ADN, denominándose nucleosoma al complejo DNA-histona. El DNA se enrolla alrededor del núcleo de la histona formando unos bucles de unos 147 pares de bases para, a continuación, desplazarse unos 20-70 bp en un giro hacia la izquierda hasta alcanzar el siguiente nucleosoma. Este DNA de conexión se encuentra desprovisto de histonas. Por su parte, las histonas H1 actúan como pieza de cierre en cada nucleosoma y van uniéndolos. Se forma así la cromatina, que puede aparecer como heterocromatina o cromatina densa que es inactiva desde el punto de vista transcripcional o como eucromatina o cromatina abierta, capaz de ser transcrita.

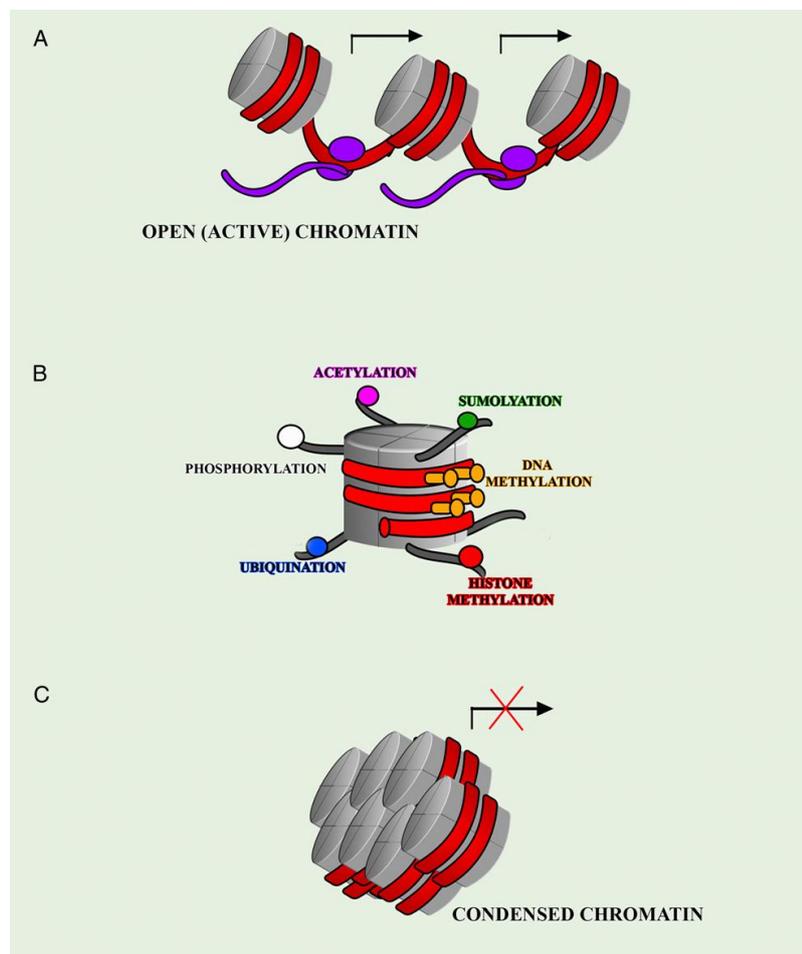


Ilustración 6. Esquema que muestra los principales mecanismos epigéticos, tomada de Martino y cols. (260).

Las histonas pueden sufrir diversos procesos enzimáticos, como metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitilaciones, sumoilaciones o ADP-ribosilaciones según se añadan grupos metil, acetil, fosforil, ubiquitil, sumoil o ADP-ribosil, respectivamente.

La más importante de ellas es la acetilación/desacetilación, llevada a cabo por acetiltransferasas de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC). En líneas generales, cuando las histonas están desacetiladas se inhibe la transcripción, mientras que cuando están acetiladas, se favorece. El conjunto de modificaciones postranscripcionales de las histonas se ha denominado código de histonas y de ello depende que la cromatina se encuentre abierta, y por tanto transcripcionalmente activa, o cerrada, y en consecuencia no accesible a la maquinaria de transcripción; en definitiva, que se puedan expresar o no los genes.

1.2.4. Farmacogenética del asma

Es frecuente en la práctica clínica que distintos pacientes con características clínicas similares respondan de forma diferente a un mismo tratamiento. Estas diferencias podrían deberse a factores ambientales o al cumplimiento del tratamiento, pero el avance del conocimiento del genoma ha llevado a pensar que una posible causa de dicha variabilidad podría deberse también a factores genéticos.

La farmacogenética es la disciplina que estudia cómo determinados factores genéticos afectan a la respuesta ante un determinado tratamiento. Se trata de una disciplina de aparición reciente que en un futuro podría ayudar a diseñar tratamientos individualizados en función de las características genéticas de los pacientes (261).

Analizaremos con mayor profundidad la farmacogenética de los principales tratamientos para el asma: β 2-agonistas, antileucotrienos y corticosteroides.

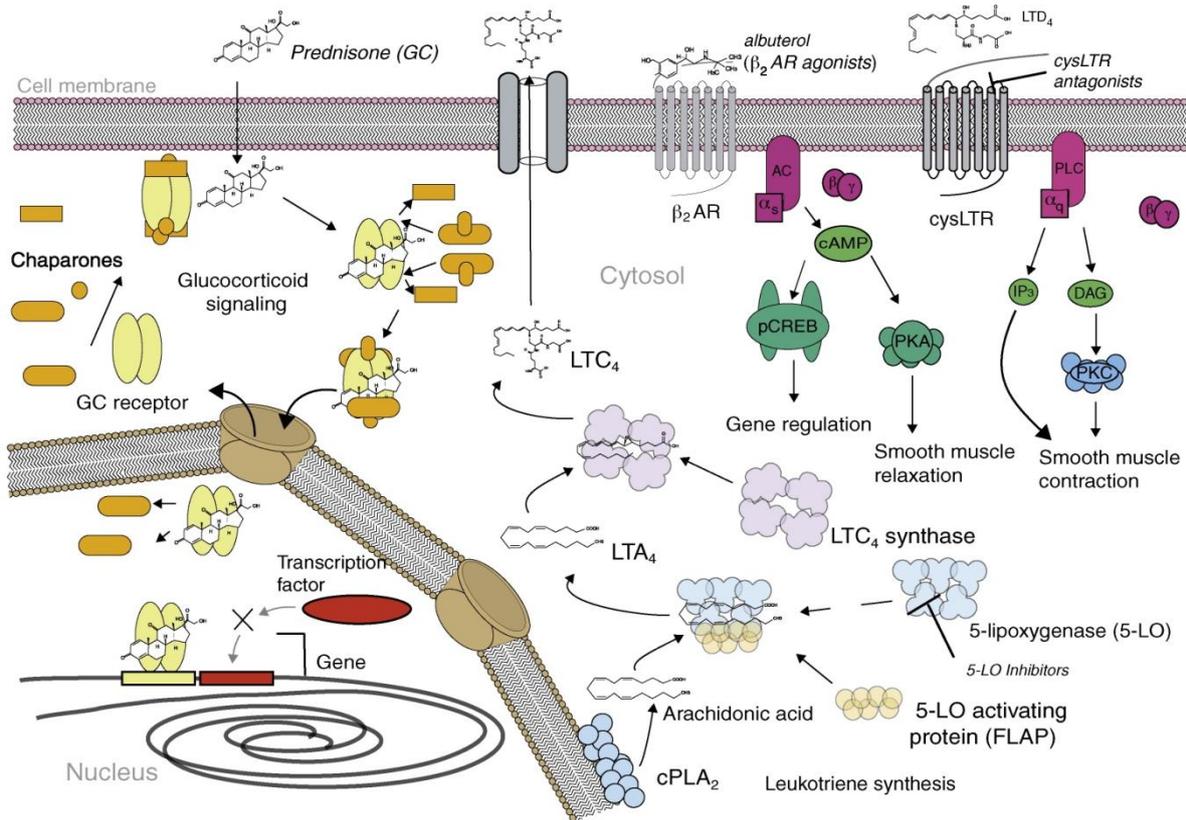


Ilustración 7. Esquema donde se muestra el mecanismo de acción de los principales tratamientos del asma. Tomado de Pascual y cols. (262).

1.2.4.1. β_2 -agonistas

Los broncodilatadores β_2 -agonistas actúan sobre receptores adrenérgicos presentes en la superficie de varias células inflamatorias y pulmonares, destacando las células del músculo liso bronquial.

El gen del receptor β_2 -adrenérgico humano (*ADRB2*) es uno de los que ha sido estudiado con mayor detenimiento. Es un gen pequeño localizado en la región cromosómica 5q32-34 que codifica una proteína de 413 aminoácidos, con función de receptor acoplado a proteína G para transmitir su señal. En un primer momento fueron descritos nueve SNP que resultaban en las variaciones no sinónimas en la secuencia de aminoácidos Gly16Arg, Gln27Glu, Val34Met y Thr164Ile (263), pero actualmente ya se han descrito hasta cuarenta y nueve SNP (264).

Estas variaciones han sido revisadas recientemente (265, 266), siendo Gly16Arg y Gln27Glu las que han sido más estudiadas y han demostrado mayor relevancia. Existen múltiples estudios *in vitro* y clínicos (algunos de ellos que se contradicen), pero lo que se ha encontrado con mayor frecuencia es que los sujetos homocigotos para alguna de estas variantes (que presentan arginina en la posición 16 o ácido glutámico en la posición 27) presentan una mayor y más rápida respuesta al uso de broncodilatadores de corta duración de forma aguda; pero cuando éstos son usados de forma regular o al utilizar broncodilatadores de larga duración presentan una peor respuesta al tratamiento.

1.2.4.2. Antileucotrienos

Los leucotrienos son moléculas derivadas del ácido araquidónico, liberadas por los eosinófilos, mastocitos y macrófagos alveolares durante la respuesta inmune, y actúan como uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en el asma. En su síntesis intervienen fundamentalmente tres enzimas: la 5-lipooxigenasa (ALOX5), la sintetasa de LTC₄ (LTC₄S) y la LTA₄ epoxi-hidrolasa (LTA₄H).

El lugar de acción de los antileucotrienos actuales es la inhibición de la enzima ALOX5 en el caso del Zileuton; o bloquear el receptor de membrana sobre el que actúan los leucotrienos cisteinílicos, CysLT1 (*Cysteinyl leukotriene receptor 1*) en el caso de montelukast, pranlukast o zafirlukast.

La farmacogenética de la vía de los leucotrienos ha sido revisada recientemente (267):

- Dos variaciones en ALOX5 (una de ellas localizada en el sitio de unión de SP1 a la región promotora), están asociadas a una menor actividad de esta enzima y, por tanto, su presencia tendría como consecuencia una menor respuesta al tratamiento con inhibidores de ALOX5 y con antagonistas del receptor CysLT1.
- Se han descrito SNP presentes en *CYSLTR1* (rs320995), que codifica el receptor CysLT1 y en *CYSLTR2* (Met201Val), que codifica el receptor

CysLT2. Ambas han sido asociadas con un aumento de susceptibilidad a padecer asma en al menos dos poblaciones independientes.

- El gen *LTC4S* que codifica la enzima del mismo nombre presenta un polimorfismo en su región promotora (-444A/C) que ha sido asociado a una mayor susceptibilidad a padecer asma, hipersensibilidad a AINE o una menor respuesta a los antagonistas de CysLT1 (268).

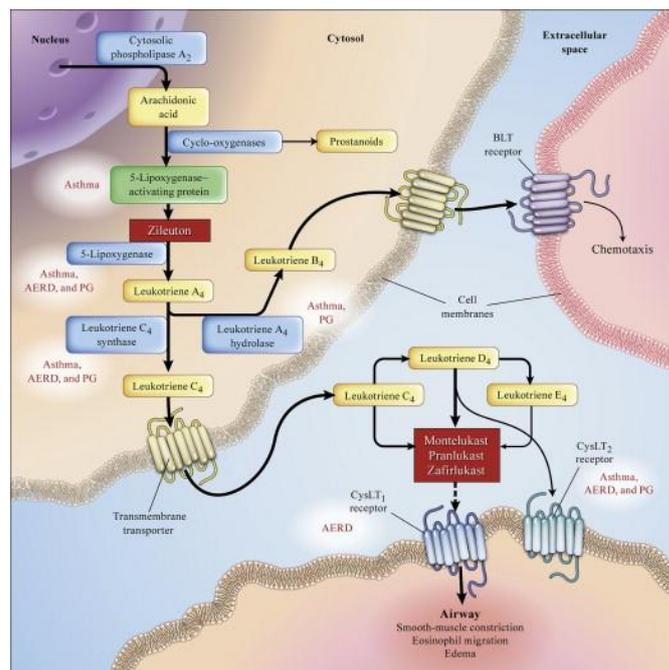


Ilustración 8. Esquema de la vía de los leucotrienos con el lugar de acción de cada fármaco y asociaciones farmacogenéticas encontradas, tomado de Tantisira y cols.(267).

1.2.4.3. Corticosteroides

Los corticosteroides han sido los primeros fármacos con efecto antiinflamatorio utilizados en el asma y la evidencia científica demuestra que el uso de corticosteroides inhalados mejora el control de la enfermedad y reduce su mortalidad. Ejercen su función modificando la transcripción de genes, inhibiendo la transcripción de genes pro-inflamatorios y activando la transcripción de genes que intervienen en la respuesta anti-inflamatoria.

Se han descrito polimorfismos en el gen *NR3C1* (que codifica los receptores para glucocorticoides GR α , GR γ y GR β). Uno de ellos (Asn363Ser) ha demostrado, en un estudio llevado a cabo en ancianos que padecían enfermedades crónicas, una mayor sensibilidad a los glucocorticoides administrados (269).

El gen *STIP1* codifica la fosfoproteína 1 inducida por estrés, que es una proteína adaptadora que media la asociación de las chaperonas moleculares HSC70 y HSP90 (*HSPCA* y *HSPCB*) en la vía de transmisión de señales de los corticosteroides. Varios polimorfismos descritos en este gen se han asociado a una respuesta variable del FEV1 en pacientes asmáticos tratados con glucocorticoides inhalados (270).

Varios polimorfismos del receptor *CRHR1* (*corticotropin-releasing hormone receptor 1*), que desempeña un papel fundamental en la síntesis endógena de los glucocorticoides, se han relacionado también con una mejor respuesta al tratamiento con corticosteroides inhalados en pacientes asmáticos (271).

Por último, el polimorfismo His33Glu en el gen *TBX21* (que codifica el factor de transcripción T-bet, esencial para la diferenciación de los linfocitos T hacia Th1) se ha relacionado con una mayor reducción de la hiperreactividad bronquial en los pacientes tratados con corticoides inhalados (196).

1.3. Filagrina

1.3.1. Proteína

La filagrina es una proteína clave en la diferenciación de la epidermis y en la formación del estrato córneo de la piel. Este estrato constituye la capa más externa de la piel, que previene la pérdida de agua por la epidermis e impide la entrada de alérgenos, sustancias químicas tóxicas y gérmenes (272).

Es una proteína de 324 aminoácidos y 37 kDa de masa molecular y corresponde al 6% del contenido proteico del estrato córneo de la epidermis.

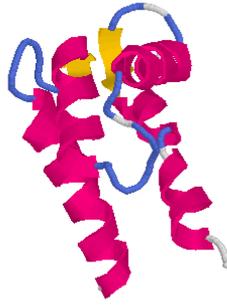


Ilustración 9. Estructura tridimensional de la filagrina.

Los prominentes gránulos queratohialinos que se ven con microscopía óptica en las capas granulosas de la epidermis externa están formados predominantemente por la poliproteína profilagrina, de 400 kDa. Esta proteína se encuentra notablemente fosforilada y está constituida por diversas repeticiones de filagrina separadas por un péptido de unión de 7-10 aminoácidos (273). Después de la diferenciación terminal de los queratinocitos para formar las escamas, la profilagrina es desfosforilada y escindida en 10-12 copias de filagrina (274, 275).

La filagrina tiene de la propiedad de agregar los filamentos de queratina, formando haces apretados del sistema del citoesqueleto, dando lugar a la densa matriz de proteínas y lípidos de la cubierta celular cornificada (276). Esta estructura colabora en el cambio desde la forma elíptica de los queratinocitos a su morfología aplanada, con los filamentos de queratina alineados de forma paralela a la superficie de la epidermis (272). Esta función de ayudar a la unión de los filamentos de queratina es la que le da a la filagrina su nombre, proveniente del inglés *filaggrin* (*FILament AGGregation proteIN*).

La unión de la filagrina con los filamentos intermedios de queratina se produce mediante uniones iónicas y/o puentes de hidrógeno. Los numerosos giros de la filagrina están positivamente cargados con residuos de arginina (Arg)

e histidina (His), y éstos interactúan formando puentes salinos con las numerosas cargas negativas de los dominos Rod de los filamentos de queratina, formando una estructura similar a una cremallera (277).

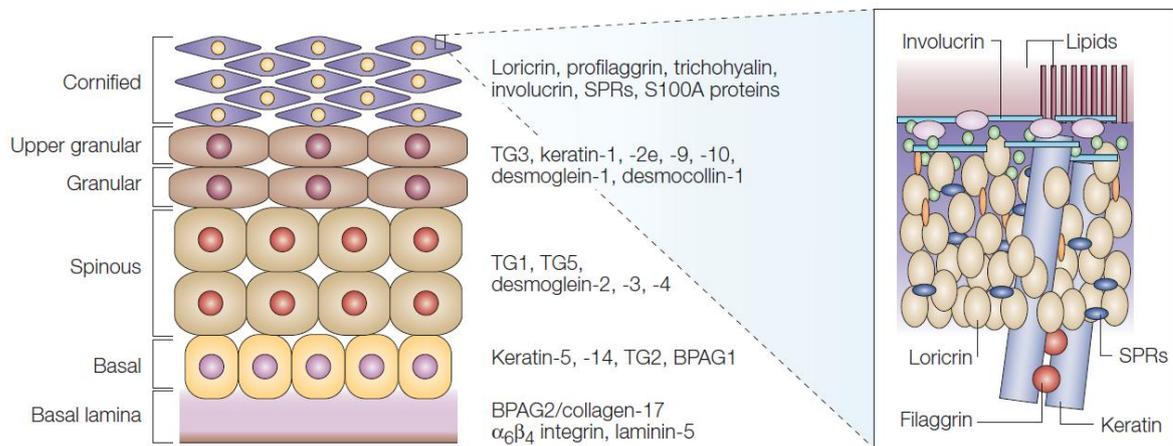


Ilustración 10. Esquema de la estructura de la piel y la relación entre sus distintas proteínas (272).

Los primeros 80 aminoácidos contienen dos motivos EF que forman un dominio funcional para unir iones calcio (278), similar al de otras proteínas pequeñas o proteasas. El motivo EF es un dominio estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se encuentra en una gran familia de proteínas de unión a calcio. Consta de dos hélices alfa situadas aproximadamente perpendiculares la una a la otra y unidas por una secuencia corta (por lo general alrededor de 12 aminoácidos) que normalmente se une a iones de calcio. Este dominio se puede encontrar en otras proteínas de la familia S-100 como la trichialina (THH), así como en la parvalbúmina, calmodulina o en la troponina-C.

La filagrina tiene una semivida de 6 horas en el estrato córneo, siendo degradada mayoritariamente en aminoácidos libres. Su alta concentración en aminoácidos hidrofílicos (en el rango de 100 mM) es esencial para la retención de agua y contribuye a la osmolaridad y, de ese modo, a la flexibilidad y textura del estrato córneo.

Se han realizado diversos estudios tomando biopsias de diferentes tejidos y se ha observado que la filagrina también se expresa en la mucosa oral y la lengua, así como en la mucosa nasal, donde se supone que contribuye también a la función de barrera (279, 280). Aunque en algunos estudios no ha podido ser detectada la expresión proteica en mucosa nasal (280), esofágica (280) ni bronquial (281), en estudios de expresión génica indexados en GeneCards® (<http://www.genecards.org>) se puede observar que sí se ha detectado expresión del gen *FLG* en pulmón (objetivado en 12 estudios de Microarray, 2 de RNAseq [Illumina Body Map]) y en epitelio bronquial (objetivado en 10 estudios de Microarray).

1.3.2. El Gen *FLG*

La profilagrina está codificada por el gen *FLG*, que se ubica en el brazo largo del cromosoma 1, concretamente en el locus 1q21.3:

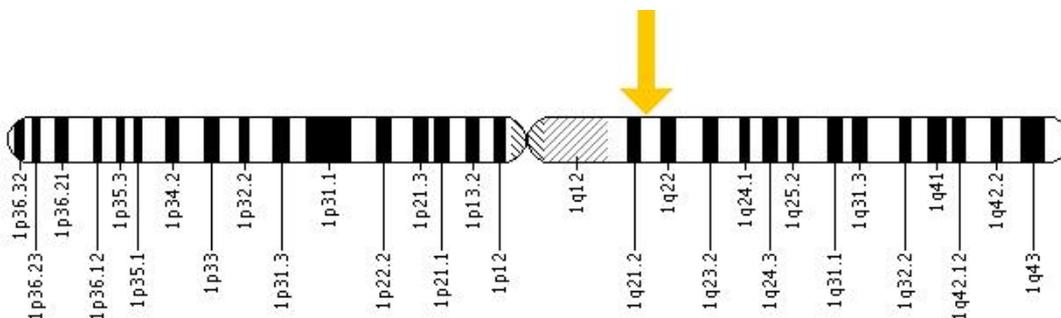


Ilustración 11. Esquema de la ubicación de la filagrina en el cromosoma 1 (flecha).

Está localizado en el denominado EDC (*Epidermal Differentiation Complex*, complejo de diferenciación epidérmica), que agrupa a un conjunto de más de 30 genes relacionados estructural y evolutivamente, y que codifican proteínas de la epidermis, como la filagrina, la loricrina o la involucrina, entre otras.

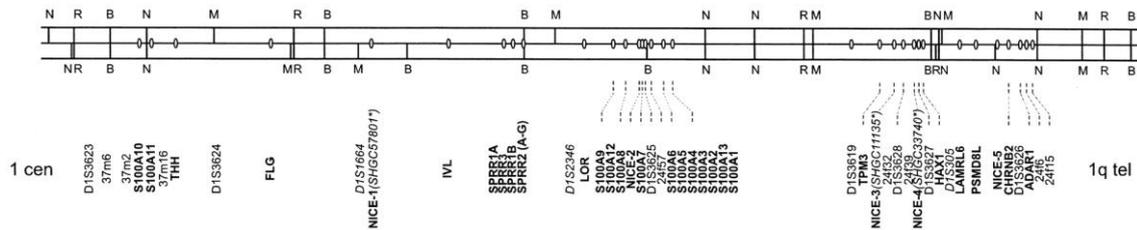


Ilustración 12. Esquema del *Epidermal Differentiation Complex* (EDC) adaptado de Marenholz y cols. (282), en el que se puede apreciar la localización del gen *FLG* en relación al complejo de diferenciación.

La estructura del gen fue descrita hace dos décadas por Gan y cols. (273); posteriormente Presland y cols. (283) profundizaron más en las características y funciones de sus exones.

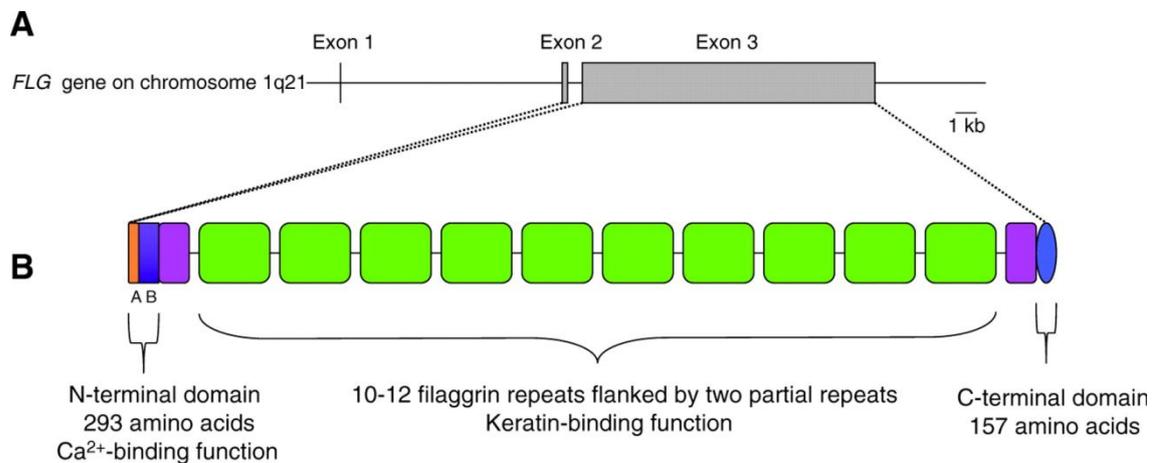


Ilustración 13. Esquema de la estructura del gen *FLG* (284).

Es un gen bastante largo, que está constituido por 3 exones: el primero contiene secuencias 5'UTR (15 pares de bases), el segundo contiene el codón de iniciación (159 pares de bases) y el tercero codifica la mayor parte del dominio N-terminal y las repeticiones de la filagrina (12,7 Kb). La parte inicial

codifica los motivos EF que forman el dominio de unión a iones calcio similar a otras proteínas de la familia S-100.

Contiene también 2 intrones: el primero, de 9-10 Kb, localizado en la región 5' no codificante y el segundo, de 570 pares de bases, situado entre los motivos EF. La posición del intrón 2 es idéntica a la de otros miembros de la familia de proteínas S-100.

1.3.3. Genética Molecular

En el gen de la filagrina se han descrito diversas mutaciones. Las mejor conocidas fueron descubiertas al estudiar pacientes con ictiosis vulgar. Esta enfermedad corresponde a la alteración hereditaria más frecuente de la queratinización. Está caracterizada por la presencia de escamas finas y blanquecinas, que predominan en el tronco y zonas de extensión de los miembros. La cara, el cuello y las flexuras corporales suelen estar respetadas. Muy a menudo se acompaña de hiperqueratosis folicular en las zonas de extensión de las extremidades, aumento de los pliegues e hiperqueratosis palmo-plantar. Suele mejorar en el verano y empeorar en el invierno. La intensidad de la descamación es muy variable y, en los casos leves, muchas veces el diagnóstico es consecuencia de un hallazgo en una exploración rutinaria o por otro motivo. La ictiosis vulgar no produce manifestaciones extracutáneas, pero es una asociación frecuente en pacientes con dermatitis atópica.

Diversos estudios apuntaban a que esta enfermedad estaba causada por un defecto en la expresión de la filagrina: mediante *immunoblot* (inmunotransferencia) se demostró que esta proteína estaba ausente o muy reducida en los pacientes que padecían esta enfermedad (285-287); posteriormente, se describió un descenso del mRNA de la profilagrina (288). Este hecho se corroboró utilizando modelos animales con ratones con modificaciones realizadas en el gen *FLG* (289).

Debido a las características del gen *FLG* (recordemos que es un gen muy largo y que incluye muchas repeticiones en su exón 3) no habían podido

describirse las alteraciones genéticas que eran responsables de este defecto en la expresión de filagrina. Un estudio más detallado llevado a cabo por Smith y cols. (290) describió 2 mutaciones en la primera repetición del exón 3:

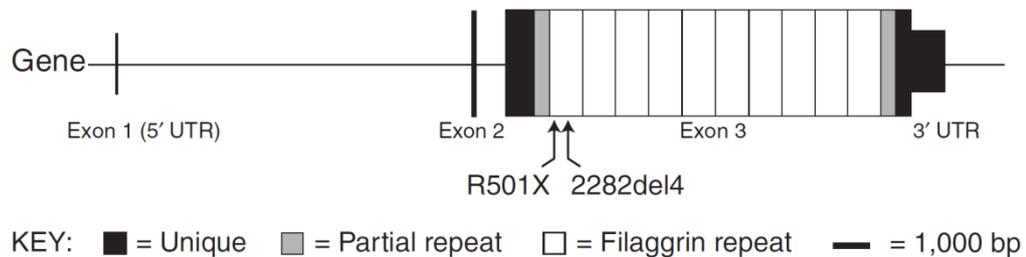


Ilustración 14. Esquema de la localización de las mutaciones (290).

R501X: La mutación R501X (rs61816761) consiste en una transición nucleotídica en la que se sustituye una citosina por una timina en la posición genómica 1501. Esto supone el cambio del codón CGA, que codifica el aminoácido arginina en posición 501, por el codón TGA, que supone un codón sin sentido o de terminación que acota el mensaje cifrado, deteniendo la transcripción. Se ha descrito que los sujetos homocigotos para esta mutación no presentan el epítipo conservado en los péptidos con repeticiones de filagrina. Sin embargo, estos pacientes presentan el epítipo del dominio N- terminal de la profilagrina, que está codificado por secuencias en sentido 5' de la repetición 1, aunque con una distribución anormalmente difusa. Esta pérdida de epítipos de la filagrina se ha confirmado en cultivos de queratinocitos, así como se ha confirmado la ausencia de filagrina procesada en biopsias de piel de pacientes homocigotos para esta mutación.

2282del4: La mutación 2282del4 consiste en la delección de 4 nucleótidos (citosina-adenina-guanina-timina) en la posición genómica 2282, lo que provoca un cambio en el marco de lectura a partir del codón 715. Se ha detectado que, en pacientes heterocigotos compuestos para esta mutación junto con la anterior, se observa la misma situación que en los pacientes homocigotos para R501X. Lo

que confirma que ambas mutaciones dan lugar a una pérdida de la producción de filagrina.

Funcionalmente, estos alelos se consideran alelos con efecto nulo, aunque se exprese un fragmento N-terminal enormemente truncado de la preproteína. Estos alelos nulos dan lugar a una pérdida de producción de filagrina que conlleva una alteración de la formación de la barrera epidérmica. Su herencia es semidominante, es decir, el gen dominante no domina totalmente sobre el gen recesivo y, por ello, en el fenotipo de los individuos heterocigotos se observan efectos del gen recesivo, el cual queda parcialmente enmascarado. Como resultado, los heterocigotos para alguna de las mutaciones no tienen ningún fenotipo discernible o tienen ictiosis leve, mientras que los homocigotos mutados y los heterocigotos compuestos (heterocigotos para las dos mutaciones) tienen una marcada ictiosis con un defecto histológico evidente de la barrera cutánea (290).

Smith y cols. (290) y posteriormente Palmer y cols. (291) han llevado a cabo estudios poblacionales para calcular la frecuencia alélica de estas mutaciones en sujetos sanos en población de origen europeo. Estos estudios han demostrado que estas mutaciones no son infrecuentes, presentando una frecuencia alélica de 0,029 en el caso de la mutación R501X y 0,016 en la mutación 2282del4.

Tabla 6. Frecuencias alélicas observadas en estudios poblacionales europeos (291).

Se indica la frecuencia del alelo mutado.

Población	R501X	2282del4
Irlandesa/Escocesa	0,028 (n=242)	0,010 (n=257)
Niños escoceses (Tayside)	0,030 (n=1008)	0,019 (n=1008)
Norteamericanos con orígenes europeos	0,024 (n=124)	0,011 (n=133)
Francesa	0,025 (n=158)	0,010 (n=155)
COMBINADA *	0,029 (n=1532)	0,016 (n=1553)

*Frecuencia combinada de la población caucásica obtenida de dichos estudios.

Los estudios poblacionales llevados a cabo en población no europea demuestran que estas mutaciones prácticamente no se detectan en poblaciones norte-africanas, chinas, japonesas o indias:

Tabla 7. Frecuencias alélicas observadas en estudios poblacionales no europeos (291). Se indica la frecuencia del alelo mutado.

Población	R501X	2282del4
Norte-africana	0,000 (n=124)	0,000 (n=121)
China	0,000 (n=47)	0,000 (n=49)
Japonesa	0,000 (n=35)	0,000 (n=35)
India	0,000 (n=83)	0,014 (n=111)

Posteriormente, se han descrito otras mutaciones asociadas fundamentalmente a la dermatitis atópica, pero R501X y 2282del4 continúan siendo un referente en todos los estudios que se llevan a cabo en distintas poblaciones o cuando se estudia la asociación a otras enfermedades.

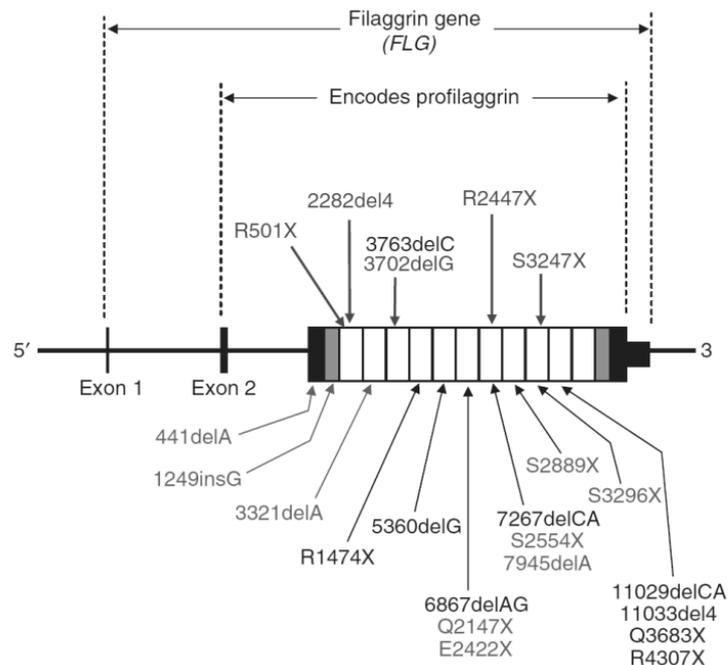


Ilustración 15. Esquema de la localización de las mutaciones descritas en el gen de la filagrina en diversos estudios posteriores (292).

1.3.4. Asociación de las mutaciones del gen *FLG* con la dermatitis atópica

A la vista de los resultados obtenidos en los que se asociaba la presencia de estas dos mutaciones con la ictiosis vulgar, se han llevado a cabo numerosos estudios que han demostrado con éxito la asociación de éstas con la dermatitis atópica. Estos estudios y las poblaciones analizadas se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Poblaciones en las que se han estudiado las mutaciones del gen de la filagrina y la presencia de dermatitis atópica.

	Población	Estudio
Diferencias significativas	Irlandesa	Palmer y cols. (291), Sandilands y cols. (293)
	Escocesa	Palmer y cols. (291), Lerbaek y cols. (294)
	Danesa	Palmer y cols. (291)
	Alemana	Weidinger y cols. (295-297), Stemmler y cols. (298), Ruether y cols. (299), Betz y cols. (300), Novak y cols. (301)
	Inglesa	Barker y cols. (302), Morar y cols. (303), Brown y cols. (304, 305), Henderson y cols. (306), Rice y cols. (307)
	Francesa	Hubiche y cols. (308)
	Italiana	Giardina y cols. (309)
	Sueca	Ekelund y cols. (310)
	Europea	Marenholz y cols. (311)
	Norteamericana	Rogers y cols. (312)
Sin diferencias significativas	Norteamericana	Howel y cols. (313)

El primero de ellos fue el de Palmer y cols., quienes estudiaron una pequeña cohorte formada por 52 pacientes pediátricos irlandeses que consultaron por dermatitis atópica diagnosticada por un dermatólogo (291). El grupo control estaba formado por 189 irlandeses anónimos y no seleccionados. Las variantes estaban sobrerrepresentadas en la cohorte con dermatitis atópica, con una frecuencia alélica combinada (que consiste en padecer una mutación

y/o la otra) de 0,33 (con respecto a un 0,042 del grupo control), lo que demostraba una asociación estadísticamente significativa: OR=13,4 (IC95%: 6,2-27,5) y $p < 0,001$.

En el mismo trabajo, los autores procedieron a tratar de confirmar esta asociación en un grupo mayor de pacientes procedente del estudio BREATHE, diseñado para evaluar asma, pero en el que aproximadamente el 50% de los pacientes tenía un antecedente de dermatitis atópica asociada al asma. De este estudio se obtuvieron 604 escolares y adolescentes escoceses y se compararon con 1008 escolares escoceses con un estado de enfermedad desconocido. Ambas variantes de filagrina se encontraban sobrerrepresentadas en la cohorte de asmáticos (frecuencia combinada de portadores del 15,7% frente al 9,6% del grupo control). También existieron diferencias significativas al analizar las mutaciones por separado.

En este mismo trabajo, los autores trataron de conseguir una replicación adicional de esta asociación en 372 niños daneses que habían sido seguidos prospectivamente desde la gestación en un estudio de cohortes que incluyó a madres danesas con asma (estudio COPSAC). Estas variantes también estaban sobrerrepresentadas en los niños que padecían dermatitis atópica (frecuencia combinada de portadores del 17,5% frente al 11% del grupo control, $p < 0,001$).

Weidinger y cols. (295) analizaron estas mutaciones en una cohorte de 476 familias alemanas, encontrando una diferencia significativa para la presencia de estas mutaciones y el padecer dermatitis atópica (OR 501X: 3,64; OR 2282del4: 2,43; combinado: 2,73 $p < 0,001$).

Barker y cols. (302) incluyeron a 163 pacientes y 1463 controles ingleses, encontrando también una OR elevada para la frecuencia combinada de portadores de estas mutaciones, en concreto de 7,7 (IC95%: 5,3-10,9) siendo también estadísticamente significativa al analizar las dos mutaciones de forma independiente.

Stemmler y cols. (298) trataron de replicar estos resultados utilizando 378 pacientes alemanes con dermatitis atópica y 700 controles procedentes también de la misma población. Encontraron también que estas mutaciones estaban

sobrerrepresentadas en los pacientes con dermatitis atópica, sobre todo en el subgrupo de pacientes en los que la enfermedad comenzó antes de los 2 años de edad ($p < 0,001$).

Marenholz y cols. (311) trataron de repetir esta asociación utilizando 2 poblaciones: 903 niños con dermatitis atópica procedentes de la cohorte GENUFAD, que había seguido a 490 familias de ascendencia europea (alemanes en su gran mayoría) y 189 pacientes con dermatitis atópica del estudio alemán MAS, que se compararon con 321 controles procedentes del mismo estudio. Al analizar los datos procedentes del estudio GENUFAD se encontraron diferencias significativas entre ambas mutaciones y la presencia de dermatitis atópica. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estudio MAS ($p < 0,001$).

Ruether y cols. (299) incluyeron a 272 pacientes con dermatitis atópica y 276 controles sanos, todos procedentes del norte de Alemania y encontraron una OR elevada para alguna de las mutaciones, en concreto de 7,1 (IC95%: 3,41-14,78). De nuevo Weidinger y cols. (296), en otro estudio, incluyeron 274 pacientes afectados de dermatitis atópica y 252 sujetos sanos de origen alemán. Encontraron una asociación estadísticamente significativa con el hecho de padecer dermatitis atópica ($p < 0,001$), niveles séricos más elevados de IgE ($p < 0,05$), inicio temprano de la enfermedad ($p < 0,001$) y niveles de SCORAD ($p < 0,001$).

Morar y cols. (303) reclutaron 426 familias inglesas con 990 niños, de los que 657 tenían dermatitis atópica. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el genotipo combinado, así como para R501X y 2282del4. También se encontraron diferencias significativas con la atopía ($p < 0,001$).

Sandilands y cols. (293) analizaron estas dos mutaciones en 188 niños irlandeses afectados de dermatitis atópica y en 736 sujetos sanos, encontrando diferencias estadísticamente significativas para ambas mutaciones. Además, ampliaron el estudio analizando varias mutaciones más que habían sido descritas recientemente y encontraron diferencias significativas para R2447X (OR 14,19 con IC95% 2,92-68,90) y S3247X (OR 2,8 con IC95% 1,28-6,13 y $p < 0,05$) pero no para 3702delG.

Howel y cols. (313) trataron de replicar estos estudios en población norteamericana, incluyendo 30 pacientes con dermatitis atópica (17 euroamericanos, 12 afroamericanos y 1 hispano) y 39 controles sanos (27 euroamericanos, 11 afroamericanos y 1 con origen asiático). No encontraron ningún sujeto que presentara la mutación R501X y solamente encontraron 3 pacientes con dermatitis atópica y 2 controles que eran heterocigotos para 2282del4, todos procedentes del sub-grupo euroamericano ($p=0,36$).

Betz y cols. (300) diseñaron un estudio para evaluar la asociación de estas mutaciones con la alopecia en población alemana. Analizaron los 145 pacientes con dermatitis atópica que estaban incluidos en su estudio y encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas mutaciones.

Lerbaek y cols. (294) y Novak y cols. (301) diseñaron dos estudios para evaluar la asociación de estas mutaciones con el eczema de manos o dermatitis alérgica de contacto (en población danesa) y la dermatitis alérgica de contacto (en población alemana) respectivamente. Analizaron los 26 y 56 pacientes con dermatitis atópica que estaban incluidos en sus estudios y encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas mutaciones.

Hubiche y cols. (308) trasladaron los resultados obtenidos por todos los estudios a la población francesa, incluyendo a 99 pacientes con dermatitis atópica y 102 controles sanos, encontrando diferencias significativas para R501X ($p<0,05$) y 2282del4 ($p<0,001$).

Giardina y cols. (309) analizó 178 pacientes italianos con dermatitis atópica y 210 controles sanos sin hallar diferencias estadísticamente significativas, encontrando unas frecuencias alélicas muy inferiores a las descritas en otros trabajos: R501X presentaba unas frecuencias alélicas de 0,6% en el grupo de dermatitis atópica y 0,0% en el grupo control y 2282del4 0,9% y 0,5%, respectivamente.

Rogers y cols. (312) diseñaron un estudio utilizando a los participantes del estudio multicéntrico norteamericano CAMP, diseñado para investigar los efectos a largo plazo del tratamiento con corticoides inhalados en niños asmáticos. De todos los participantes, 185 padecían dermatitis atópica y, al analizar la

presencia de estas mutaciones, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas mutaciones analizadas de forma independiente, así como para el genotipo combinado.

Brown y cols. (304) utilizaron una cohorte de 7.737 recién nacidos de Inglaterra (a los que se les extrajo sangre al nacimiento entre 1996 y 2003) y de los que, finalmente, se estudiaron 789 niños entre 7 y 9 años: 190 presentaban dermatitis atópica y los 599 restantes formaron el grupo control. Estos autores no encontraron diferencias significativas en los sujetos que portaban una copia de una de las mutaciones, pero sí para los que portaban 2 copias de las mutaciones (homocigotos para una de las mutaciones o heterocigotos para dos de las cinco mutaciones analizadas), con una OR de 26,9 (IC95%: 3,3-217,1 y $p < 0,05$).

Ekelund y cols. (310) utilizaron para el estudio una cohorte de 406 familias suecas (formadas por 1.514 personas, de los que 921 eran descendientes con eczema: 588 con dermatitis atópica y 333 con eczema no atópico). Encontraron que ambas mutaciones eran más frecuentes en los sujetos que padecían dermatitis atópica, pero no en los sujetos que padecían eczema no atópico. Existieron diferencias significativas para R501X y 2282del4 ($p < 0,001$), así como para el genotipo combinado. Además los pacientes portadores de estas mutaciones padecían una dermatitis atópica más grave ($p < 0,001$).

De nuevo Brown y cols. (305) diseñaron otro estudio en el que incluyeron 186 adultos ingleses con dermatitis atópica que habían sido diagnosticados en la infancia y 1035 controles. Se analizaron 6 mutaciones que habían sido descritas en estudios anteriores. Encontraron diferencias estadísticamente significativas para R501X, 2282del4 y R2447X, así como para el genotipo combinado ($p < 0,001$). No demostraron diferencias significativas para las mutaciones S3247X, 3702delG y 3673delC.

Henderson y cols. (306) reclutaron 6971 niños ingleses procedentes de la cohorte longitudinal de nacimiento ALSPAC (en la que se incluyeron 14.062 niños nacidos entre 1991 y 1992). Encontraron diferencias significativas en los 4.764 niños que padecían dermatitis atópica, portadores de una copia de las dos mutaciones clásicas del gen de la filagrina o dos copias (heterocigotos para las dos u homocigotos para una). Además, estos autores encontraron que estas

mutaciones eran más frecuentes en los niños que padecían dermatitis atópica persistente.

Rice y cols. (307) incluyeron a 5.432 adultos ingleses (procedentes del estudio ELSA en el que se siguieron a 9.432 adultos mayores de 50 años del 2001 al 2004). Encontraron diferencias significativas en los pacientes portadores de alguna de las dos mutaciones clásicas y la presencia de eczema, así como la presencia de piel seca.

De nuevo Weidinger y cols. (297) en otro estudio incluyeron 3.099 niños alemanes (procedentes del estudio ISAAC II) y analizaron 5 mutaciones del gen *FLG* (R501X, 2282del4, R2447X, S3247X y 3702delG). Encontraron diferencias significativas entre el genotipo combinado y la presencia de dermatitis atópica o eczema no atópico ($p < 0,001$).

1.3.5. Asociación de las mutaciones del gen *FLG* con el asma

Varios de los estudios diseñados para el análisis de la relación entre la dermatitis atópica y las mutaciones antedichas incluían sujetos que habían sido diagnosticados de asma. Por ello, a pesar de no haber sido diseñados con ese objetivo, en estos trabajos se pueden encontrar las primeras pinceladas de la relación entre el asma y estas mutaciones. Se puede encontrar en muchos de ellos una tendencia que sugería la predisposición a padecer asma, pero al analizar por separado los pacientes asmáticos que además tenían dermatitis atópica y los que no la padecían esta tendencia parecía disminuir.

En la siguiente tabla se trata de resumir los resultados obtenidos en estos estudios al analizar pacientes asmáticos que padecen también dermatitis atópica:

Tabla 9. Resultado de los estudios al analizar asma con dermatitis atópica.

Estudio	OR	I.C.95%
Palmer y cols. (291) (pacientes procedentes del estudio BREATHE)	2,89 *	2,04 – 4,11
Palmer y cols. (291) (pacientes procedentes del estudio COPSAC)	2,78	0,92 – 8,42
Weidinger y cols. (295)	3,40 *	1,68 – 6,88
Marenholz y cols. (311) (pacientes procedentes del estudio MAS)	6,21 *	2,60 – 14,80
Marenholz y cols. (311) (pacientes procedentes del estudio GENUFAD)	2,79 *	1,65 – 4,71
Weidinger y cols. (296)	5,69 *	2,76 – 11,73
Morar y cols. (303)	1,52 *	1,13 – 2,05
Betz y cols. (300)	4,63 *	2,30 – 9,35
Hubiche y cols. (308)	p>0,05	
Ekelund y cols. (310)	3,58 *	1,99 – 6,42
Brown y cols. (305)	1,5	0,8 – 2,8
Henderson y cols. (306)	3,42 *	2,38 – 4,90
Rice y cols. (307)	1,69 *	1,14 – 2,49

(* p<0,05)

La siguiente tabla hace referencia a los estudios en los que se analizan sujetos asmáticos que no padecían dermatitis atópica:

Tabla 10. Resultado de los estudios al analizar asma sin dermatitis atópica.

Estudio	OR	I.C.95%
Palmer y cols. (291) (pacientes procedentes del estudio BREATHE)	0,80	0,50 – 1,30
Marenholz y cols. (311) (pacientes procedentes del estudio MAS)	2,47 *	1,10 – 5,80
Henderson y cols. (306)	0,79	0,45 – 1,41
Rice y cols. (307)	1,19	0,90 – 1,57

(* p<0,05)

Posteriormente, se han llevado a cabo otros estudios en los que se ha profundizado más en la posible asociación de estas mutaciones con el asma.

Rogers y cols. (312) diseñaron un estudio utilizando a los participantes del estudio multicéntrico norteamericano CAMP, dirigido a investigar los efectos a largo plazo del tratamiento con corticoides inhalados en niños asmáticos. No encontraron una relación significativa entre estas mutaciones y el hecho de que los pacientes padecieran asma (independientemente de si padecían eczema o no). Tampoco encontraron diferencias en el FEV1, cociente FEV1/FVC, porcentaje de mejoría de FEV1 en la prueba broncodilatadora o PC₂₀ de la prueba de metacolina.

Palmer y cols. (314) fueron los primeros en analizar de forma más concienzuda a 874 pacientes asmáticos [procedentes del estudio BREATHE que estudiaba el asma infantil y del que ya habían obtenido pacientes con dermatitis atópica en su anterior publicación(291)]. Los autores encontraron que los sujetos con el genotipo combinado o que presentaban la mutación 2282del4 tenían un menor cociente FEV1/FVC. Además, los pacientes con el genotipo combinado o que presentaban la mutación R501X requerían tratamiento con escalones superiores de tratamiento de la Sociedad Británica de Tórax (*British Thoracic Society* o BTS). La diferencia en este marcador de gravedad desaparecía al analizar por separado pacientes asmáticos con eczema (OR 1,58 con IC95% 1,01-2,46 y p=0,043) y pacientes asmáticos sin eczema (OR 1,93 con IC95% 0,94-3,95 y p=0,74). También describieron que los pacientes portadores de estas mutaciones requerían mayor uso de medicación de rescate independientemente de padecer eczema (OR ajustado 1,65 con IC95% 1,11-2,47 y p=0,014).

Basu y cols. (315) continuaron el trabajo anterior incluyendo a más participantes del estudio BREATHE llegando a enrolar a 1.135 participantes. Observaron que estas mutaciones eran más frecuentes solamente en los pacientes asmáticos que asociaban eczema. Además, encontraron un mayor número de exacerbaciones en los pacientes que presentaban la mutación R501X (OR 1,97, con IC95% 1,20-3,23 y p=0,009) o el genotipo combinado (OR 1,61 con IC95% 1,08-2,40 y p=0,021). Los pacientes portadores de la mutación R501X tenían mayor frecuencia de absentismo escolar (OR 1,71 con IC95%

1,04-2,83 y $p=0,041$). Además, los portadores de R501X precisaban un mayor uso de corticoides orales (OR 1,89 con IC95% 1,11-3,22 y $p=0,021$) al igual que los portadores del genotipo combinado (OR 1,71, con IC95% 1,10-2,65 y $p=0,025$). No existieron diferencias significativas al analizar las hospitalizaciones por asma.

Weidinger y cols. (297) incluyeron 3.099 niños alemanes (procedentes del estudio ISAAC II) y analizaron 5 mutaciones del gen *FLG* (R501X, 2282del4, R2447X, S3247X y 3702delG). En esta muestra había 272 niños diagnosticados de asma y 124 de asma alérgica. Encontraron una mayor frecuencia del genotipo combinado en los pacientes que padecían asma (OR 1,79 con IC95% 1,19-2,68 y $p=0,0048$) y asma con eczema asociado (OR 3,49 con IC95% 2,00-6,08 y $p<0,001$), pero no en los que padecían asma alérgica. Al ajustar por diagnóstico de eczema o de dermatitis atópica observaron que no existían diferencias significativas en ninguno de los grupos de pacientes asmáticos.

Marenholz y cols. (316) incluyeron 871 personas [procedentes del estudio MAS del que ya habían obtenido pacientes con dermatitis atópica en su anterior publicación(311)], de las que 168 padecían asma. Encontraron una asociación estadística entre estas mutaciones y el asma (OR 2,1 con IC95% 1,2-3,5 y $p=0,0068$). Esta relación se mantenía en los pacientes que padecían además eczema, pero no en los que no lo padecían. Además, al tratarse de una cohorte longitudinal de nacimiento estimaron que el valor predictivo positivo (VPP) de padecer asma presentando estas mutaciones era del 31,0% y el valor predictivo negativo (VPN), del 83,9%. Estos valores predictivos cambiaban al 45,9% y 71,9%, respectivamente, en los pacientes que, además, padecían dermatitis atópica.

Müller y cols. (317) utilizaron pacientes procedentes del estudio ETAC (ensayo clínico doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo constituido por 795 niños europeos y canadienses que habían sido diagnosticados de eczema en los dos primeros años de vida en el que se trataba de evaluar la eficacia del tratamiento con cetirizina en la prevención del asma). Se analizaron las muestras de 596 pacientes y de 488 padres. Encontraron que los pacientes con asma presentaban más frecuentemente las mutaciones R501X, 2282del4,

así como el genotipo combinado ($p < 0,0001$). No encontraron diferencias significativas al analizar si la transmisión había sido paterna o materna.

Schuttelaar y cols. (318) incluyeron 934 pacientes (procedentes de la cohorte longitudinal de nacimiento PIAMA en la que se evaluaba la prevalencia e incidencia de asma y de alergia a los ácaros del polvo en 4.146 niños neerlandeses). Encontraron una asociación estadística entre estas mutaciones y la presencia de asma (OR 3,7 con IC95% 1,8-7,5 y $p < 0,0013$). Esta asociación se mantenía en los pacientes que habían presentado eczema en el primer año de vida (OR 3,2 con IC95% 1,2-8,5 y $p = 0,02$) pero no en los que no lo han padecido.

Osawa y cols. (319) analizaron 8 mutaciones del gen *FLG* frecuentes en la población japonesa (R501X, 3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X y K4022X) en 137 pacientes asmáticos japoneses, 172 pacientes con dermatitis atópica (de los que 73 padecían además asma) y 134 controles japoneses sanos. No encontraron diferencias significativas en los pacientes que padecían asma, pero sí en los asmáticos que padecían, además, dermatitis atópica (OR 9,74 con IC95% 3,47-27,32).

Poninska y cols. (320) incluyeron 414 pacientes asmáticos (procedentes del estudio polaco ECAP) y 1865 sujetos sanos. Encontraron que estas mutaciones eran más frecuentes en los pacientes asmáticos (OR 1,70 con IC95% 1,07-2,69 y $p = 0,024$) independientemente de que padecieran o no dermatitis atópica. Al analizar por separado los dos fenotipos de asma encontraron diferencias significativas en los pacientes que presentan asma alérgica (OR 2,22 con IC95% 1,24-3,96 y $p = 0,006$), pero no en los que padecían asma intrínseca.

Como punto común a todos estos estudios podemos destacar que se encuentra una asociación estadística entre las mutaciones del gen de la filagrina y la presencia de asma, pero ésta parece disminuir al analizar los pacientes asmáticos que no padecen o han padecido dermatitis atópica. Esto podría deberse a que los pacientes incluidos proceden de estudios diseñados para otros fines o porque la dermatitis atópica esté actuando como un factor de confusión. Solamente el estudio de Poninska y cols. (320) permite, por su

diseño, la comparación de los fenotipos de asma alérgica e intrínseca, encontrando diferencias significativas en el asma alérgica pero no en la intrínseca.

1.3.6. Asociación de las mutaciones del gen *FLG* con la rinitis alérgica

Varios estudios diseñados para estudiar la asociación de estas mutaciones con la dermatitis atópica han incluido y analizado la posible relación con la rinitis alérgica (independientemente de la presencia de eczema).

Cabe destacar los estudios de Marenholz y cols. (311) y Ekelund y cols. (310), en los que se observaron diferencias significativas en los pacientes que tenían rinitis y eczema asociado (pero no en las personas que padecían rinitis sin eczema).

Por el contrario Weidinger y cols. (297) llegaron a la conclusión de que estas mutaciones estaban sobrerrepresentadas en los pacientes que padecían rinitis alérgica independientemente de si padecían eczema (OR 2,0 con IC95%: 1,1-3,2 y $p=0,028$) o no lo padecían (OR 2,5 con IC95%: 1,4-4,3 y $p=0,0015$).

Sin embargo, Schuttelaar y cols. (318) no encontraron una asociación estadística entre la rinitis alérgica y estas mutaciones.

1.3.7. Asociación de las mutaciones del gen *FLG* con sensibilización a alérgenos

Varios estudios diseñados para estudiar la asociación de estas mutaciones con la dermatitis atópica han analizado la posible relación de estas mutaciones con la sensibilización a alérgenos (ver Tabla 11).

Tabla 11. Resultado de los estudios al analizar sensibilización a alérgenos.

Estudio	Alérgenos estudiados	OR	IC95%
Weidinger y cols. (295)	Polen de gramíneas, polen de abedul, epitelio de gato y ácaros del polvo	3,04 *	1,95-4,73
Marenholz y cols. (311) (pacientes procedentes del estudio MAS)	12 aeroalérgenos (no especificados)	1,41	0,70-2,80
Marenholz y cols. (311) (pacientes procedentes del estudio GENUFAD)	Aeroalérgenos (no especificados)	2,49 *	1,86-3,34
Morar y cols. (303)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , polen de <i>Phleum pratense</i> , <i>Alternaria alternata</i> , epitelio de gato, clara de huevo y leche de vaca	1,51 *	1,16-1,95
Weidinger y cols. (297)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , epitelio de gato, mezcla de polen de gramíneas y mezcla de polen de árboles	1,61 *	1,20-2,17
Schuttelaar y cols. (318)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , epitelio de gato, epitelio de perro, polen de abedul, polen de <i>Dactylis glomerata</i> , huevo y leche de vaca.	1,2	0,7-2,0

(* p<0,05)

1.3.8. Asociación de las mutaciones del gen *FLG* con otras enfermedades cutáneas

Se ha tratado de asociar las mutaciones anteriormente descritas con diversas enfermedades dermatológicas asociadas, en ocasiones, a dermatitis atópica.

1.3.8.1. Psoriasis

Se ha descrito que la expresión de filagrina se encuentra disminuida en las lesiones de psoriasis pero que se expresa de forma normal en la piel sana de

pacientes que padecen psoriasis (321). No obstante, se han llevado a cabo varios estudios en población alemana (322, 323), inglesa (324) e italiana (309). Ninguno de ellos ha logrado establecer una relación entre estas mutaciones y la presencia de psoriasis (incluyendo en los estudios distintos tipos de psoriasis) o artritis psoriásica.

1.3.8.2. Dermatitis alérgica de contacto

Los resultados de los estudios que han tratado de demostrar la asociación entre la dermatitis alérgica de contacto y éstas mutaciones no son concluyentes y no muestran una asociación clara (294, 301, 325, 326).

Por el contrario sí se ha encontrado una asociación en varios estudios entre la sensibilización al níquel y estas mutaciones (301, 326, 327). Se ha descrito que esta asociación puede existir solamente o ser más fuerte en mujeres que llevan pendientes (326, 327), debido a que la exposición es mucho mayor y mucho más sensibilizante al romper la barrera epidérmica utilizando pendientes. También se cree que la alta prevalencia de sensibilización a níquel en la población general y en la población estudiada puede actuar como factor de confusión en esta asociación estadística encontrada (326, 327).

1.3.8.3. Eczema crónico de manos

En varios estudios llevados a cabo con otros fines se ha tratado de encontrar una asociación estadística entre el eczema crónico de manos y estas mutaciones (294, 325, 328). Los resultados no son concluyentes, pero sí parece haber una asociación en el caso del eczema irritativo de contacto (325).

1.3.8.4. Alopecia areata

Se ha llevado a cabo un estudio en población alemana (300) que no ha logrado demostrar una mayor frecuencia de estas mutaciones en pacientes que padecen alopecia areata.



2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

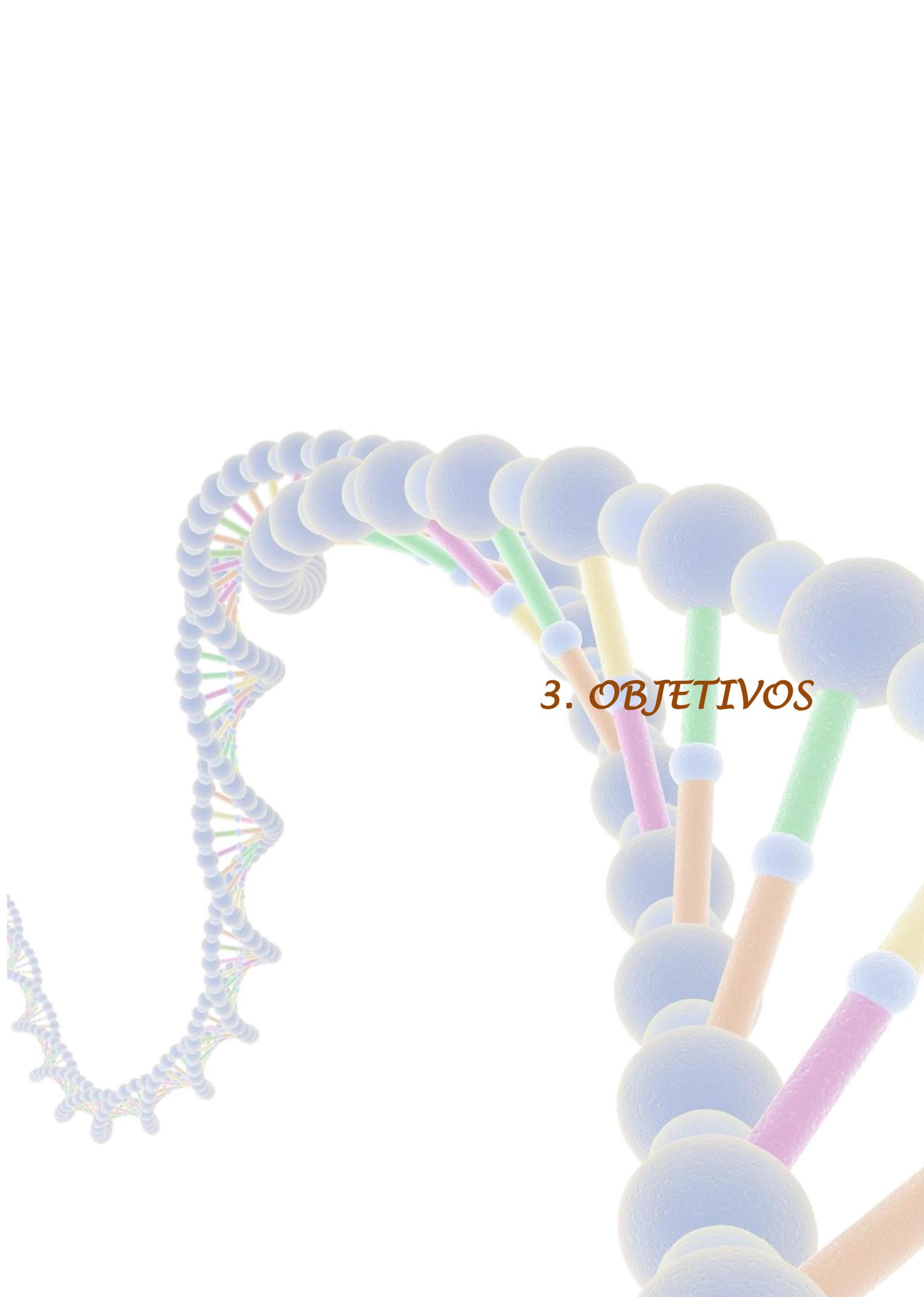
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La teoría de la marcha atópica sugiere que los niños con predisposición atópica puedan padecer diversas enfermedades como la dermatitis atópica, el asma o la rinitis y puedan sensibilizarse a diversos alérgenos. En el caso de la sensibilización a aeroalérgenos ésta puede manifestarse como rinoconjuntivitis alérgica y, en una proporción de sujetos, como asma. Las mutaciones del gen de la filagrina han demostrado gran importancia en la ictiosis vulgar y en la dermatitis atópica pero no está clara su relación con el asma. Existe una gran controversia sobre la posible asociación con el asma y no se sabe si la asociación detectada en algunos estudios se debe a la propia presencia de asma o a la influencia del eczema o dermatitis atópica en los sujetos que tienen asma asociado a estas enfermedades dermatológicas.

Por otro lado la presencia de dos mutaciones con repercusión clínica, relativamente próximas en el genoma podría hacer pensar en la posible existencia de otras variantes génicas no identificadas previamente que pudieran influir en la asociación clínica.

La hipótesis principal de nuestro estudio es que la asociación identificada en algunos estudios en relación con el asma puede no ser debida directamente a esta enfermedad sino a alguno de los fenotipos asociados.

La hipótesis secundaria es que podrían existir otras variantes génicas en esa región, responsables de la asociación con alguna de las características clínico-biológicas de los pacientes con asma.



3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

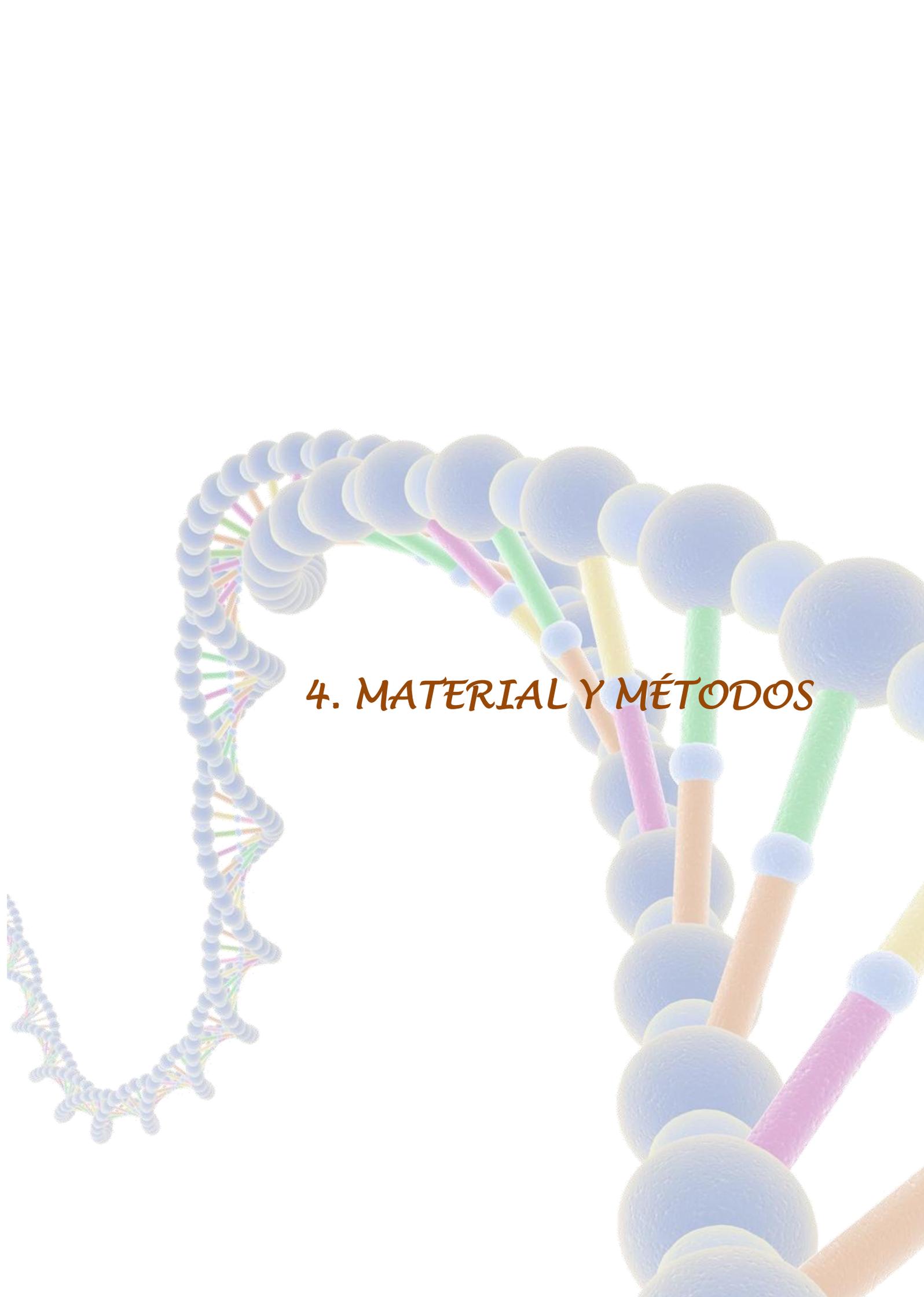
1. Descripción de las características clínico-biológicas de una población de pacientes con asma alérgica y no alérgica, evaluados en un Servicio de Alergología para disponer de una exhaustiva caracterización poblacional que permita identificar posibles sesgos de asociación génica.

2. Análisis de la región cromosómica que incluye las mutaciones R501X y 2282del4 del gen *FLG* en nuestra población, para identificar posibles variantes génicas.

3. Análisis de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de las variantes génicas de nuestro estudio.

4. Estudio de la posible asociación de las variantes génicas con las variables clínico-biológicas de nuestra población.

5. Identificación de posibles marcadores en los pacientes afectados según los distintos fenotipos de asma alérgica e intrínseca, en nuestra población.



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha desarrollado en el Servicio de Alergia del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza y en el Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

4.1. Población estudiada

Todos los sujetos incluidos en el estudio eran mayores de edad y otorgaron su conformidad, firmando un consentimiento informado aprobado por el I.A.C.S. (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud) y su Comité Ético, donde se explicaba detalladamente en qué consistía el estudio.

4.1.1. Grupo Atópico

Se incluyeron de modo consecutivo 150 pacientes españoles de origen caucásico que fueron diagnosticados de asma alérgica o que acudían a revisión por ese mismo motivo. Los criterios utilizados para realizar el diagnóstico fueron criterios de la *Global Initiative for Asthma* (GINA) (1):

- Historia clínica compatible con asma.
- Prueba de función pulmonar que demostrase una prueba broncodilatadora con un aumento $\geq 12\%$ en el FEV1 y ≥ 200 ml, después de la administración de un broncodilatador.
- En aquellos pacientes con sintomatología sugestiva de asma, pero con pruebas de función pulmonar normales se realizaron pruebas de hiperreactividad bronquial con metacolina o prueba de ejercicio para establecer el diagnóstico de asma.

Para ser diagnosticados de asma alérgica debían presentar además pruebas cutáneas positivas frente a algún aeroalérgeno de la batería estándar y

una historia clínica compatible con asma alérgica en la que concordase la sensibilización con la clínica que presentaba el paciente.

4.1.2. Grupo Intrínseco

Se incluyeron de modo consecutivo 150 pacientes españoles de origen caucásico que fueron diagnosticados de asma no alérgica o que acudían a revisión por ese mismo motivo.

Para ser diagnosticados de asma no alérgica debían cumplir los criterios de la *Global Initiative for Asthma* (GINA) (1) anteriormente descritos y presentar pruebas cutáneas negativas frente a la batería estándar de aeroalérgenos.

4.1.3. Grupo Control

El Grupo Control estaba constituido por 100 sujetos españoles de origen caucásico que cumplían los siguientes criterios:

- Ausencia de síntomas y antecedentes de asma.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de otras enfermedades respiratorias.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de alergia.
- Pruebas cutáneas negativas frente a una batería de aeroalérgenos comunes en nuestro medio.
- Ausencia de antecedentes familiares de asma, de rinitis persistente y de atopia.

4.2. Variables analizadas

Mediante un cuestionario (Anexo 1) se evaluó la presencia de:

- Antecedentes familiares de atopia.

- Antecedentes personales de dermatitis atópica, dermatitis de contacto, alergia alimentaria, alergia medicamentosa, hipersensibilidad a AINE, psoriasis o ictiosis vulgar.
- Presencia de rinitis y valoración de su intensidad según la guía ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) (329, 330) y EPOS (*European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps*) (331).
- Antecedentes personales de poliposis nasal y/o anosmia.
- Antecedentes personales de asma ocupacional o asma empeorada en el puesto de trabajo.

4.2.1. Valores de la espirometría forzada y de la prueba broncodilatadora

Se realizó una espirometría basal a todos los pacientes en el momento de la inclusión.

Las espirometrías se realizaron mediante un espirómetro Jaeger Masterscope-PC (VIASYS Healthcare GmbH, Hoechberg, Alemania) utilizando el software LABManager versión 5.3.0.4 (VIASYS Healthcare GmbH, Hoechberg, Alemania). La calibración de volumen, mediante jeringa de 3 litros, se hizo en condiciones de presión, temperatura y humedad relativa cada día.

La maniobra de espiración forzada se realizó con el paciente sentado en posición erecta con oclusión nasal mediante pinzas. Se realizaron mediciones seriadas, con un mínimo de tres y un máximo de ocho, hasta obtener una variación inferior al 5% o 100 ml en relación al FEV1. Se seleccionó el trazado con la mayor suma de valores de FVC y FEV1. La metodología utilizada (54) y los valores de referencia han sido los recomendados por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (332, 333).

Se registró también el valor obtenido en la última prueba broncodilatadora (expresado en porcentaje de mejoría de FEV1). Para determinar este cociente se realizó una repetición de la espirometría 10 minutos después de la aplicación de una determinada dosis de broncodilatador (0,2 mg de salbutamol o equivalente) y la comparación de sus resultados con la espirometría basal.

4.2.2. Determinación de óxido nítrico exhalado

Para la medición del óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) se utilizó un monitor NIOXMINO (Aerocrine A.B., Solna, Suecia).

Este equipo tiene un rango de medición de 5 a 300 ppb con un límite inferior de 5 ppb y un tiempo de medición menor de 2 minutos. La medición se realizó con un tiempo de espiración de 10 segundos. Se siguieron las indicaciones del proveedor del equipo.

4.2.3. Pruebas cutáneas

Las pruebas intraepidérmicas (*prick*) se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) (334).

A los pacientes asmáticos se les realizaron las pruebas con una batería de aeroalérgenos adaptada a la exposición local, que incluía *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Olea europaea*, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, *Platanus acerifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor* y epitelios de perro y gato (ALK-Abelló, Madrid, España; Bial-Aristegui, Bilbao, España; Leti, Madrid, España), así como los correspondientes controles negativo (suero fisiológico) y positivo (dihidrocloruro de histamina, 10 mg/ml).

A los controles, todos ellos procedentes del Servicio de Inmunoalergia de Salamanca, se les realizaron pruebas con una batería de aeroalérgenos más extensa para comprobar que no presentaban ninguna sensibilización: *Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Euroglyphus maynei*, *Acarus siro*, *Glycyphagus domesticus*, *Cupressus arizonica*, *Quercus ilex*, *Platanus acerifolia*, *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago ovata*, *Olea euroapea*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, cucaracha y

epitelios de perro, gato, hámster, caballo y conejo, así como sus correspondientes controles negativo y positivo (ALK-Abelló, Madrid, España).

4.2.4. Determinación del valor de IgE total

Se determinó mediante enzimoimmunoanálisis siguiendo las recomendaciones del fabricante (Phadia Immucap 250, Uppsala, Suecia) en muestras de suero de los pacientes. El ImmunoCAP Total IgE es una prueba *in vitro* para la cuantificación de IgE total circulante en muestras de suero humano.

La técnica se fundamenta en un fluoroenzimoimmunoanálisis, de tal manera que los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los *ImmunoCAP*, reaccionan con la IgE específica del suero del paciente. Se añade una enzima unida a anticuerpos anti-IgE (β -galactosidasa-anti-IgE, anticuerpos monoclonales de ratón, 2 μ l/ml) formándose un complejo con la IgE del suero. Después de la incubación, los restos de enzima son eliminados mediante un lavado y el complejo final es posteriormente incubado con la solución de desarrollo. Después de detener la reacción con la solución de parada (*stop solution*) proporcionada por el fabricante se determina la fluorescencia del eluido. Para evaluar los resultados de los test, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones utilizando la curva de calibración que ha sido obtenida al procesarse un calibrador por duplicado.

4.2.5. Gravedad del asma según la guía GINA

La gravedad se clasificó del asma según la GINA (1) en cuatro categorías:

- Intermitente:
 - Síntomas menos de 1 vez por semana
 - Exacerbaciones de corta duración
 - Síntomas nocturnos no más de 2 veces al mes
 - FEV1 o PEF > 80% del valor predicho
 - Variabilidad en el PEF o FEV1 < 20%

- Persistente leve:
 - Síntomas más de 1 vez por semana pero menos de 1 vez al día
 - Exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño
 - Síntomas nocturnos más de 2 veces al mes
 - FEV1 o PEF > 80% del valor predicho
 - Variabilidad en el PEF o FEV1 < 20 – 30%

- Moderada persistente:
 - Síntomas diarios
 - Exacerbaciones afectan la actividad y el sueño
 - Síntomas nocturnos más de 1 vez a la semana
 - Uso diario de inhaladores con beta2 agonistas de acción corta
 - FEV1 o PEF 60-80% valor predicho
 - Variabilidad en el PEF o FEV1 > 30%

- Persistente grave:
 - Síntomas Diarios
 - Exacerbaciones frecuentes
 - Síntomas frecuentes de asma nocturna
 - Limitación de realizar actividades físicas
 - FEV1 o PEF ≤ 60% valor predicho
 - Variabilidad en el PEF o FEV1 > 30%

4.2.6. Escalón de tratamiento actual según la guía GINA

Se clasificó el nivel de tratamiento según la GINA (1) en cinco escalones (Ilustración 16).

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Educación sobre el asma Control ambiental				
Agonistas β2 de acción rápida según se requieran Opciones de controladores	Agonistas β2 de acción rápida según se requieran			
	Seleccionar uno	Seleccionar uno	Agregar uno o más	Agregar uno o más
	CSI* de baja dosis	CSI* de baja dosis más Agonista β2 de acción prolongada	CSI* de media o alta dosis más Agonista β2 de acción prolongada	Glucocorticoesteroide oral (dosis más baja)
	Modificador de leucotrieno**	CSI* de media o alta dosis CSI* de baja dosis más Modificador de leucotrieno** CSI* de baja dosis más Teofilina de liberación sostenida	Modificador de leucotrieno** Teofilina de liberación sostenida	Tratamiento Anti-IgE

* CSI = glucocorticoesteroides inhalados

** antagonista del receptor o inhibidores de la síntesis

Ilustración 16. Escalones de tratamiento según la guía GINA.

4.2.7. Cuestionario de calidad de vida miniAQLQ (*Asthma Quality of Life Questionnaire*)

Para evaluar la calidad de vida se utilizó el cuestionario mini-AQLQ (130), que es una versión reducida del cuestionario original, *Asthma Quality of Life Questionnaire* (AQLQ) (118) de Juniper y cols. y que ha sido validado en español (133, 134).

El mini-AQLQ contiene 15 ítems en 4 dimensiones (el original consta de 32 ítems) que hacen referencia a las últimas 2 semanas:

- limitación de actividades habituales (4 ítems)
- síntomas (5 ítems)
- función emocional (3 ítems)
- estímulos ambientales (3 ítems)

Las opciones de respuesta para cada ítem se sitúan en una escala equidistante de 7 puntos, donde 1 corresponde a la máxima limitación y 7 a la ausencia de limitación.

El cuestionario proporciona una puntuación global, que es la media para todos los ítems, y una puntuación para cada dimensión, que es la media de los ítems correspondientes.

4.2.8. Resultado del cuestionario de control del asma ACT (*Asthma Control Test*)

Para evaluar el control de la enfermedad se utilizó el cuestionario ACT (335) validado en español (336).

Consiste en un breve cuestionario de 5 preguntas sobre el control del asma que hacen referencia a las 4 últimas semanas y cuyas puntuaciones van de 1 a 5.

Se obtiene un valor global mediante la suma de las 5 preguntas que oscila entre 5 (mínimo control del asma) y 25 (máximo control del asma).

4.2.9. Evaluación de la gravedad de rinitis alérgica

Para evaluar la gravedad de la rinitis alérgica en los pacientes que la presentaban se utilizó la guía ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) (329) utilizando la modificación propuesta por Valero y cols. (330) para diferenciar la intensidad (leve, moderada y severa), según el número de ítems afectados:

- Sueño
- Alteración del ocio, actividades, deporte
- Escuela / trabajo
- Síntomas molestos

- Leve (ningún ítem afectado)
- Moderada (1-3 ítems afectados)
- Grave (4 ítems afectados)

Utilizando esta misma guía se clasificó la duración de la rinitis alérgica en intermitente y persistente dependiendo de la frecuencia de los síntomas:

- Intermitente: ≤ 4 días a la semana o ≤ 4 semanas
- Persistente: >4 días a la semana y >4 semanas

4.2.10. Evaluación de la gravedad de rinosinusitis crónica

En los pacientes que presentaban rinosinusitis crónica se evaluó su intensidad utilizando la guía EPOS (*European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps*) (331).

Mediante una Escala Visual Analógica (EVA) de 10 cm de longitud se clasificó en:

- Leve: EVA ≤ 3 cm
- Moderada: EVA > 3 y ≤ 7 cm
- Grave: EVA > 7 cm

4.3. Genotipado

4.3.1. Extracción de ADN

Se realizó una extracción de ADN en sangre periférica recogida en tubos con anticoagulante EDTA y congelada a -20°C mediante un sistema automatizado Maxwell® 16 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El Maxwell® 16 proporciona un método automatizado de purificación de ADN genómico a partir de sangre, células o muestras de tejido; es capaz de procesar hasta 16 muestras en un tiempo de 50 minutos. El equipo purifica

muestras usando MagneSil® Paramagnetic Particles (PMP), lo que proporciona una fase sólida móvil que optimiza la captura, lavado y elución del material diana. Transporta las PMP MagneSil® a través de los reactivos de purificación en los cartuchos dispuestos en los pocillos previamente, y mezclados durante el proceso. Con esta metodología de partículas se evitan problemas de bloqueo del filtro y transferencia parcial de reactivo.

La extracción se realizó siguiendo un protocolo de concentración celular basado en una centrifugación de 4 ml de sangre total a la que se le añadió 5 ml de agua destilada durante 10 minutos a 1.500 revoluciones por minuto (rpm) para la separación de la interfase rica en células nucleadas. Posteriormente se procedió a decantar el sobrenadante, añadir 5 ml de agua destilada y volver a centrifugar 10 minutos a 1.500 revoluciones por minuto (rpm) dos veces más para enriquecer el volumen de células nucleadas.

Posteriormente se depositó el botón celular en el pocillo 1 del cartucho del Maxwell® 16 y el émbolo en el séptimo pocillo del cartucho de purificación. El resto de pocillos (2 a 6) contienen soluciones de lavado. (Ilustración 17)

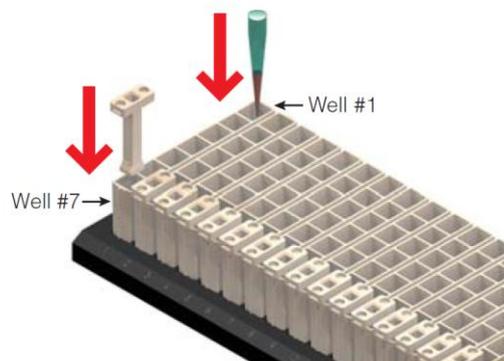


Ilustración 17. Esquema de utilización del cartucho de purificación Maxwell® 16 (tomado de manual técnico proporcionado por el fabricante).

Una vez preparado se inició la purificación. En último término, y tras aproximadamente 50 minutos, el ADN extraído se recogió en 500 µl de tampón suministrado con el kit. Por último, el resultado de la purificación se depositó en

una gradilla magnética para limpiar los restos de partículas magnéticas que hubiesen podido ser arrastradas.

Se procedió al alicuotado, identificación y posterior conservación congelado a -20°C.

4.3.2. Análisis de la calidad del ADN

La cuantificación y pureza del ADN extraído se determinó mediante Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EE.UU.).

Se realizó un control de la fragmentación del ADN mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania) con tampón 0,5x TAE (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a voltaje constante de 140V.

El ADN se mezcló en proporción 5:1 con el tampón de carga de electroforesis (30 % glicerol, 0,1 % azul de bromofenol y 0,1 % xilén cianol FF).

El marcador utilizado fue 100 bp+1,5 Kb DNA Ladder (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania) cuyo patrón de bandas se observa en la Ilustración 18.

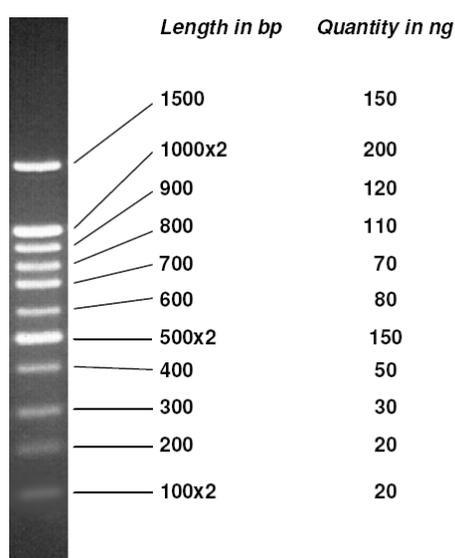


Ilustración 18. Patrón de bandas del marcador 100bp+1,5 Kb DNA Ladder (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania).

El ADN se visualizó en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0,5 µg/ml), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV.

Los resultados obtenidos fueron visualizados y almacenados mediante un sistema transiluminador VisiDoc-It™ Imaging System (Upland, California, EE.UU.). (Ilustración 19).

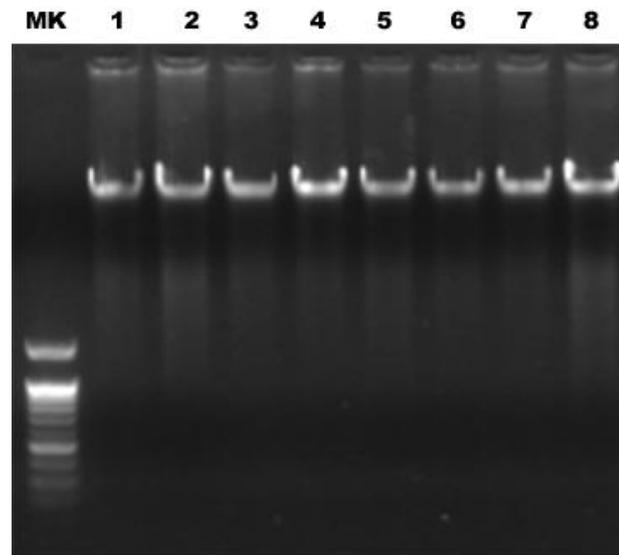


Ilustración 19. Visualización de ADN genómico en gel de agarosa. MK corresponde al marcador y 1-9 bandas de ADN genómico.

4.3.3. PCR

Se decidió realizar la amplificación mediante PCR de un fragmento de 1.102 pb que contiene las dos mutaciones. Para ello se emplearon los cebadores FilH1F3 y RPT2P1 descritos por Smith y cols. (290) y que se detallan en la Tabla 12 y en la Ilustración 20. Todos ellos fueron suministrados de forma liofilizada (Roche Diagnostics - Applied Science, Mannheim, Alemania) siendo reconstituidos a una concentración de 20 µM con agua estéril libre de nucleasas (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) y se conservaron a -20°C.

Tabla 12. Denominación y secuencia de los cebadores utilizados en la reacción de PCR.

Cebador	Cadena	Secuencia
FilH1F3	+	5'-CACGGAAAGGCTGGGCTGA-3'
RPT2P1	-	5'- GGGAGGACTCAGACTGTTT-3'

La amplificación del DNA de la región correspondiente del gen FLG mediante PCR se llevó a cabo utilizando el sistema PCR-Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

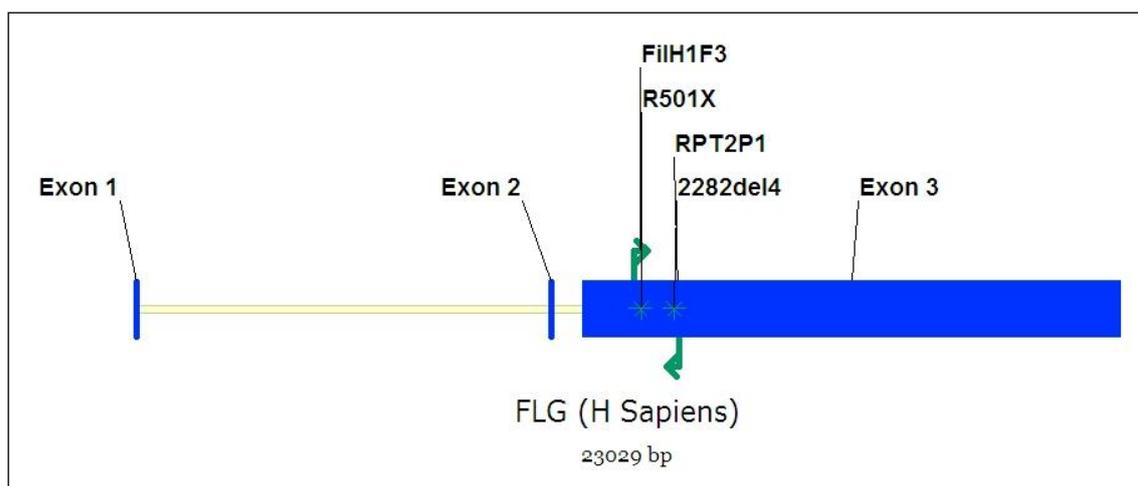


Ilustración 20. Esquema de los cebadores utilizados.

Cada reacción fue preparada añadiendo 25 µl de PCR Mastermix 2X (50 U/ml Taq ADN polimerasa, 3 mM MgCl₂, 400 µM dNTPs, y solución tampón (*buffer*) con pH 8,5), 5 µl de ADN, 1 µl de cada oligonucleótido y 18 µl de agua destilada libre de nucleasas. El volumen final de reacción fue en todos los casos de 50 µl y siempre se preparó una reacción sin ADN como control negativo. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador de MWG-BIOTECH (Ebersberg, Alemania).

El programa utilizado para amplificar dicho fragmento fue el siguiente:

- 94°C, 5 minutos (1 ciclo)
 - 94°C, 40 segundos
 - 57°C, 60 segundos
 - 72°C, 90 segundos
- } (35 ciclos)
- 72°C, 7 minutos (1 ciclo)

Utilizando los cebadores anteriormente descritos se amplifica un fragmento de 1.102 pb (ver Ilustración 21).

```
cacggaaggctgggctgagacagcagagccaccaagagtccacacgtggccggtcaggggaacggctggacgttcagggtctccc  
tctaccaggtgagcactcatgaacagcctgactctgcccattggacggaccgggaccagcactggaggaagacaaggatcgaccac  
gagcaggca1gagacagctccaggcattcagcgtcccaagagggtcaggacaccattcgtggacacccggggtcaagcagagga  
ggaaggcagggatcccaccacgagcaatcggtaaataggcttgacactcaggttcccatcacagccacaccacatcccaggaag  
gtctgatgctcccatgggcagtcaggatccagaagtgaagcagacaaacacgaaatgaggaacaatcaggagacggcaccagg  
cactcagggtcacgtcatcatgaagcttctctcaggctgacagctctagacactcacaggtggccagggacaatcatcggggccca  
ggacaagtaggaaccaggatccagtgtagccaggacagtgacagtcagggacactcagaagactctgagaggtggtctgggtctg  
ctccagaaacatcatggatctgctcaggagcagtcgaagatggctccagacaccccagggtcccatcacgaagacagagctggtc  
atgggcactctgcagacagctccagaaaatcaggcactcgtcacacagaaattctctagtggacagggtcgtcatccatgaaca  
ggcaagatcaagtgcaggagaaagacatggatcccgccaccagctccagtcagcagacagctccagacactcaggcactgggcac  
ggacaagcttcatctgcagtcagagacagtgagacaccgagggtccagtggttagtcaggccactgacagtgagggacattcagaaga  
ctcagacacacagt2cagtgtaggcatggacaggctggtcaccatcagcagagccaccaagagtccgcacgtgaccggctcaggg  
gaaaggctcgcaggttcagggtcttctctaccaggtgagcactcataaacagctctgagtcctccc
```

Ilustración 21. Fragmento de 1.102 pb amplificado utilizando los cebadores FilH1F3 y RPT2P1. (1) Mutación R501X. (2) Mutación 2282del4.

4.3.3.1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados mediante PCR convencional, fueron separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles

horizontales de agarosa de alta resolución al 1% (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania) con tampón 0,5x TAE (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a voltaje constante de 140V.

El ADN se mezcló en proporción 5:1 con el tampón de carga de electroforesis (30 % glicerol, 0,1 % azul de bromofenol y 0,1 % xilén cianol FF).

El marcador utilizado es 100bp+1,5 Kb DNA Ladder (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania).

Los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Los resultados obtenidos fueron visualizados y almacenados mediante un sistema transiluminador VisiDoc-It™ Imaging System (Upland, California, EE.UU.). (Ilustración 22).

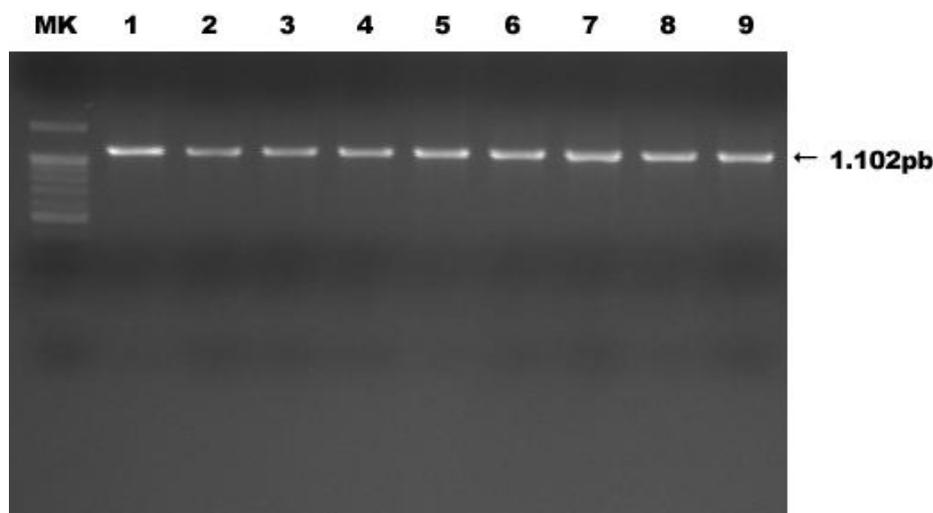


Ilustración 22. Visualización de los fragmentos obtenidos mediante PCR. MK corresponde al marcador y 1-9 bandas de 1.102 pb.

4.3.3.2. Purificación

La purificación de los fragmentos resultantes de la amplificación se llevó a cabo mediante el kit comercial GeneClean Turbo Kit (BIO 101 Systems,

Cambridge, Reino Unido), que permite separar fragmentos de ADN de entre 0,1 Kb y 300 Kb.

El procedimiento se realizó en tres pasos: unión del ADN a un filtro de sílice (fase sólida), lavado y elución. El ADN se unió a un filtro de sílice a elevadas concentraciones de sal y se eluyó a baja concentración salina. Se añadieron 5 volúmenes de solución salina, para que el ADN se uniera al filtro situado en la columna y se centrifugó para posteriormente descartar el sobrenadante. A continuación, se añadieron 500 µl del tampón de lavado, una solución de etanol muy concentrada, con el fin de lavar el ADN unido. Una vez más se descartó el sobrenadante tras la centrifugación y por último se añadieron 50 µl de tampón de elución para resuspender el ADN unido a la membrana. El ADN purificado queda en esta disolución.

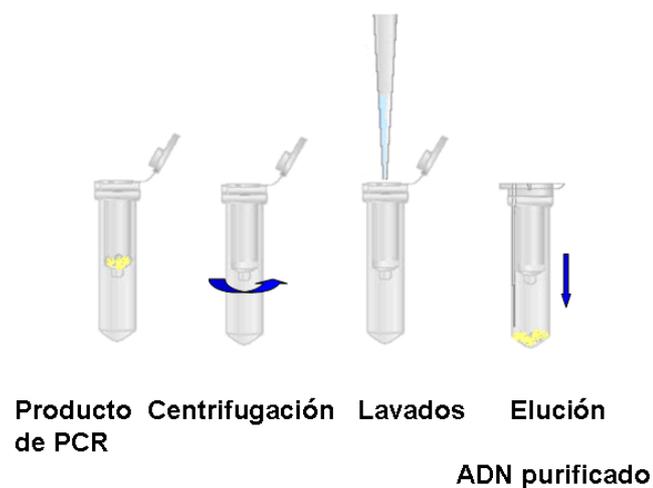


Ilustración 23. Protocolo simplificado de purificación de ADN por GeneClean® Turbo dado por el fabricante.

4.3.4. Análisis de la mutación R501X

El análisis de la mutación R501X consistente en una transición de una citosina por una timina se llevó a cabo mediante secuenciación automática de los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación por PCR.

Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser y ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, California, EE.UU.), usando el cebador específico FilH1F3, así como terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Las reacciones de secuenciación se prepararon con 5 µl del producto de la PCR que contenía la secuencia de interés y con 3 µl de cebador de la cadena 3'-5' a concentración 1 µM, todo ello en un volumen final de 8 µl.

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo usando el programa informático Chromas Lite versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia). (Ilustración 24).

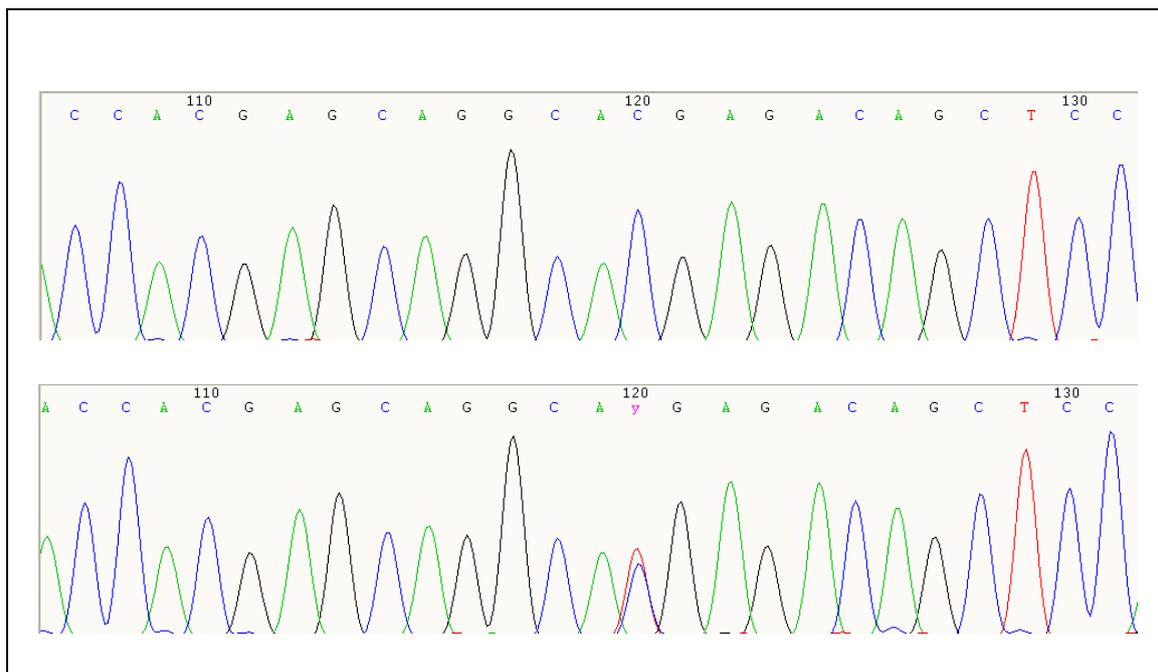


Ilustración 24. Visualización de las secuencias obtenidas mediante Chromas Lite versión 2.01.

Se realizó un alineamiento de las 400 secuencias obtenidas mediante Vector NTI 10 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), para tratar de encontrar

otros polimorfismos en nuestra población candidatos a un estudio más detallado (Ilustración 25).

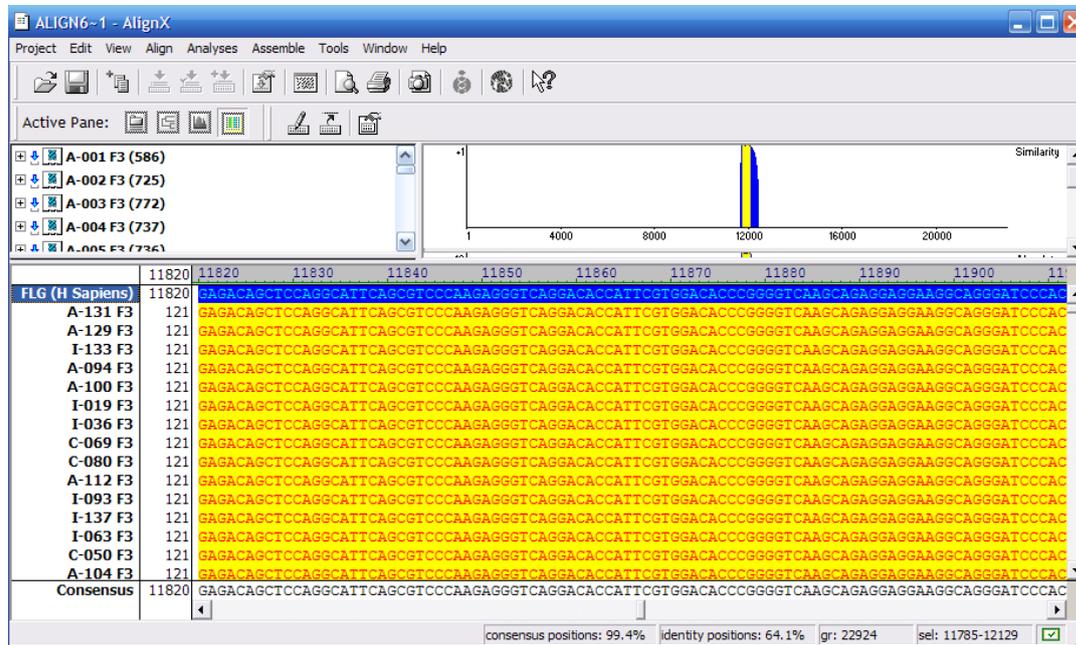


Ilustración 25. Alineamiento de una secuencia en Vector NTI 10 resultante de amplificación por PCR y la secuencia consenso de *FLG*.

4.3.5. Análisis de la mutación 2282del4

La determinación de la mutación 2282del4 consistente en una deleción de 4 nucleótidos (citosina-adenina-guanina-timina) se llevó a cabo mediante una digestión con la enzima de restricción *Dralll*, ya que la deleción de los 4 aminoácidos crea un sitio de restricción para dicha enzima.

4.3.5.1. Digestión con la enzima de restricción *Dralll*

Los fragmentos amplificados del gen *FLG* se sometieron a digestión con la enzima *Dralll* (New England Biolabs Inc, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.), que reconoce y corta la secuencia especificada en la Ilustración 26.

Para ello se preparó una reacción en un volumen total de 30 μ l, con 20 μ l de la muestra amplificada, 5 U de enzima (0,25 μ l de la la concentración 20U/ μ l suministrada por el fabricante), 3 μ l de NEBuffer 3 10X, 0,3 μ l de BSA 100X y 6,45 μ l de agua destilada para conseguir las condiciones recomendadas por el fabricante de 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitól y un pH de 7,9.

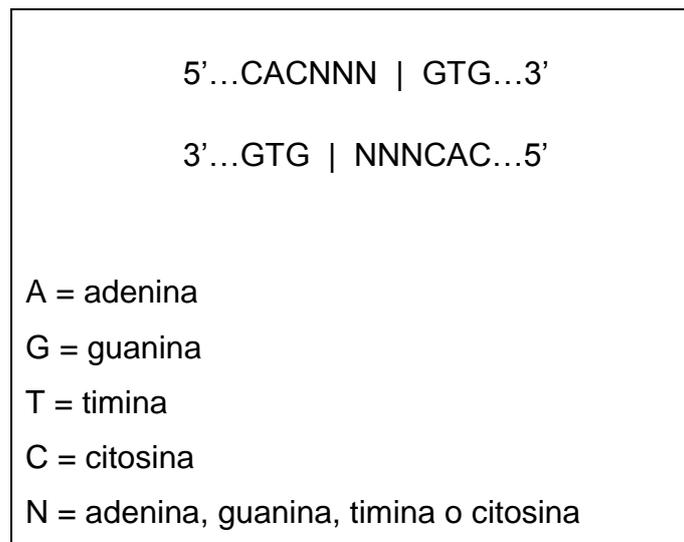


Ilustración 26. Secuencia que reconoce la enzima DrIII.

Se incubó a 37°C durante 4 horas en tubos tipo eppendorf cerrados herméticamente para evitar la evaporación del contenido.

Una vez encontrado el primer ADN mutado se utilizó como control positivo de corte en todas las reacciones para evitar la aparición de falsos negativos por una digestión incorrecta. Como control del proceso, se visualizó simultáneamente el amplicón sin digerir junto con el producto de digestión.

Cuando la mutación está presente DrIII corta el fragmento de 1102 pb en uno de 962 y otro de 136 pb, tal como se puede ver en la Ilustración 27.

1.cacggaaaggctgggctgagacagcagagccaccaagagtccacacgtggccggtcaggggaacggctggacgttcagggtcttcctctaccaggtgagcactcatgaacagcctgactctgccatggacggaccgggaccagcactggaggaagacaaggatcgaccacgagcaggcacgagacagctccaggcattcagcgtccaagagggtcaggacaccattctggacacccggggtcaagcagaggaggaaggcagggatcccaccacgagcaatcggtaaataggtctggacactcaggttccatcacagccacaccacatcccagggaaggtctgatgcctcccagtcaggatccagaagtgaagcagacaaacacgaaatgaggaacaatcaggagacggcaccaggcactcagggtcacgtcatcatgaagcttctctcaggctgacagctctagacactcacaggtggccagggacaatcatcggggccaggacaagtaggaaccaggatccagtgttagccaggacagtacagtcagggacactcagaagactctgagaggtggtctgggtctgtctccagaaaccatcatggatctgctcaggagcagtaagagatggctccagacaccccagggtccatcacgaagacagagctgtcatgggactctgcagacagctccagaaaatcaggcactcgtcacacacagaattcctctagtggacaggctcgtcatccatgaacaggcaagatcaagtgcaggagaaagacatggatcccgccaccagctccagtcagcagacagctccagacactcaggcactgggacggacaagctcatctgcagtcagagacagtgacaccgagggtccagtggtagtcaggccactgacagtgagggacattcagaaagactcagacacacagtcagtcaggccatggacaggctggtcaccatcagcagagccaccaagagtccgcacgtgaccgggtcagggaaaggctcgacgttcagggtcttctctaccaggtgagcactcataaacagtctgagtcctccc

2.

2a.cacggaaaggctgggctgagacagcagagccaccaagagtccacacgtggccggtcaggggaacggctggacgttcagggtcttccctctaccaggtgagcactcatgaacagcctgactctgccatggacggaccgggaccagcactggaggaagacaaggatcgaccacgagcaggcacgagacagctccaggcattcagcgtccaagagggtcaggacaccattctggacacccggggtcaagcagaggaggaaggcagggatcccaccacgagcaatcggtaaataggtctggacactcaggttccatcacagccacaccacatcccagggaaggtctgatgcctcccagtcaggatccagaagtgaagcagacaaacacgaaatgaggaacaatcaggagacggcaccaggcactcagggtcacgtcatcatgaagcttctctcaggctgacagctctagacactcacaggtggccagggacaatcatcggggccaggacaagtaggaaccaggatccagtgttagccaggacagtacagtcagggacactcagaagactctgagaggtggtctgggtctgtctccagaaaccatcatggatctgctcaggagcagtaagagatggctccagacaccccagggtccatcacgaagacagagctgtcatgggactctgcagacagctccagaaaatcaggcactcgtcacacacagaattcctctagtggacaggctcgtcatccatgaacaggcaagatcaagtgcaggagaaagacatggatcccgccaccagctccagtcagcagacagctccagacactcaggcactggcagcagacaagcttcatctgcagtcagagacagtgacaccgagggtccagtggtagtcaggccactgacagtgagggacattcagaagactcagacacaca

2b.gtgtcaggccatggacaggctggtcaccatcagcagagccaccaagagtccgcacgtgaccggtcaggggaaaggctcgacgttcagggtcttctctaccaggtgagcactcataaacagtctgagtcctccc

Ilustración 27. Fragmento de 1.102 pb amplificado utilizando los cebadores FilH1F3 y RPT2P1. (1) Fragmento sin la mutación 2282del4. No presenta ningún punto de corte para la enzima de restricción DrIII. (2) Fragmento que presenta la mutación 2282del4. La enzima de restricción DrIII reconoce un punto de corte y se forma un fragmento de 962 pb (2a) y otro de 136 pb (2b).

4.3.5.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para la comparación de los fragmentos amplificados mediante PCR convencional y los sometidos a digestión por la enzima DraIII, se realizó una electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 1,5% (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania) con tampón 0,5x TAE (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a voltaje constante de 90V.

El ADN se mezcló en proporción 5:1 con el tampón de carga de electroforesis (30 % glicerol, 0,1 % azul de bromofenol y 0,1 % xilén cianol FF).

El marcador utilizado fue 100 bp+1,5 Kb DNA Ladder (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania).

Los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Los resultados obtenidos fueron visualizados y almacenados mediante un sistema trans-iluminador VisiDoc-It™ Imaging System (Upland, California, EE.UU.). (Ilustración 28).

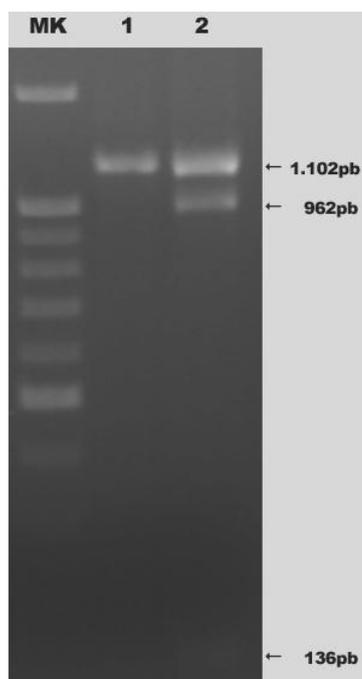


Ilustración 28. Visualización de (MK) masas moleculares, (1) amplicón sin digerir, (2) amplicón heterocigoto para 2282del4 digerido.

4.3.5.3. Comprobación de los ADN mutados

Se comprobaron mediante secuenciación automática todos los ADN en los que se objetivaba mediante digestión con la enzima DraIII la presencia de la mutación.

Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser y ABI PRISM 377 ADN Sequencer (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, California, EE.UU.), usando el cebador específico RPT2P1, así como terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Las reacciones de secuenciación se prepararon con 5 µl del producto de la PCR que contenía la secuencia de interés y con 3 µl de cebador de la cadena 5'-3' de concentración 1 µM, todo ello en un volumen final de 8 µl.

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo usando el programa informático Chromas Lite versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia). (Ilustración 29)

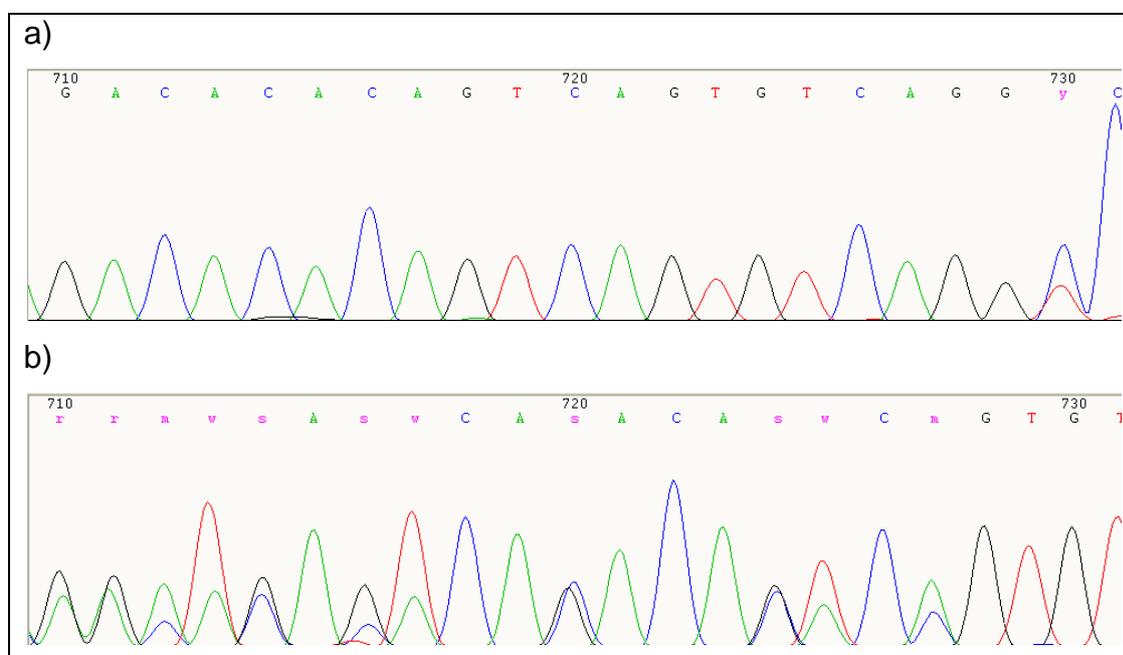


Ilustración 29. Visualización de la secuencia de ADN que no presenta la mutación (a) y heterocigoto para la mutación (b) en el que se observa la superposición de secuencias debido al cambio en el marco de lectura.

4.3.5.4. Comprobación aleatoria de ADN no mutados

Se realizó una secuenciación de idénticas características a la del anterior punto de 72 ADN aleatorios (procedentes de los 3 grupos) en los que la enzima de restricción no había actuado y se comprobó que en esos ADN no estaba presente la mutación 2282del4.

4.3.6. Control de calidad del laboratorio

Durante la realización de este estudio se siguieron las normas de control de calidad de la European Genetics Quality Network comenzando con la adecuada recepción de las muestras y su almacenamiento. La extracción del ADN se realizó siempre minimizando el riesgo de contaminación de las muestras. Se habilitó un área aislada para realizar las PCR en cabina de flujo laminar y las pipetas utilizadas para dicho proceso contenían filtros para evitar posibles contaminaciones.

En el estudio se utilizaron controles negativos y marcadores de masa molecular apropiados. Las muestras procedentes de sujetos control y de pacientes se trataron conjuntamente desconociendo el grupo al que correspondían las muestras durante su tratamiento en el laboratorio.

4.3.7. Estudio “*in silico*”

Dado la ingente cantidad de datos y la complejidad de los cálculos bioinformáticos parte del trabajo realizado en este estudio, se ha centrado en el análisis de bases de datos científicas a través de Internet que se detalla a continuación.

4.3.7.1. Estudio de la secuencia nucleotídica de referencia

Para llevar a cabo el estudio de *FLG* y la búsqueda de posibles diferencias entre los distintos grupos de pacientes y controles es necesario

determinar previamente las secuencias de referencia del gen a analizar. La determinación de dichas secuencias de referencia del gen *FLG*, de su correspondiente transcrito y de la región codificante de la proteína profilagrina se llevó a cabo empleando distintos programas informáticos, entre los que se encuentra la plataforma **OMIM®** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

El OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man®) es un portal perteneciente al NCBI que ofrece información actualizada sobre más de 12.000 genes en humanos, su estructura molecular, las variantes génicas descritas para ese gen así como los estudios de asociación con distintas enfermedades. Esta plataforma ofrece igualmente información acerca de la localización cromosómica de cada gen, su función, el fenotipo que produce su alteración y bibliografía relacionada con el tema entre otras opciones (Ilustración 30).

FILAGGRIN; FLG

Other entities represented in this entry:
PROFILAGGRIN, INCLUDED

HGNC Approved Gene Symbol: *FLG*

Cytogenetic location: *1q21.3* Genomic coordinates (GRCh37): *1:152,274,658 - 152,297,678* view map

Gene Phenotype Relationships		
Location	Phenotype	Phenotype OMIM number
<i>1q21.3</i>	Ichthyosis vulgaris (Erythrodermia, atopic, susceptibility to, ?)	609833

TEXT

Description
Profilaggrin is a major protein component of the keratohyalin granules of mammalian epidermis. It is initially expressed as a large polyprotein precursor which is subsequently proteolytically processed into individual functional filaggrin molecules. The filaggrins show wide species variations and their aberrant expression has been implicated in a number of keratinizing disorders (Baden et al., 1976; Holbrook et al., 1982; Sybert et al., 1985).

Cloning
McKinley-Grant et al. (1989) isolated a cDNA clone encoding human filaggrin. They demonstrated that the human gene encodes a polyprotein precursor containing numerous tandem filaggrin repeats. This structure is similar to that of the mouse; however, the human filaggrin repeat is much longer (972 basepairs; 324 amino acids) and shows little sequence homology to the mouse protein. They found furthermore that the human filaggrin repeats show considerable sequence variations; such polymorphism is not found in the mouse. By peptide mapping, they defined a short linker sequence within the human filaggrin repeat that is excised by proteolysis to yield functional molecules. They showed by in situ hybridization that the expression of the gene for the human filaggrin precursor is tightly regulated at the transcriptional level in terminally differentiating epidermis.

Gan et al. (1990) isolated genomic DNA and cDNA clones encoding the 5-prime and 3-prime ends of the human gene and mRNA. They found evidence of likely CAT and TATA sequences, an intron in the 5-prime untranslated region, and several potential regulatory sequences. The gene is made up of repeats, all of the same length. Sequences showed considerable variation, most attributable to single-base changes. Thus, human filaggrin consists of a heterogeneous population of molecules of different sizes, charges, and sequences. Amino acid sequences encoding the amino and carboxyl termini were more conserved, as were the 5-prime and 3-prime DNA sequences flanking the coding portions of the gene. The presence of unique restriction enzyme sites in these conserved flanking sequences enabled Gan et al. (1990) to calculate the size of the full-length gene and the number of repeats in it; depending on the source of genomic DNA, the gene contains 10, 11, or 12 filaggrin repeats that segregate in families in a normal mendelian manner. Thus, the human profilaggrin gene is polymorphic with respect to size due to simple allelic differences between individuals.

Gene Structure
The *FLG* gene comprises 3 exons (Froelund et al., 1992).

Ilustración 30. Visión parcial de la pantalla que muestra los resultados de la búsqueda del gen *FLG* en la página web del OMIM. Muestra la localización cromosómica, el fenotipo y parte de la descripción del gen.

El NCBI o National Center for Biotechnology Information es un portal que ofrece una amplísima información biomédica y sobre genética molecular, tanto aspectos genómicos, como proteómicos, como transcriptómicos, entre otros.

Asimismo, dispone de una base de datos de polimorfismos y de múltiples variaciones que incluyen inserciones/delecciones, microsátelites y variantes no polimórficas.

4.3.7.2. Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación automática de los productos de PCR purificados se analizaron con el programa **Chromas Lite** versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australia). Esta aplicación permite visualizar la secuencia del fragmento de DNA amplificado y el cromatograma correspondiente (Ilustración 24 e Ilustración 29). Además permite realizar distintos análisis de la secuencia en cuestión, como buscar marcos de lectura abierta, secuencias de enzimas de restricción, obtener la secuencia reversa y complementaria u obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por dicha secuencia.

Una vez analizadas las secuencias, se introdujeron en el programa **VectorNTI 10** (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), para poder compararlas, o alinearlas, con la secuencia genómica de referencia depositada en la base de datos del NCBI para el gen *FLG*, y así poder determinar la existencia de posibles variantes génicas (Ilustración 25).

4.3.7.3. Búsqueda de polimorfismos

Para conocer si los polimorfismos que habíamos encontrado ya habían sido descritos con anterioridad, se hizo una búsqueda en la plataforma online **dbSNP** del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Al buscar información sobre los SNP descritos en el gen *FLG*, nos muestra una página en la que se nombran todos ellos (Ilustración 31), y desde la cual se puede acceder a información concreta de cada polimorfismo, como la localización cromosómica, la frecuencia alélica y la relevancia clínica, entre otras.

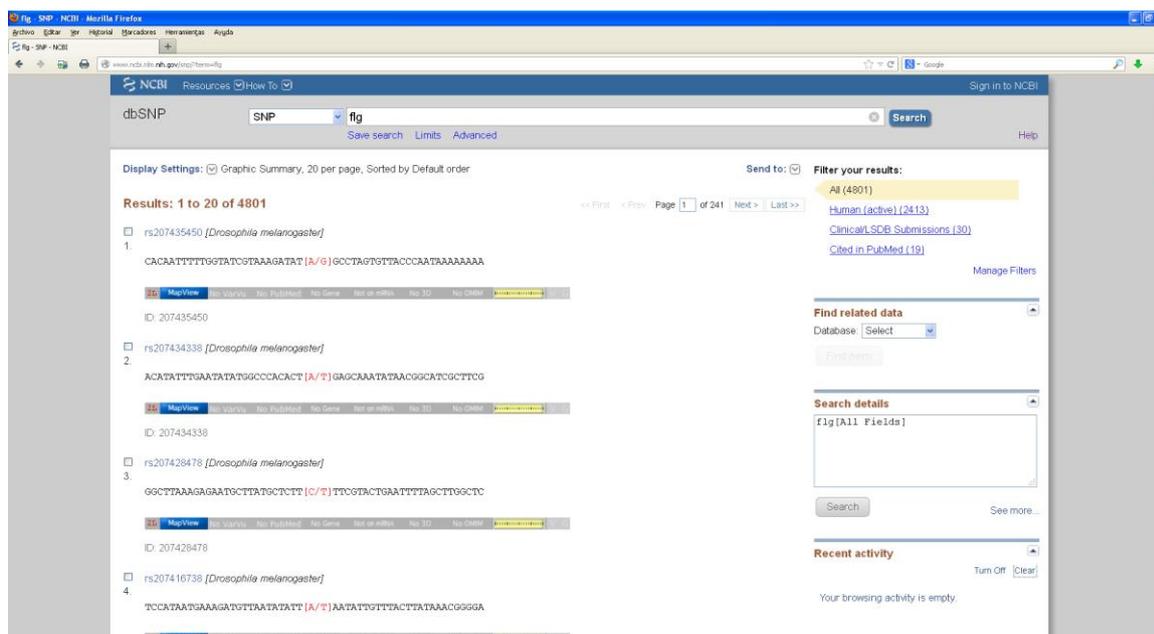


Ilustración 31. Visión parcial del resultado de la búsqueda en el dbSNP de NCBI de los polimorfismos del gen *FLG* en humanos.

4.3.7.4. Análisis de las frecuencias alélicas

Se procedió a la determinación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos encontrados empleando la plataforma estadística on-line **SHEsis** (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) (337, 338).

El programa SHEsis es una plataforma que permite el análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de forma individual en controles y en pacientes. Además, puede determinar la frecuencia de los haplotipos, gracias a un complejo algoritmo que reconstruye los haplotipos posibles de una muestra dada (Ilustración 32).

Se realizó también una estimación del Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos, tanto en el grupo de pacientes como en el de controles. La situación de equilibrio se analizó mediante la prueba de χ^2 . Esta estimación proporciona a su vez un control del estudio.

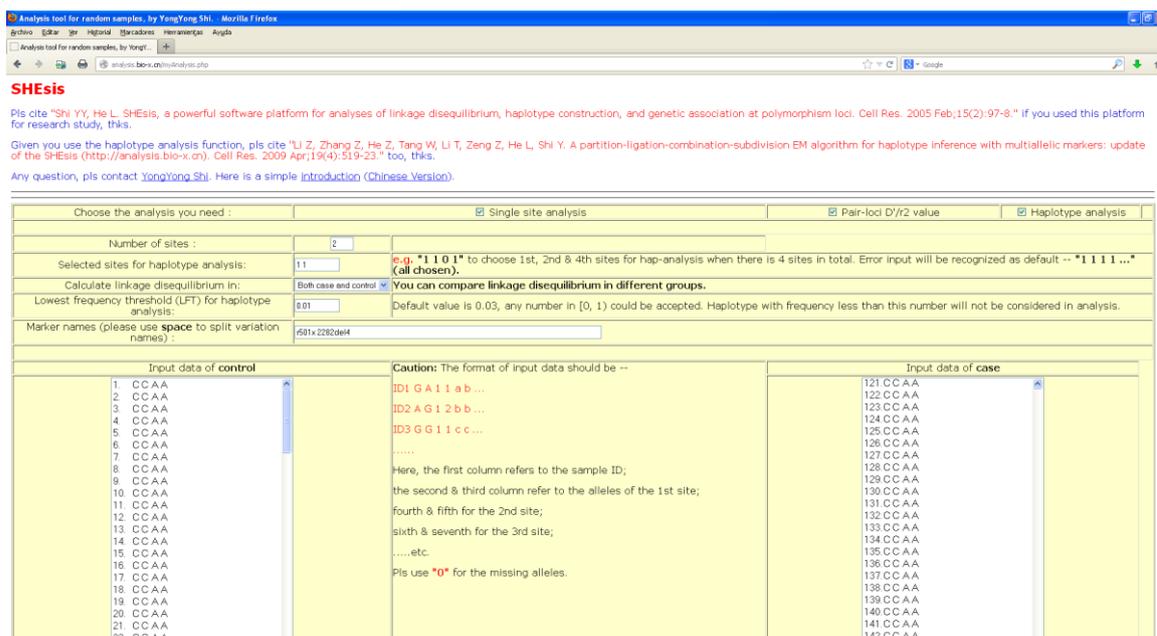


Ilustración 32. Página principal del programa SHEsis. Permite seleccionar el análisis deseado, así como el número y combinación de polimorfismos a analizar. En la parte inferior se observan las casillas en las que se introducen los resultados de la secuenciación de los grupos de controles y pacientes (case).

4.3.7.5. Predicción proteica

Se realizó una predicción proteica mediante la plataforma **Expasy** (<http://www.expasy.org/>). Éste es un portal bioinformático que proporciona acceso a diferentes bases de datos científicas y herramientas en distintas áreas de las Ciencias de la Salud como la Proteómica, Genómica, Filogenética, Biología, Genética poblacional, Transcriptómica, etc.

Entre todos los recursos que proporciona, la herramienta **Expasy Translate** permite determinar, a partir de una secuencia de ADN codificante, la secuencia de aminoácidos de una proteína. Esta secuencia se comparó con la secuencia de referencia obtenida en la base de datos de secuencias proteicas de referencia **UniProt** (<http://www.uniprot.org/>).

Así, pudimos conocer la secuencia de nuestra proteína silvestre y mediante la herramienta **Expasy ProSite** hacer una predicción de la proteína que se obtendría al modificar la secuencia base con cada uno de los

polimorfismos en región exónica encontrados (Ilustración 33). Además, ofrece información sobre los motivos funcionales a partir de la secuencia de la proteína.

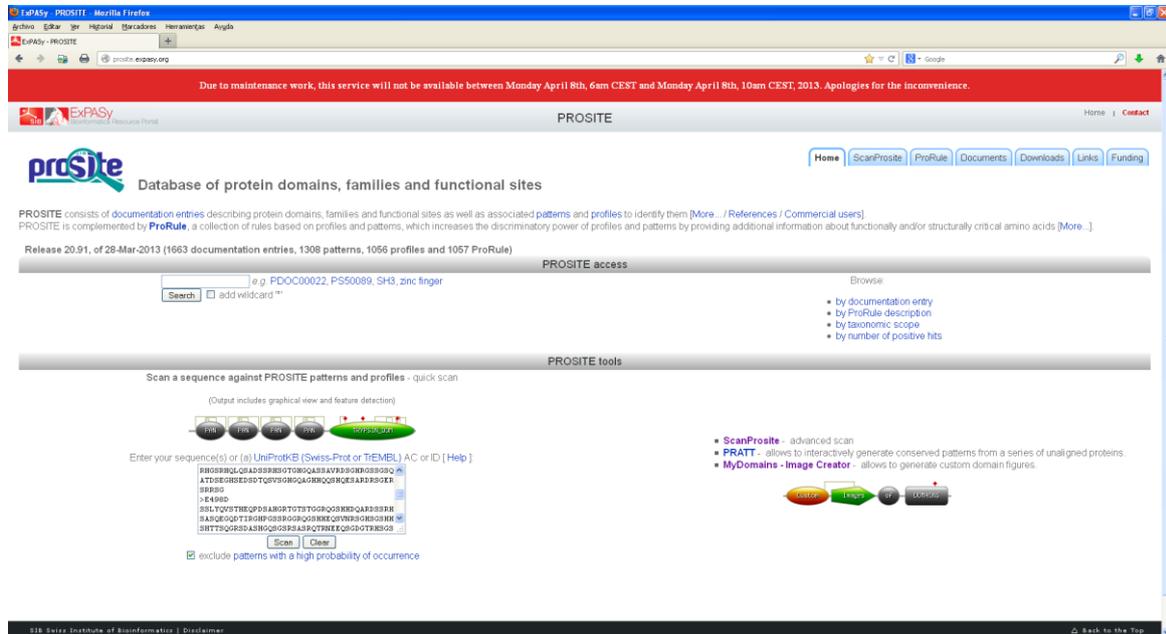


Ilustración 33. Página principal de la herramienta Prosite de EXPASy. En la parte inferior se observa la casilla en la que se introduce la secuencia proteica de referencia y la secuencia a comparar.

También se realizó una estimación del efecto que produce cada SNP en la proteína mediante la plataforma **SNPeffect 4.0** (<http://snpeffect.switchlab.org/>), que utiliza herramientas bioinformáticas para el estudio de la secuencia y estructura proteica (Ilustración 34). Integra herramientas para realizar una predicción de la tendencia a la agregación (TANGO), predicción de tendencia amiloidea (WALTZ), predicción de la unión a chaperonas (LIMBO) y análisis de estabilidad proteica (FoldX). Adicionalmente aporta información sobre sitios catalíticos y un número de modificaciones post-translacionales. Esta plataforma permite analizar secuencias obtenidas directamente desde UniProt o introducidas por el usuario.

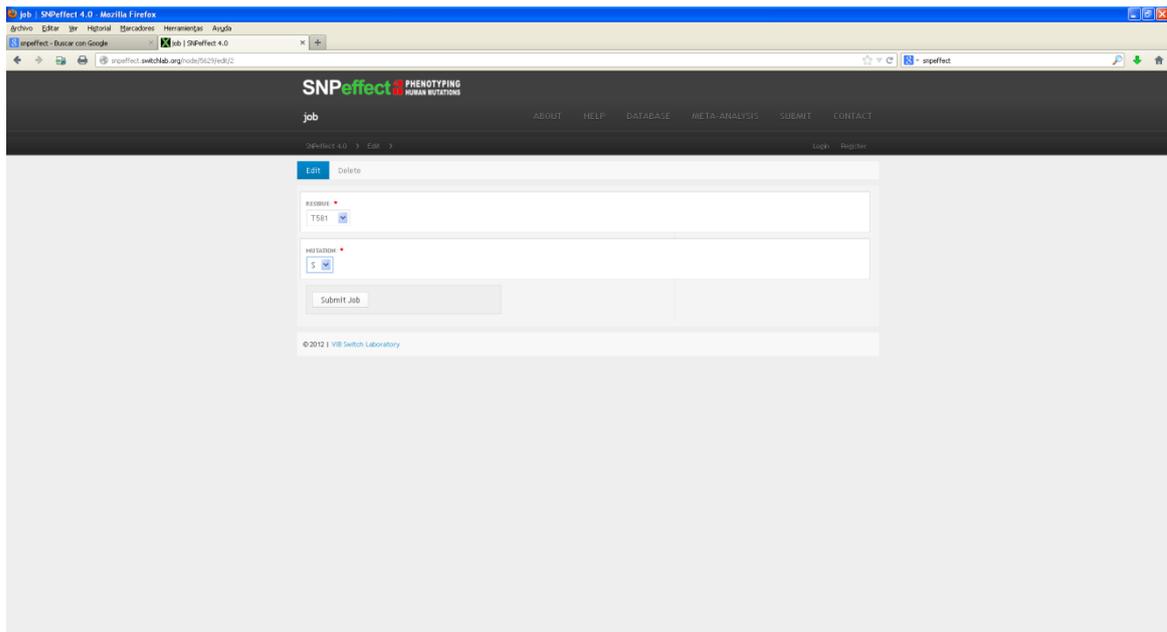


Ilustración 34. Introducción de los datos del SNP a estudiar en la plataforma SNPEffect.

4.4. Análisis estadístico

4.4.1. Análisis descriptivo

En el análisis descriptivo de la muestra se emplearon medidas de tendencia central (media y/o mediana cuando existía asimetría o dispersión grande) y de dispersión (desviación estándar) para las variables cuantitativas y para las variables cualitativas porcentajes. Se utilizó para ello el programa informático SPSS versión 15.0. (Chicago, Illinois, EE.UU.).

4.4.2. Análisis bivalente

- Comparación de variables categóricas y continuas. El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para comparar las diferentes variables a través de las diferentes categorías, previo análisis de la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene y de la normalidad de la distribución muestral (Kolmogorov-Smirnov). Para los casos con dos categorías se utilizó la T de

student. En los casos en los que la variable era cualitativa ordinal se empleó la prueba de Kruskal Wallis.

- Comparación de variables categóricas. Para comparar la distribución de las variables categóricas se emplearon las pruebas de χ^2 y OR (*odds ratio*, razón de posibilidades) con los correspondientes intervalos de confianza. Se aplicaron las pruebas exactas de Fisher, Pearson y Monte Carlo para 10^4 permutaciones.

- Significación estadística. Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

4.4.3. Análisis multivariante

Para el estudio simultáneo de múltiples variables se empleó la Regresión Logística Binaria. Este estudio estadístico permite el análisis simultáneo de variables cualitativas y cuantitativas siempre que la variable de referencia sea categórica dicotómica.

4.4.4. Análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron comparadas en las poblaciones estudio y control mediante la plataforma estadística on-line SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>). La frecuencia alélica es la frecuencia con que aparecen cada uno de los alelos y la frecuencia genotípica es la frecuencia con la que aparece un determinado par de alelos, es decir la frecuencia de homocigotos normales, heterocigotos y homocigotos mutados para ese gen (337).

Se realizó el estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante SHEsis, modelo teórico de la genética de poblaciones que se utiliza para predecir la relación entre las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas. La situación de equilibrio se analizó mediante la prueba de χ^2 (338).

4.4.5. Estudio de haplotipos

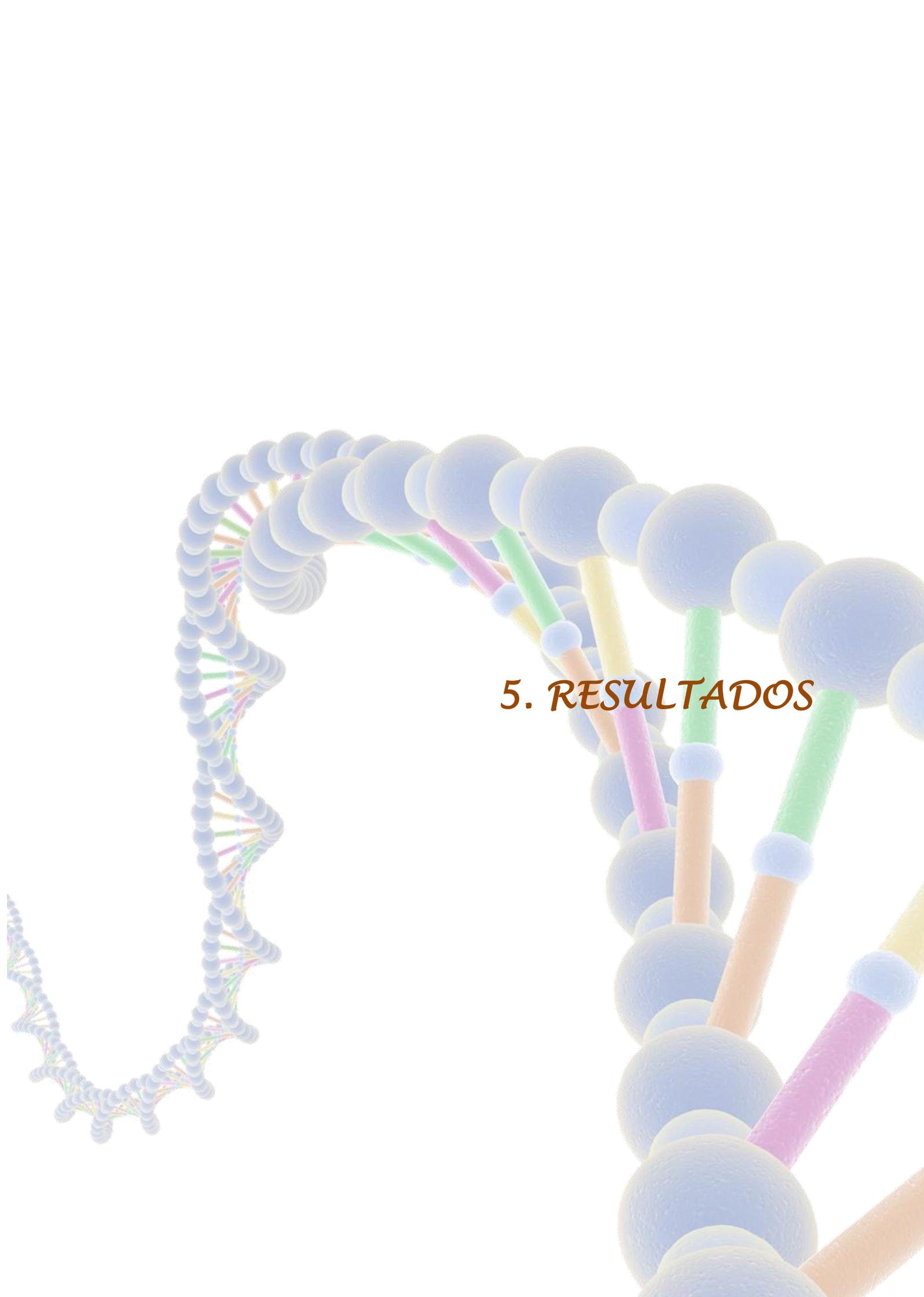
Para el estudio de haplotipos se utilizó el programa estadístico SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) que permite analizar los dos polimorfismos simultáneamente, estudiando la combinación de los cuatro alelos. Este estudio permite determinar las frecuencias de las combinaciones alélicas en los casos y los controles y detectar las posibles diferencias. Este estudio estadístico se basa en la comparación de cada una de las combinaciones alélicas calculadas frente a todas ellas globalmente consideradas. El análisis se realiza considerando aquellas combinaciones con una frecuencia superior al 1%, empleando la simulación de Monte Carlo, la prueba de χ^2 y la razón de *odds*.

4.4.6. Control de calidad del análisis de los datos

En este trabajo se han utilizado los programas estadísticos SPSS versión 15.0. (Chicago, Illinois, EE.UU.) y SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>). El control del análisis de los datos ha sido muy estricto desde el comienzo del estudio. Se realizó un cálculo del tamaño muestral antes de iniciar el estudio mediante el análisis del poder estadístico empleando la plataforma online <http://statpages.org/proppowr.html> que basa sus resultados en el método descrito por Fleiss (339). Inicialmente se tomaron como referencia las frecuencias alélicas de los SNP estudiados en otras poblaciones al carecer de datos propios. Posteriormente se repitió el análisis para los datos propios. Se consideró un poder estadístico adecuado el que superaba el 80% para un error alfa de 0,05.

En este estudio se realizaron múltiples comparaciones, lo que conlleva la posibilidad de aumentar el error de tipo I. Para controlar este posible efecto se aplicó el FPRP o estudio de la probabilidad de emitir un resultado positivo falso (*False Positive Report Probability*) siguiendo el método de Wacholder y cols. (340).

Además para evitar el efecto sesgo de las posibles variables de confusión como la edad o el sexo se empleó también el análisis multivariante basado en la regresión logística binaria.



5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Estadística descriptiva

5.1.1. Características de la población de estudio

Se incluyeron 300 pacientes con asma (150 de ellos incluidos en el Grupo Atópico y otros 150 en el Grupo Intrínseco, por las características del asma que padecen) y 100 controles (sin antecedentes familiares ni personales de asma u otras enfermedades alérgicas).

La media de edad de la muestra fue de $47,9 \pm 17,9$ años, siendo $36,2 \pm 13,2$ en el Grupo Atópico, $56,9 \pm 15,8$ en el Grupo Intrínseco y $52,1 \pm 17,5$ en el Grupo Control (ver Tabla 13).

En cuanto a la distribución por sexos un 40,5% de la muestra eran varones, siendo 53,3% en el Grupo Atópico, 32% en el Grupo Intrínseco y 34% en el Grupo Control (ver Tabla 13).

Tabla 13. Medias de edad y distribución por sexo de los 3 grupos.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco	Grupo Control
Edad (años)	<i>Media</i>	47,9	36,2	56,9	52,1
	<i>Desv. Típica</i>	17,9	13,2	15,8	17,5
	<i>Mediana</i>	48,0	34,0	60,0	55,0
	<i>Mínimo</i>	18	18	18	18
	<i>Máximo</i>	87	78	84	87
	<i>Percentil 25</i>	32,0	26,7	48,0	38,2
	<i>50</i>	48,0	34,0	60,0	55,0
	<i>75</i>	62,7	43,0	69,0	66,0
Sexo (varón)	<i>N</i>	162	80	38	34
	<i>%</i>	40,5%	53,3%	32,0%	34,0%

5.1.2. Antecedentes familiares y personales de interés

Respecto a los antecedentes familiares de atopía, estaban presentes en un 49,3% del Grupo Atópico frente a 30,7% del Grupo Intrínseco, siendo la proporción global de ambos grupos del 40% (ver Tabla 14).

Tabla 14. Antecedentes familiares y personales de interés.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Ant. fam. atopía	<i>N</i>	120	74	46
	%	40,0%	49,3%	30,7%
Dermatitis atópica	<i>N</i>	15	14	1
	%	5,0%	9,3%	0,7%
<i>SCORAD</i>	<i>Media</i>	0,5	0,6	0,0
	<i>Desv. Típica</i>	2,1	2,1	-
	<i>Mediana</i>	0,0	0,0	0,0
	<i>Mínimo</i>	0	0	0
	<i>Máximo</i>	8	8	0
Dermatitis de contacto	<i>N</i>	73	34	39
	%	24,3%	22,7%	26,0%
Alergia alimentaria	<i>N</i>	32	28	4
	%	10,7%	18,7%	2,7%
Alergia a fármacos	<i>N</i>	58	19	39
	%	19,3%	12,7%	26,0%
Hipersensibilidad AINE	<i>N</i>	34	6	28
	%	11,3%	4,0%	18,7%
Psoriasis	<i>N</i>	4	2	2
	%	1,3%	1,3%	1,3%
<i>PASI</i>	<i>Media</i>	1,0	0,0	2,0
	<i>Desv. Típica</i>	2,0	0,0	2,8
	<i>Mediana</i>	0,0	0,0	2,0
	<i>Mínimo</i>	0	0	0
	<i>Máximo</i>	4	0	4
Ictiosis vulgar	<i>N</i>	0	0	0
	%	0%	0%	0%

Con respecto a los antecedentes personales, un 5% padecía dermatitis atópica (con una puntuación en el cuestionario SCORAD de $0,5 \pm 2,1$), un 24,3% dermatitis de contacto, 10,7% alergia alimentaria, 19,3% alergia a fármacos,

11,3% hipersensibilidad a AINE y 1,3% psoriasis (con una puntuación en el cuestionario PASI de $1,0 \pm 2,0$). Ninguno de los pacientes refirió padecer ictiosis vulgar. Se puede ver las proporciones detalladas de estos antecedentes en la Tabla 14.

5.1.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total

En el Grupo Atópico las pruebas cutáneas fueron positivas en el 21,3% solo para alérgenos estacionales (pólenes), en el 15,3% solo para alérgenos perennes (ácaros, hongos, epitelios) y en el 65,3% para alérgenos estacionales y perennes (ver Gráfico 1). La media del número de pruebas cutáneas positivas fue de $6,1 \pm 2,8$ (Ver Tabla 15).

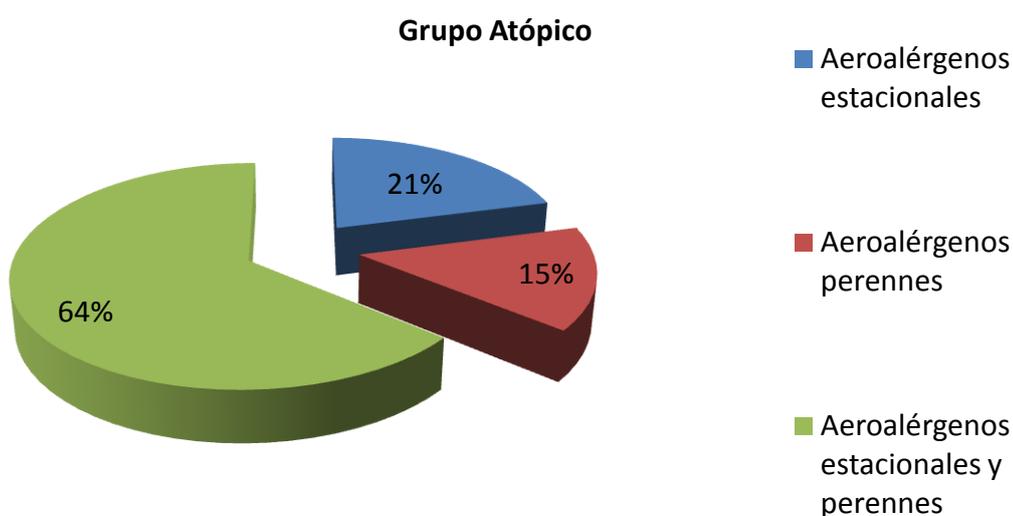


Gráfico 1. Sensibilización a aeroalérgenos del Grupo Atópico.

Debido a los criterios de inclusión ningún sujeto del Grupo Intrínseco ni del Grupo Control presentaba sensibilización a aeroalérgenos.

El valor medio de IgE total fue de $189,6 \pm 384,6$ IU/ml ($379,8 \pm 535,8$ en el Grupo Atópico, $68,6 \pm 117,7$ en el Grupo Intrínseco y $86,0 \pm 235,2$ en el Grupo Control, ver Tabla 16 y Gráfico 2).

Tabla 15. Pruebas cutáneas positivas.

	Grupo Atópico
Aeroalérgenos	
· Estacionales	32 (21,3%)
· Perennes	23 (15,3%)
· Estacionales y perennes	95 (63,3%)
Nº test cutáneos positivos	
<i>Media</i>	6,1
<i>Desv. Típica</i>	2,8
<i>Mediana</i>	6,0
<i>Mínimo</i>	1
<i>Máximo</i>	13
<i>Percentil 25</i>	4,0
50	6,0
75	8,0

Tabla 16. Valores de la IgE total.

	TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco	Grupo Control
IgE (IU/ml) Media	189,6	379,8	68,6	86,0
<i>Desv. Típica</i>	384,6	535,8	117,7	235,2
<i>Mediana</i>	63,4	232,0	31,5	31,4
<i>Mínimo</i>	2,2	11,6	2,2	2,8
<i>Máximo</i>	3840,0	3840,0	959,0	2197,0
<i>Percentil 25</i>	21,1	101,7	12,8	13,2
50	63,4	232,0	31,5	31,4
75	199,5	473,2	64,3	80,9

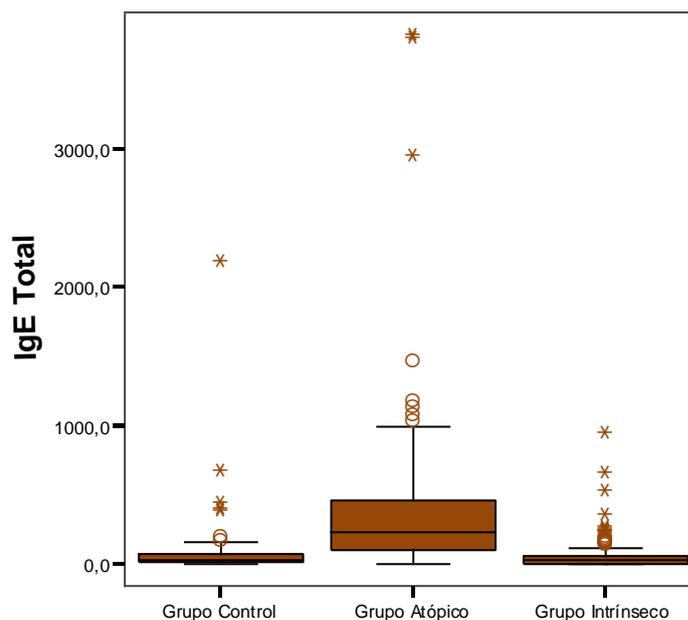


Gráfico 2. Diagrama de cajas de la variable IgE total.

5.1.4. Patología nasosinusal

El 87% de los sujetos (N=261) padecía rinitis, un 94% en el Grupo Atópico (N=141) y un 80% en el Grupo Intrínseco (N=120).

Si se analiza la gravedad de la rinitis según sus respectivas guías se puede observar:

- En el Grupo Atópico, según la clasificación ARIA modificada por Valero y cols. (330), se observó un 16,3% de rinitis alérgica intermitente y un 83,7% de persistente. La gravedad fue: 19,1% leve, 79,4% moderada y 1,4% grave. La gravedad según la clasificación ARIA modificada se distribuyó de la siguiente forma: 7,8% leve intermitente, 11,3% leve persistente, 8,5% moderada intermitente, 70,9% moderada persistente, 0% grave intermitente y 1,4% grave persistente (ver Gráfico 3).

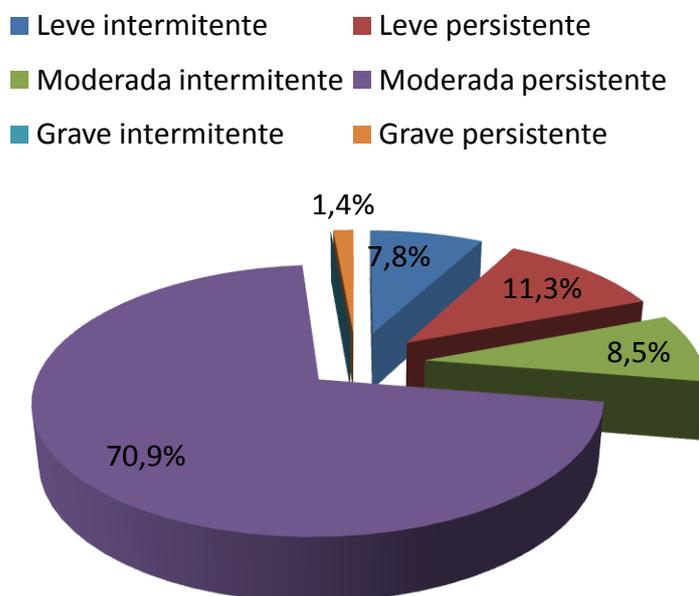


Gráfico 3. Distribución de la rinitis alérgica según la clasificación ARIA modificada.

- En el Grupo Intrínseco 52% de los pacientes presentaba rinosinusitis crónica, siendo su gravedad según la guía EPOS: 23,1% leve, 67,9% moderada y 9% grave (ver Gráfico 4).

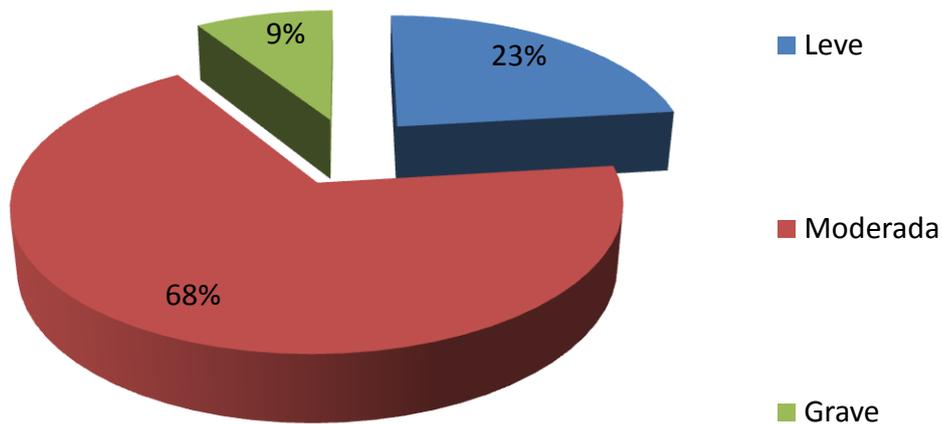


Gráfico 4. Gravedad de la rinosinusitis crónica según la guía EPOS.

El 17% de los pacientes presentaba poliposis nasal (6% en los atópicos y 28% en los intrínsecos, ver Tabla 17) y 12,3% anosmia (8% en los atópicos y 16,7% en los intrínsecos, ver Tabla 17).

Tabla 17. Proporción de poliposis nasal y anosmia.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Poliposis nasal	<i>N</i>	51	9	42
	%	17,0%	6,0%	28,0%
Anosmia	<i>N</i>	37	12	25
	%	12,3%	8,0%	16,7%

5.1.5. Características del asma

Los valores medios de la espirometría observados fueron: FVC $97,2 \pm 16,0$ %; FEV1 $93,0 \pm 17,5$ %; y FEV1/FVC $74,7 \pm 8,6$. La mejoría media del FEV1 en la prueba broncodilatadora fue de $12,81 \pm 9,2$ %. Se pueden observar los valores correspondientes a los 2 grupos en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores de la espirometría.

	TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
FVC (%) <i>Media</i>	97,2	100,9	93,6
<i>Desv. Típica</i>	16,0	13,0	17,9
<i>Mediana</i>	96,0	98,8	92,5
<i>Mínimo</i>	48,1	73,5	48,1
<i>Máximo</i>	146,1	137,5	146,1
<i>Percentil 25 50 75</i>	87,5 96,0 106,4	92,2 98,8 107,7	83,2 92,5 104,9
FEV1 (%) <i>Media</i>	93,0	96,4	89,7
<i>Desv. Típica</i>	17,5	14,2	20,0
<i>Mediana</i>	93,5	96,0	89,1
<i>Mínimo</i>	45,7	52,0	45,7
<i>Máximo</i>	133,6	130,6	133,6
<i>Percentil 25 50 75</i>	82,3 93,5 106,0	87,9 96,0 106,4	73,2 89,1 104,9
FEV1/FVC <i>Media</i>	74,7	76,3	73,0
<i>Desv. Típica</i>	8,6	8,0	8,8
<i>Mediana</i>	75,0	77,0	73,0
<i>Mínimo</i>	45,7	45,7	47,1
<i>Máximo</i>	99,0	94,6	99,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	70,0 75,0 80,8	72,0 77,0 82,0	67,7 73,0 79,0
Mejoria PB <i>Media</i>	12,81	12,56	13,1
<i>Desv. Típica</i>	9,2	8,5	9,8
<i>Mediana</i>	11,3	10,7	12,0
<i>Mínimo</i>	0	1,0	0
<i>Máximo</i>	59,0	49,0	59,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	6,23 11,3 16,6	6,28 10,7 16,2	6,18 12,0 17,2
PEF (%) <i>Media</i>	95,0	99,7	90,3
<i>Desv. Típica</i>	20,7	18,2	22,0
<i>Mediana</i>	95,0	98,8	87,8
<i>Mínimo</i>	39,3	39,3	39,7
<i>Máximo</i>	150,2	146,9	150,2
<i>Percentil 25 50 75</i>	81,6 95,0 109,7	88,9 98,8 112,0	74,7 87,8 106,5
MMEF (%) <i>Media</i>	63,4	69,8	57,1
<i>Desv. Típica</i>	25,7	21,1	28,3
<i>Mediana</i>	62,85	70,1	53,1
<i>Mínimo</i>	13,0	17,0	13,0
<i>Máximo</i>	198,0	149,0	198,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	43,93 62,8 79,2	57,7 70,1 80,6	34,7 53,1 73,5

El valor medio del óxido nítrico exhalado fue de $32,3 \pm 30,8$ ppb (siendo $38,0 \pm 35,3$ ppb en el Grupo Atópico y $26,6 \pm 24,2$ ppb en el Grupo Intrínseco, ver Tabla 19).

Tabla 19. Valores del óxido nítrico exhalado.

	TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
FeNO(ppb) Media	32,3	38,0	26,6
<i>Desv. Típica</i>	30,8	35,3	24,2
<i>Mediana</i>	22,0	26,0	19,0
<i>Mínimo</i>	5	5	5
<i>Máximo</i>	220	220	178
<i>Percentil 25</i>	14,0	15,0	13,0
50	22,0	26,0	19,0
75	41,0	48,0	32,0

Un 6% de los pacientes presentaba asma que empeoraba en el puesto de trabajo, correspondiendo un 5,3% al Grupo Atópico y un 6,7% al Grupo Intrínseco. Un 2% de los pacientes del Grupo Atópico fueron diagnosticados de asma ocupacional. (Ver Tabla 20).

Tabla 20. Proporción de asma ocupacional y que empeora en el puesto de trabajo.

	TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Asma que empeora en el puesto de trabajo	<i>N</i>	18	10
	<i>%</i>	6,0%	6,7%
Asma ocupacional	<i>N</i>	3	0
	<i>%</i>	1%	0%

Al analizar la gravedad del asma según la guía GINA se observó que el 2,7% padecía asma intermitente, el 9% asma persistente leve, el 81,7% asma moderada persistente y el 6,7% asma grave persistente (ver Tabla 21 y Gráfico 5).

Tabla 21. Gravedad según la guía GINA.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Intermitente	N	8	7	1
	%	2,7%	4,7%	0,7%
Persistente leve	N	27	19	8
	%	9,0%	12,7%	5,3%
Moderada persistente	N	245	121	124
	%	81,7%	80,7%	82,7%
Grave persistente	N	20	3	17
	%	6,7%	2,0%	11,3%

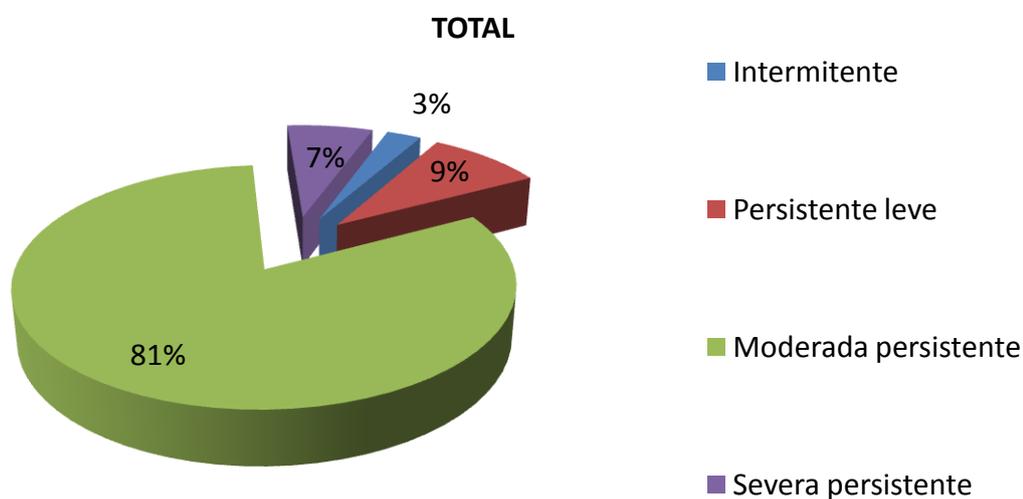


Gráfico 5.a. Gravedad del asma según la guía GINA en ambos grupos.

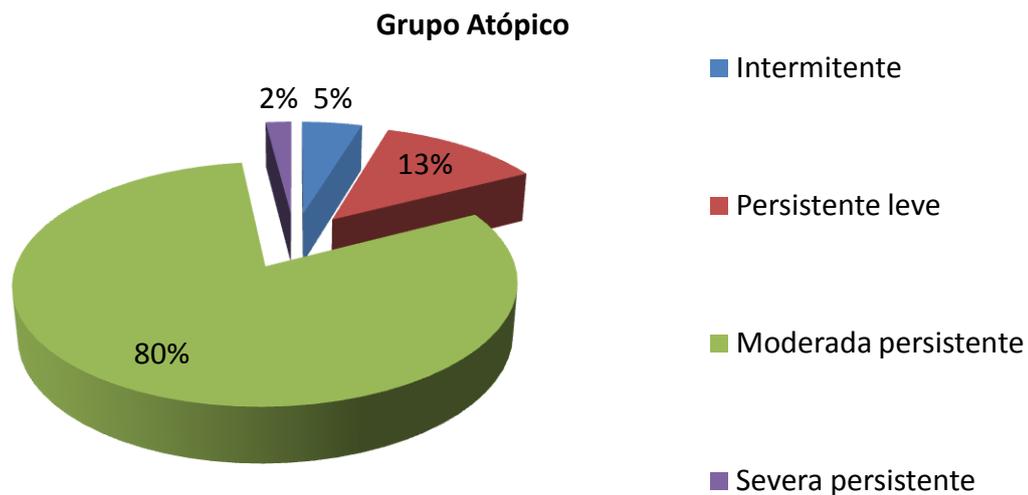


Gráfico 5.b. Gravedad del asma según la guía GINA en el Grupo Atópico.

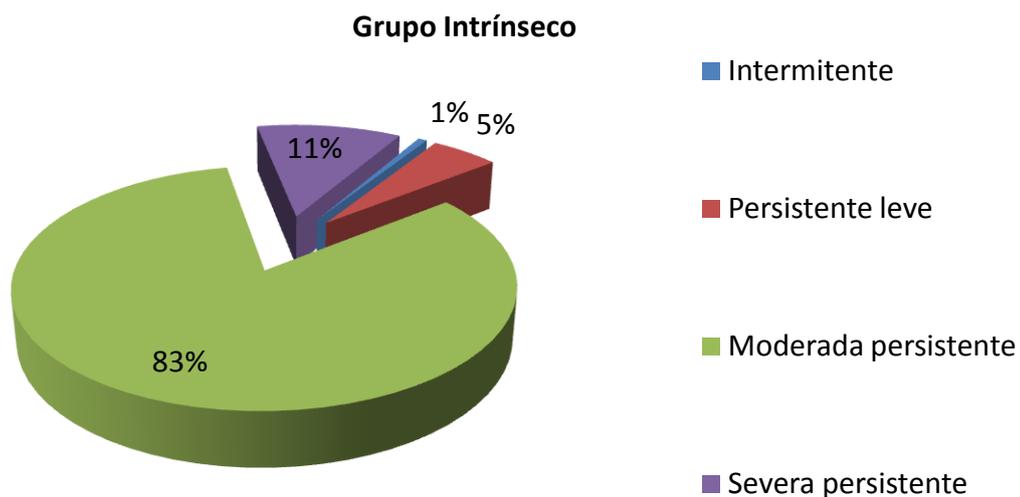


Gráfico 5.c. Gravedad del asma según la guía GINA en el Grupo Intrínseco.

En cuanto al escalón de tratamiento según la guía GINA un 3,3% estaban siendo tratados en esos momentos con el escalón 1, 9% con el escalón 2, 56,7% con el escalón 3, 28,7% con el escalón 4 y 2,3% con el escalón 5 (ver Tabla 22 y Gráfico 6).

Tabla 22. Escalón de tratamiento según la guía GINA.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Escalón 1	N	10	9	1
	%	3,3%	6,0%	0,7%
Escalón 2	N	27	18	9
	%	9,0%	12,0%	6,0%
Escalón 3	N	170	90	80
	%	56,7%	60,0%	53,3%
Escalón 4	N	86	33	53
	%	28,7%	22,0%	35,3%
Escalón 5	N	7	0	7
	%	2,3%	0,0%	4,7%

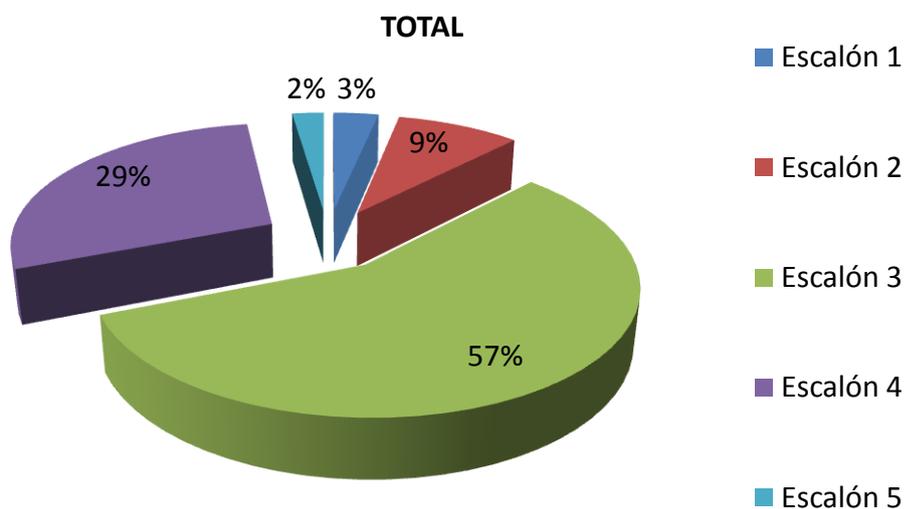


Gráfico 6.a. Escalón de tratamiento según la guía GINA en ambos grupos.

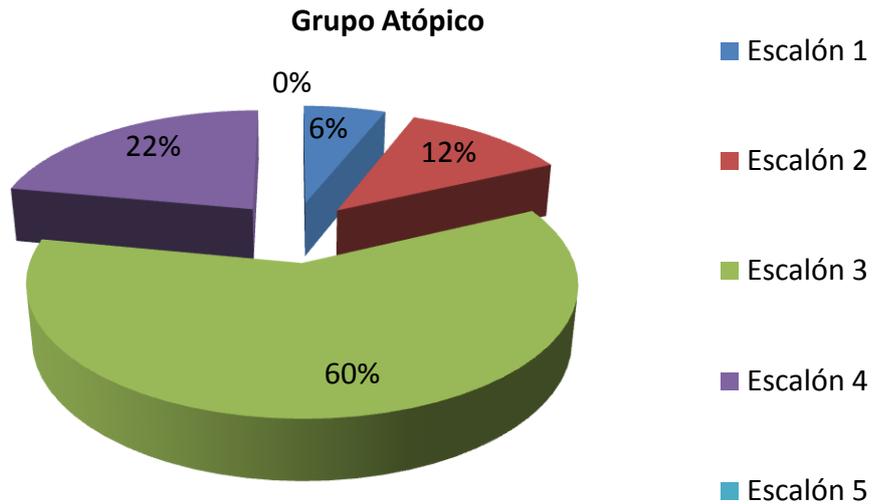


Gráfico 6.b. Escalón de tratamiento según la guía GINA en el Grupo Atópico.

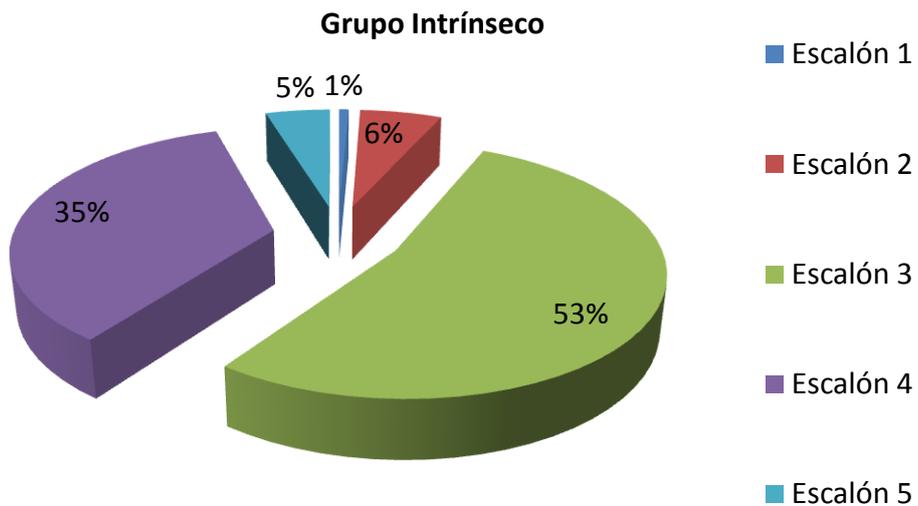


Gráfico 6.c. Escalón de tratamiento según la guía GINA en el Grupo Intrínseco.

Con respecto a la calidad de vida la puntuación media obtenida en el cuestionario miniAQLQ es de $6,1 \pm 0,8$ ($6,1 \pm 0,8$ en atópicos y $6,1 \pm 0,9$ en intrínsecos, ver Tabla 23). En la misma tabla se pueden observar los valores

analizados por los apartados a los que hace referencia el miniAQLQ: síntomas, ambiente, emociones y actividades.

Tabla 23. Valores del cuestionario miniAQLQ y de sus elementos analizados por apartados.

	TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
miniAQLQ Global			
<i>Media</i>	6,1	6,1	6,1
<i>Desv. Típica</i>	0,8	0,8	0,9
<i>Mediana</i>	6,3	6,3	6,3
<i>Mínimo</i>	2,6	3,8	2,6
<i>Máximo</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	5,8 6,3 6,7	5,7 6,3 6,7	5,8 6,3 6,7
miniAQLQ Síntomas			
<i>Media</i>	6,0	6,0	6,0
<i>Desv. Típica</i>	1,2	1,1	1,3
<i>Mediana</i>	6,4	6,2	6,6
<i>Mínimo</i>	1,0	1,6	1,0
<i>Máximo</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	5,4 6,4 7,0	5,3 6,2 7,0	5,6 6,6 7,0
miniAQLQ Ambiente			
<i>Media</i>	5,4	5,5	5,4
<i>Desv. Típica</i>	1,3	1,3	1,4
<i>Mediana</i>	5,3	5,3	5,0
<i>Mínimo</i>	1,7	2,3	1,7
<i>Máximo</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	4,7 5,3 7,0	4,7 5,3 7,0	4,33 5,0 7,0
miniAQLQ Emociones			
<i>Media</i>	6,3	6,3	6,4
<i>Desv. Típica</i>	1,2	1,2	1,2
<i>Mediana</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Mínimo</i>	1,0	1,7	1,0
<i>Máximo</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	6,0 7,0 7,0	6,0 7,0 7,0	6,3 7,0 7,0
miniAQLQ Actividades			
<i>Media</i>	6,6	6,7	6,5
<i>Desv. Típica</i>	0,7	0,5	0,8
<i>Mediana</i>	7,0	7,0	6,7
<i>Mínimo</i>	2,0	4,0	2,0
<i>Máximo</i>	7,0	7,0	7,0
<i>Percentil 25 50 75</i>	6,5 7,0 7,0	6,7 7,0 7,0	6,2 6,7 7,0

La puntuación media en el cuestionario de control de asma ACT fue de $21,6 \pm 4,4$ ($21,6 \pm 3,8$ en atópicos y $21,5 \pm 4,9$ en intrínsecos, ver Tabla 24).

Tabla 24. Valores del cuestionario ACT.

		TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
ACT	<i>Media</i>	21,6	21,6	21,5
	<i>Desv. Típica</i>	4,4	3,8	4,9
	<i>Mediana</i>	23,0	22,5	24,0
	<i>Mínimo</i>	0	9	0
	<i>Máximo</i>	35	35	25
	<i>Percentil 25 50 75</i>	20,0 23,0 25,0	20,0 22,5 25,0	20,0 24,0 25,0

5.2. Análisis bivariante

A continuación se comentarán los resultados que se han obtenido tras el análisis de las asociaciones entre las diferentes variables estudiadas en la muestra poblacional. Se han realizado estudios de asociación entre las variables.

5.2.1. Características de la población de estudio

Se observaron diferencias significativas entre grupos al analizar la edad ($p < 0,001$), siendo ésta mayor en el Grupo Intrínseco ($56,9 \pm 15,8$) que en el Grupo Atópico ($36,2 \pm 13,2$) o Grupo Control ($52,1 \pm 17,5$).

Al analizar la edad de los pacientes asmáticos y de los controles, se observaron diferencias significativas también ($p = 0,007$), siendo la media de edad de los pacientes asmáticos $46,5 \pm 17,9$ y de los controles $52,1 \pm 17,5$.

También se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) al analizar las edades de los pacientes del Grupo Atópico ($36,2 \pm 13,2$) y Grupo Intrínseco ($56,9 \pm 15,8$), siendo mayor en éstos últimos.

Con respecto al sexo se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos ($p < 0,001$), presentando un menor porcentaje de hombres el Grupo Control (34%) y el Grupo Intrínseco (32%) que el Grupo Atópico (53,3%).

No se observaron diferencias significativas ($p = 0,126$ con $OR = 0,69$ e $IC95\% 0,43-1,11$) en el sexo entre los pacientes asmáticos (42,7%) y los controles (34%).

Por el contrario sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$ con $OR = 2,43$ e $IC95\% 1,52-3,88$) al analizar el sexo del Grupo Atópico (53,3%) y Grupo Intrínseco (32%), siendo en el Grupo Atópico mayor la proporción de hombres.

El peso de la diferencias significativa entre controles y pacientes asmáticos en relación a la edad y al sexo ha sido estudiado mediante análisis multivariante de regresión logística.

5.2.2. Antecedentes familiares y personales de interés

Se observaron diferencias significativas entre el Grupo Atópico y el Grupo Intrínseco al analizar los antecedentes familiares de atopia ($p = 0,001$ y $OR 0,45$), los antecedentes de dermatitis atópica ($p = 0,001$ y $OR = 0,06$, sin diferencias significativas en cuanto a la puntuación en el cuestionario SCORAD), alergia alimentaria ($p < 0,001$ y $OR = 0,12$), alergia a fármacos ($p = 0,003$ y $OR = 2,42$) e hipersensibilidad a AINE ($p < 0,001$ y $OR = 5,51$). Ver Tabla 25.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a los antecedentes de dermatitis de contacto ni de psoriasis (sin diferencias significativas tampoco en el cuestionario PASI). Ningún sujeto refirió padecer ictiosis vulgar. Ver Tabla 25.

Tabla 25. Comparación de las variables incluidas dentro de los antecedentes de interés entre el Grupo Atópico y el Grupo Intrínseco.

	p	OR	IC 95%
Antecedentes familiares de atopia	0,001	0,45	0,28-0,73
Dermatitis atópica	0,001	0,06	0,01-0,50
Dermatitis de contacto	0,501	1,20	0,71-2,03
Alergia alimentaria	<0,001	0,12	0,04-0,35
Alergia a fármacos	0,003	2,42	1,32-4,43
Hipersensibilidad a AINE	<0,001	5,51	2,21-13,74
Psoriasis	1	1,00	0,14-7,19
Ictiosis vulgar	-	-	-

5.2.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total

Se observaron diferencias significativas en el valor de IgE total entre los 3 grupos ($p < 0,001$), siendo mayor en el Grupo Atópico ($379,8 \pm 535,8$ IU/ml) que en el Grupo Intrínseco ($68,6 \pm 117,7$ IU/ml) y en el Grupo Control ($86,0 \pm 235,2$ IU/ml). Ver Tabla 26.

Tabla 26. Comparación de los valores de IgE total entre grupos.

	Media \pm Desv.tip. (IU/ml)	p
Grupo Atópico	379,8 \pm 535,8	<0,001
Grupo Intrínseco	68,6 \pm 117,7	
Grupo Control	86,0 \pm 235,2	
Pacientes asmáticos	224,2 \pm 417,4	<0,001
Grupo Control	86,0 \pm 235,2	
Grupo Atópico	379,8 \pm 535,8	<0,001
Grupo Intrínseco	68,6 \pm 117,7	

Al analizar el valor de IgE total de los pacientes asmáticos y de los controles también se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$), siendo mayor en los pacientes asmáticos ($224,2 \pm 417,4$ IU/ml) que en los controles ($86,0 \pm 235,2$ IU/ml). Ver Tabla 26.

También se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el valor de IgE total de los pacientes del Grupo Atópico ($379,8 \pm 535,8$ IU/ml) y del Grupo Intrínseco ($68,6 \pm 117,7$ IU/ml), siendo mayor en los asmáticos alérgicos. Ver Tabla 26.

No se pudo realizar un análisis estadístico de las diferencias entre grupos con respecto a la sensibilización a aeroalérgenos debido a que por los criterios de inclusión del estudio solamente los pacientes del Grupo Atópico presentaban sensibilizaciones.

5.2.4. Patología nasosinusal

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$ y OR 0,25) entre el Grupo Atópico e Intrínseco al analizar la presencia de rinitis (siendo 94% en el Grupo Atópico y 80% en el Grupo Intrínseco). Ver Tabla 27.

Se identificaron también diferencias significativas en la presencia de poliposis nasal ($p < 0,001$ y OR 6,09), siendo mayor en el Grupo Intrínseco (28%) que en el Grupo Atópico (6%). Ver Tabla 27.

También se observaron diferencias significativas al analizar el hecho de padecer anosmia ($p = 0,022$ y OR 2,30), siendo la frecuencia mayor en el Grupo Intrínseco (16,7%) que en el Grupo Atópico (8%). Ver Tabla 27.

Tabla 27. Comparación de las variables rinitis, poliposis nasal y anosmia entre el Grupo Atópico y el Grupo Intrínseco.

	p	OR	IC 95%
Rinitis	<0,001	0,25	0,12-0,56
Poliposis nasal	<0,001	6,09	2,84-13,06
Anosmia	0,022	2,30	1,11-4,77

5.2.5. Características del asma

Se observaron diferencias significativas en todos valores medios de la espirometría entre el Grupo Atópico y el Grupo Intrínseco, salvo en el porcentaje de mejoría del FEV1 en la prueba broncodilatadora (ver Tabla 28).

Se observaron diferencias significativas en el valor medio de óxido nítrico exhalado ($p=0,001$) siendo $38,0 \pm 35,3$ en el Grupo Atópico y $26,6 \pm 24,2$ en el Grupo Intrínseco (ver Tabla 28).

Tabla 28. Comparación de los valores medios de la espirometría y del FeNO.

	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco	p
FVC (%)	$100,9 \pm 13,0$	$93,6 \pm 17,9$	$<0,001$
FEV1 (%)	$96,4 \pm 14,2$	$89,7 \pm 20,0$	$0,001$
FEV1/FVC	$76,3 \pm 8,0$	$73,0 \pm 8,8$	$0,001$
Mejoría en PB (%)	$12,6 \pm 8,5$	$13,1 \pm 9,8$	$0,642$
PEF (%)	$99,7 \pm 18,2$	$90,3 \pm 22,0$	$<0,001$
MMEF (%)	$69,8 \pm 21,1$	$57,1 \pm 28,3$	$<0,001$
FeNO (ppb)	$38,0 \pm 35,3$	$26,6 \pm 24,2$	$0,001$

No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto al asma empeorado en el puesto de trabajo ($p=0,627$ y OR 1,27 con IC95% 0,49-3,31).

Al analizar la gravedad del asma según la guía GINA se observaron diferencias significativas en la gravedad de la enfermedad ($p<0,001$) y en el escalón de tratamiento que requieren los pacientes ($p<0,001$). Ver Tabla 29.

No se observaron diferencias significativas en el cuestionario de control de asma ACT ($p=0,896$), siendo $21,6 \pm 3,8$ en el Grupo Atópico y $21,5 \pm 4,9$ en el Grupo Intrínseco (ver Tabla 30).

Tabla 29. Comparación de la gravedad del asma según la guía GINA.

	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco	p
Intermitente	4,7%	0,7%	<0,001
Persistente leve	12,7%	5,3%	
Moderada persistente	80,7%	82,7%	
Severa persistente	2,0%	11,3%	
Escalón 1	6,0%	0,7%	<0,001
Escalón 2	12,0%	6,0%	
Escalón 3	60,0%	53,3%	
Escalón 4	22,0%	35,3%	
Escalón 5	0,0%	4,7%	

Tampoco se observaron diferencias significativas en el cuestionario de calidad de vida miniAQLQ ($p=0,096$) ni en sus diferentes dominios que hacen referencia a los síntomas, ambiente, emociones y actividades (ver Tabla 30).

Tabla 30. Comparación de los cuestionarios ACT y miniAQLQ.

	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco	p
ACT	21,6 ± 3,8	21,5 ± 4,9	0,896
miniAQLQ Global	6,1 ± 0,8	6,1 ± 0,9	0,096
Dominios miniAQLQ			
· Síntomas	6,0 ± 1,1	6,0 ± 1,3	0,136
· Ambiente	5,5 ± 1,3	5,4 ± 1,4	0,154
· Emociones	6,3 ± 1,2	6,4 ± 1,2	0,138
· Actividades	6,7 ± 0,5	6,5 ± 0,8	0,081

Los resultados estadísticamente significativos del análisis bivalente de todas las variables del estudio se encuentran en el Anexo 2.

5.3. Estudio genético de *FLG*

5.3.1. Nuevos polimorfismos en el gen *FLG*

En este estudio se han identificado por primera vez 4 nuevos polimorfismos no previamente descritos en esta región de la filagrina (c.1594C>T, c.1607T>A, c.1676A>G y c.1747C>A). Estos cuatro polimorfismos localizados en región exónica generan, además, cambios en el aminoácido codificado (ver Tabla 31 e Ilustración 35).

```
cacggaaaggctgggctgagacagcagagccaccaagagtcacacgtggccggtcaggggaacggtctggacgttcagggtcttc  
cctctaccaggtgagcactcatgaacagcctgactctgccatggacggaccggaccagcactggaggaagacaaggatcgcacc  
acgagcaggcaagagacagctccaggcattcagcgtcccaagagggtcaggacaccattcgtggacaccgggggtcaagcagag  
gaggaaggcagggatcccacacagcaatcggaaataggcttgacactcagggtccatcacagccacaccatcccaggg  
aaggtctgatgcctcccattgggcagtcaggatccagaagtgaagcagacaaacgaaatgaggaacaatcaggagacggcaacc  
aggcactcagggtcacgtcatcatgaagcttctcaggctgacagctctagacactcacaggtggccagggacaatcatcggggc  
ccaggacaagtaggaaccaggatccagtgttagccaggacagtgacagtcagggacactcagaagactctgagaggtggtctggg  
tctgctccagaaaccatcatggatctgctcaggagcagtcagagatggctccagacaccccagggtccatcacgaagacagagctg  
gtcatgggactctgcagacagctccagaaaatcaggcactcgtcacacacagaattcctctagtggacagggtcgtcatccatgaa  
caggcaagatcaagtcaggagaaagacatggatcccgccaccagctccagtcagcagacagctccagacactcaggcactgggc  
acggacaagctcatctgcagtcagagacagtgacaccgaggggtccagtggtagtcaggccactgacagtgagggacattcagaa  
gactcagacacacagtcagtgagtcaggccatggacaggctggtcaccatcagcagagccaccaagagtcgacgtgaccggtcag  
gggaaaggctctgacgttcagggtcttctctaccaggtgagcactcataacagctctgagtcctccc
```

Ilustración 35. Fragmento de 1.102 pb amplificado utilizando los cebadores FilH1F3 y RPT2P1 con todas las mutaciones y SNP encontrados. Se muestran en verde los nuevos SNP, en azul los SNP que ya han sido descritos con anterioridad y en amarillo aparecen las dos mutaciones estudiadas.

Además, en nuestra población se han detectado otros 6 polimorfismos previamente descritos pero que no habían sido analizados en pacientes asmáticos (c.1494G>C, c.1560G>A, c.1603T>C, c.1632C>T, c.1741A>T y c.1807G>A), ver Tabla 31 e Ilustración 35.

Las características de cada SNP se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Características de los SNP encontrados en nuestra población. Se muestran en rojo los nuevos SNP identificados así como el cambio en el aminoácido codificado.

SNP		Referencia	Región flanqueante	SNP	Cambio proteína	Frec. alélica descrita*
c.1494G>C	p.E498D	rs13376095	caggcacgagacagctcc	G/C	Glu → Asp	0,0060
c.1560G>A	p.P520P	TMP_ESP_1_152285802	gggtcaagcagaggagg	G/A	Pro → Pro	-
c.1594C>T	p.H532Y		acgagcaatcggtaaata	C/T	His → Tyr	-
c.1603T>C	p.S535P	rs74129464	cggtaaataaggtctgg	T/C	Ser → Pro	0,0156
c.1607T>A	p.V536E		aaataggtctggaca	T/A	Val → Glu	-
c.1632C>T	p.S544S	rs137997325	catcacagccacaccaca	C/T	Ser → Ser	0,0027
c.1676A>G	p.H559R		tgggcagtcaggatccaga	A/G	His → Arg	-
c.1741A>T	p.T581S	rs145627745	ccaggcactcagggtca	A/T	Thr → Ser	0,0023
c.1747C>A	p.H583N		actcagggtcacgtcat	C/A	His → Asn	-
c.1807G>A	p.V603M	rs137995883	tgggccagggacaa	G/A	Val → Met	0,0009

*obtenida de dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)

Las características de los sujetos portadores de estos SNP están reflejadas en la Tabla 32, Tabla 33 y Tabla 34. El SNP c.1741A>T se ha identificado en 5 individuos, el resto solo en uno.

Ningún sujeto portaba simultáneamente más de una variación de las estudiadas (10 SNP y las mutaciones R501X y 2282del4).

Tabla 32. Características de los sujetos que presentan el SNP c.1741A>T.

Sujeto	C-010	I-033	I-113	I-138	I-148
SNP	c.1741A>T	c.1741A>T	c.1741A>T	c.1741A>T	c.1741A>T
Grupo	G.Control	G.Intrínseco	G.Intrínseco	G.Intrínseco	G.Intrínseco
Edad	49	51	65	76	80
Sexo	Femenino	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino
Asma	No	Si	Si	Si	Si
Antecedentes familiares de atopia	No	No	No	No	No
Dermatitis atópica	No	No	No	No	No
Dermatitis de contacto	No	No	No	No	No
Alergia alimentaria	No	No	No	No	No
Alergia a fármacos	No	No	Si (AINE)	No	No
Hipersensibilidad AINE	No	No	Si	No	No
Psoriasis	No	No	No	No	No
Ictiosis vulgar	No	No	No	No	No
Test Cutáneos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos
Nº Test Cutáneos positivos	0	0	0	0	0
IgE Total (UI/ml)	6,4	32,6	112	15,9	174
Rinitis	No	Si	No	No	Si
Rinosinusitis	No	Si	No	No	Si
Intensidad ARIA	-	-	-	-	-
Intensidad EPOS	-	Grave	-	-	Moderada
Anosmia	No	No	No	No	No
Poliposis	No	No	No	No	No
Fenotipo de asma	-	Intrínseco	Intrínseco	Intrínseco	Intrínseco
Asma ocupacional	-	No	No	No	No
Asma empeorada en el trabajo	-	No	No	No	No
FVC (%)	-	89,8	78,1	76,7	56,8
FEV1 (%)	-	86,1	73,4	66,9	65,2
FEV1/FVC	-	72,3	67,9	59,7	76,8
PEF (%)	-	74,5	64,1	56	59,5
MMEF (%)	-	58	40	24	34
Mejoría PB (%)	-	13	19	16	5
FeNO (ppb)	-	70	18	27	21
Severidad GINA	-	Moderada persistente	Moderada persistente	Severa persistente	Moderada persistente
Escalón TTO	-	Escalón 4	Escalón 4	Escalón 5	Escalón 4
miniAQLQ	-	6,1	7	5,9	6,3
ACT	-	22	25	24	19

Tabla 33. Características de los sujetos que presentan los SNP descritos por primera vez en este estudio.

Sujeto	I-046	A-036	A-107	A-116
SNP	c.1594C>T	c.1607T>A	c.1676A>G	c.1747C>A
Grupo	G.Intrínseco	G.Intrínseco	G.Atópico	G.Atópico
Edad	64	36	48	38
Sexo	Femenino	Femenino	Masculino	Masculino
Asma	Si	Si	Si	Si
Antecedentes familiares de atopía	No	No	No	Si
Dermatitis atópica	No	No	No	No
Dermatitis de contacto	Si (níquel)	No	Si (níquel)	No
Alergia alimentaria	No	No	No	Si (frutos secos)
Alergia a fármacos	No	No	No	No
Hipersensibilidad AINE	No	No	No	No
Psoriasis	No	No	No	No
Ictiosis vulgar	No	No	No	No
Test Cutáneos	Negativos	Ag. estacionales y perennes	Ag. estacionales y perennes	Ag. estacionales y perennes
Nº Test Cutáneos positivos	0	7	3	7
IgE Total (UI/ml)	39,8	14,9	16,1	117
Rinitis	No	Si	Si	Si
Rinosinusitis	No	No	No	No
Intensidad ARIA	-	Moderada persistente	Moderada persistente	Moderada persistente
Intensidad EPOS	-	-	-	-
Anosmia	No	No	No	No
Poliposis	No	No	No	No
Fenotipo de asma	Intrínseco	Atópico	Atópico	Atópico
Asma ocupacional	No	No	No	No
Asma empeorada en el trabajo	No	No	No	No
FVC (%)	84,5	120,7	121,6	95,3
FEV1 (%)	66,1	106,1	108,4	82,8
FEV1/FVC	65,4	69,3	73,5	67,5
PEF (%)	86,9	99,3	97,6	93,2
MMEF (%)	25	62	63	49
Mejoría PB (%)	3	9	5	22
FeNO (ppb)	31	9	19	15
Severidad GINA	Moderada persistente	Persistente leve	Moderada persistente	Moderada persistente
Escalón TTO	Escalón 3	Escalón 2	Escalón 4	Escalón 3
miniAQLQ	6,5	5,9	5,5	3,8
ACT	25	19	21	12

Tabla 34. Características de los sujetos que presentan los SNP previamente descritos.

Sujeto	C-095	C-054	I-137	I-004	A-017
SNP	c.1494G>C	c.1560G>A	c.1603T>C	c.1632C>T	c.1807G>A
Grupo	G.Control	G.Control	G.Intrínseco	G.Intrínseco	G.Atópico
Edad	71	54	83	34	28
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino
Asma	No	No	Si	Si	Si
Antecedentes familiares de atopia	No	No	No	No	No
Dermatitis atópica	No	No	No	No	No
Dermatitis de contacto	No	No	No	No	No
Alergia alimentaria	No	No	No	No	Si (frutos secos, marisco, anisakis)
Alergia a fármacos	No	No	No	No	No
Hipersensibilidad AINE	No	No	No	No	No
Psoriasis	No	No	No	No	No
Ictiosis vulgar	No	No	No	No	No
Test Cutáneos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Ag. estacionales y perennes
Nº Test Cutáneos positivos	0	0	0	0	8
IgE Total (UI/ml)	3,0	65,0	11,2	7,8	376
Rinitis	No	No	No	Si	No
Rinosinusitis	No	No	No	Si	No
Intensidad ARIA	-	-	-	-	-
Intensidad EPOS	-	-	-	Moderada	-
Anosmia	No	No	No	No	Si
Poliposis	No	No	No	No	No
Fenotipo de asma	-	-	Intrínseco	Intrínseco	Atópico
Asma ocupacional	-	-	No	No	No
Asma empeorada en el trabajo	-	-	No	No	Si
FVC (%)	-	-	60,1	100,4	93
FEV1 (%)	-	-	45,7	105,9	88,1
FEV1/FVC	-	-	61,1	85,0	75,0
PEF (%)	-	-	39,7	118	96,3
MMEF (%)	-	-	13	92	63
Mejoría PB (%)	-	-	37	0	7
FeNO (ppb)	-	-	22	8	23
Severidad GINA	-	-	Severa persistente	Moderada persistente	Moderada persistente
Escalón TTO	-	-	Escalón 4	Escalón 3	Escalón 3
miniAQLQ	-	-	5,1	7	5,3
ACT	-	-	12	25	23

Las frecuencias genotípicas de los SNP presentes en un solo sujeto de nuestra población están reflejadas en la Tabla 35, Tabla 36 y Tabla 37. Las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP c.1741A>T, presente en 5 sujetos de nuestra población se pueden observar en la Tabla 38.

Tabla 35. Frecuencias genotípicas de c.1494G>C, c.1560G>A y c.1594C>T.

	n	Frecuencia genotípica c.1494G>C			Frecuencia genotípica c.1560G>A			Frecuencia genotípica c.1594C>T		
		GG	GC	CC	GG	GA	AA	CC	CT	TT
TOTAL	400	0,998	0,002	0,000	0,998	0,002	0,000	0,998	0,002	0,000
Grupo Control	100	0,990	0,010	0,000	0,990	0,010	0,000	1,000	0,000	0,000
Grupo Atópico	150	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Grupo Intrínseco	150	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,993	0,007	0,000
Total asmáticos	300	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,997	0,003	0,000

Tabla 36. Frecuencias genotípicas de c.1603T>C, c.1607T>A y c.1632C>T.

	n	Frecuencia genotípica c.1603T>C			Frecuencia genotípica c.1607T>A			Frecuencia genotípica c.1632C>T		
		TT	TC	CC	TT	TA	AA	CC	CT	TT
TOTAL	400	0,998	0,002	0,000	0,998	0,003	0,000	0,998	0,002	0,000
Grupo Control	100	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Grupo Atópico	150	1,000	0,000	0,000	0,993	0,007	0,000	1,000	0,000	0,000
Grupo Intrínseco	150	0,993	0,007	0,000	1,000	0,000	0,000	0,993	0,007	0,000
Total asmáticos	300	0,997	0,003	0,000	0,997	0,003	0,000	0,997	0,003	0,000

Tabla 37. Frecuencias genotípicas de c.1676A>G, c.1747C>A y c.1807G>A.

	n	Frecuencia genotípica c.1676A>G			Frecuencia genotípica c.1747C>A			Frecuencia genotípica c.1807G>A		
		AA	AG	GG	CC	CA	AA	GG	GA	AA
TOTAL	400	0,998	0,002	0,000	0,998	0,002	0,000	0,998	0,002	0,000
Grupo Control	100	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Grupo Atópico	150	0,993	0,007	0,000	0,993	0,007	0,000	0,993	0,007	0,000
Grupo Intrínseco	150	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Total asmáticos	300	0,997	0,003	0,000	0,997	0,003	0,000	0,997	0,003	0,000

Tabla 38. Frecuencias genotípicas y alélicas de c.1741A>T.

	n	Frecuencia genotípica c.1741A>T			Frecuencia alélica c.1741A>T	
		AA	AT	TT	A	T
TOTAL	400	0,987	0,013	0,000	0,994	0,006
Grupo Control	100	0,990	0,010	0,000	0,995	0,005
Grupo Atópico	150	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
Grupo Intrínseco	150	0,973	0,027	0,000	0,987	0,013
Total asmáticos	300	0,987	0,013	0,000	0,993	0,007

5.3.1.1. c.1741A>T

El SNP c.1741A>T (rs145627745) se encuentra en la posición genómica 1741 y consiste en una transición nucleotídica de una adenosina por una timina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 581 del aminoácido treonina (Thr) por una serina (Ser), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.T581S o p.Thr581Ser.

Está presente en 5 sujetos (C-010, I-033, I-113, I-138 e I-148), uno perteneciente al Grupo Control y los otros cuatro al Grupo Intrínseco (cuyas características se pueden ver en la Tabla 32).

Las frecuencias genotípicas y alélicas está reflejada en la Tabla 38.

Al ser tan frecuente este SNP en nuestra población se ha llevado a cabo un análisis estadístico del mismo.

Asociación con el asma

Se ha identificado una asociación estadísticamente significativas entre el fenotipo de asma y c.1741A>T, siendo el alelo mutado más frecuente en los pacientes con asma intrínseca (p genotípica 0,044 y alélica 0,045), ver Tabla 39. Sin embargo, no se ha identificado asociación entre la presencia de asma globalmente considerada y c.1741A>T.

Tabla 39. Frecuencias genotípicas y alélicas de c.1741A>T en función de la presencia de asma, fenotipo de asma, asma empeorada en el puesto de trabajo y asma ocupacional.

	n	Frecuencia genotípica c.1741A>T				Frecuencia alélica c.1741A>T		
		AA	AT	TT	p	A	T	p
Control	100	0,990	0,010	0,000		0,995	0,005	
Asma	300	0,987	0,013	0,000	0,79	0,993	0,007	0,80
Asma atópica vs intrínseca*	150	1,000	0,000	0,000	0,044	1,000	0,000	0,045
	150	0,973	0,027	0,000		0,987	0,013	
Asma empeorada en el trabajo	18	1,000	0,000	0,000	0,67	1,000	0,000	0,67
Asma ocupacional	3	1,000	0,000	0,000	0,86	1,000	0,000	0,86

* p<0,05

Si analizamos los valores de la espirometría forzada y del óxido nítrico exhalado se observan diferencias estadísticamente significativas entre c.1741A>T y el FVC ($97,5 \pm 15,8$ frente a $75,3 \pm 13,7$ de los sujetos con alelo T, $p=0,006$), FEV1 ($93,3 \pm 17,4$ frente a $72,9 \pm 9,5$ de los sujetos con alelo T, $p=0,020$) y PEF ($95,5 \pm 20,5$ frente a $63,5 \pm 8,0$ de los sujetos con alelo T, $p=0,002$), ver Tabla 40. No se observaron diferencias estadísticamente significativas con el resto de valores de la espirometría ni con el óxido nítrico exhalado (Tabla 40).

Tampoco se observaron diferencias significativas con los pacientes que presentan asma empeorada en el puesto de trabajo o asma ocupacional (Tabla 39) ni con la gravedad del asma según la guía GINA y c.1741A>T, pero sí al analizar el escalón de tratamiento que requieren los pacientes según dicha guía ($p=0,004$), ver Tabla 41.

Tabla 40. Asociación estadística entre los valores de la espirometría y óxido nítrico exhalado con c.1741A>T.

Media por genotipo	c.1741A>T		
	AA	AT	p
FVC* (%)	97,5 ± 15,8	75,3 ± 13,7	0,006
FEV1* (%)	93,3 ± 17,4	72,9 ± 9,5	0,020
FEV1/FVC	74,8 ± 8,6	69,2 ± 7,3	0,20
+FEV1 en PBD (%)	12,8 ± 9,2	13,1 ± 5,8	0,94
PEF* (%)	95,5 ± 20,5	63,5 ± 8,0	0,002
MMEF (%)	63,8 ± 25,7	38,9 ± 14,3	0,055
FeNO (ppb)	32,3 ± 30,9	34,0 ± 24,3	0,91

* p<0.05

Tabla 41. Asociación estadística entre la gravedad del asma y el escalón de tratamiento según la guía GINA con c.1741A>T.

Gravedad según la guía GINA	c.1741A>T			
	p	0,16		
	% por genotipo	AA	AT	TT
Intermitente		2,7%	0,0%	0,0%
Persistente leve		9,0%	0,0%	0,0%
Moderada persistente		80,7%	1,0%	0,0%
Grave persistente		6,3%	0,3%	0,0%
Escalón de tratamiento según la guía GINA	p	0,004		
	% por genotipo	AA	AT	TT
Escalón 1		3,3%	0,0%	0,0%
Escalón 2		9,0%	0,0%	0,0%
Escalón 3		56,7%	0,0%	0,0%
Escalón 4		27,7%	1,0%	0,0%
Escalón 5		2,0%	0,3%	0,0%

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control del asma medido mediante el cuestionario ACT, ni con la calidad de vida

medida con el cuestionario miniAQLQ o estudiando cada una de sus dimensiones (Tabla 42).

Tabla 42. Asociación estadística entre el control del asma mediante el cuestionario ACT y la calidad de vida mediante el cuestionario miniAQLQ con c.1741A>T.

Media por genotipo	c.1741A>T		
	AA	AT	p
ACT	21,5 ± 4,4	22,5 ± 2,6	0,67
miniAQLQ global	6,1 ± 0,8	6,3 ± 0,5	0,62
miniAQLQ dominios			
Síntomas	6,0 ± 1,2	6,2 ± 0,6	0,66
Ambiente	5,4 ± 1,3	6,2 ± 1,0	0,22
Emociones	6,3 ± 1,2	6,0 ± 1,6	0,59
Actividades	6,6 ± 0,7	6,7 ± 0,4	0,81

Edad y sexo

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la edad ni el sexo (ver Tabla 43), lo que indica la ausencia de sesgo determinado por dichas variables.

Tabla 43. Frecuencias genotípicas y alélicas de c.1741A>T en función del sexo.

	n	Frecuencia genotípica c.1741A>T				Frecuencia alélica c.1741A>T		
		AA	AT	TT	p	A	T	p
Varones	162	0,987	0,013	0,000	0,98	0,994	0,006	0,98
Mujeres	238	0,988	0,012	0,000		0,994	0,006	

Antecedentes familiares y personales de interés

No se ha encontrado asociación significativa entre c.1741A>T y los antecedentes familiares de atopia, antecedentes personales de dermatitis

atópica, dermatitis de contacto, alergia alimentaria, alergia a fármacos, hipersensibilidad a AINE o psoriasis (ver Tabla 44). En relación con los antecedentes familiares y personales solo se ha encontrado el alelo T en los pacientes con antecedentes personales de alergia a fármacos y de hipersensibilidad a AINE.

Tabla 44. Frecuencias genotípicas y alélicas de c.1741A>T en función de los antecedentes familiares y personales.

	n	Frecuencia genotípica c.1741A>T				Frecuencia alélica c.1741A>T		
		AA	AT	TT	p	A	T	p
Control	100	0,990	0,010	0,000		0,995	0,005	
Ant. fam. atopia	120	1,000	0,000	0,000	0,27	1,000	0,000	0,27
D. atópica	15	1,000	0,000	0,000	0,70	1,000	0,000	0,70
D. contacto	73	1,000	0,000	0,000	0,39	1,000	0,000	0,39
A. alimentaria	32	1,000	0,000	0,000	0,57	1,000	0,000	0,57
A. fármacos	58	0,983	0,017	0,000	0,69	0,991	0,009	0,70
Hipersens. AINE	34	0,971	0,029	0,000	0,42	0,985	0,015	0,42
Psoriasis	4	1,000	0,000	0,000	0,84	1,000	0,000	0,84

Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total

Al pertenecer los pacientes al Grupo Control y Grupo Intrínseco ninguno presentaba sensibilizaciones a aeroalérgenos.

Con respecto al valor de IgE total no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (la media era $191,2 \pm 386,7$ UI/ml en los sujetos con alelo A frente a $68,2 \pm 72,3$ UI/ml de los que presentaban el alelo T, con $p=0,48$).

Patología nasosinusal

Tampoco se observó asociación entre la presencia de c.1741A>T y los antecedentes personales de rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis crónica (Tabla 45).

Tabla 45. Frecuencias genóticas y alélicas de c.1741A>T en relación con los antecedentes personales de rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis crónica.

	n	Frecuencia genotípica c.1741A>T				Frecuencia alélica c.1741A>T		
		AA	AT	TT	p	A	T	p
Control	100	0,990	0,010	0,000		0,995	0,005	
Rinitis	261	0,992	0,008	0,000	0,83	0,996	0,004	0,83
Anosmia	37	1,000	0,000	0,000	0,54	1,000	0,000	0,54
Poliposis	51	1,000	0,000	0,000	0,47	1,000	0,000	0,47
Rinosinusitis	78	0,974	0,026	0,000	0,42	0,987	0,013	0,42

Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad de la rinosinusitis crónica medida según criterios de la guía EPOS y el SNP c.1741A>T (Tabla 46). Por las características de los pacientes no había pacientes con rinitis alérgica.

Tabla 46. Asociación estadística entre la intensidad de la rinosinusitis según la guía EPOS y c.1741A>T.

Intensidad guía EPOS	p	c.1741A>T		
		AA	AT	TT
		0,11		
	% por genotipo	AA	AT	TT
Leve		23,1%	0,0%	0,0%
Moderada		66,7%	1,3%	0,0%
Grave		7,7%	1,3%	0,0%

El análisis mediante la plataforma ExPASy Prosite del cambio proteico que produce este SNP indica que éste se localiza exactamente en un sitio de miristoilación que podría tener repercusión funcional (ver Ilustración 36).

Según el análisis llevado a cabo mediante SNPeffect este SNP no afecta a la tendencia a la agregación (TANGO), a la tendencia amiloidea (WALTZ), o a la unión a chaperonas (LIMBO) de la proteína.

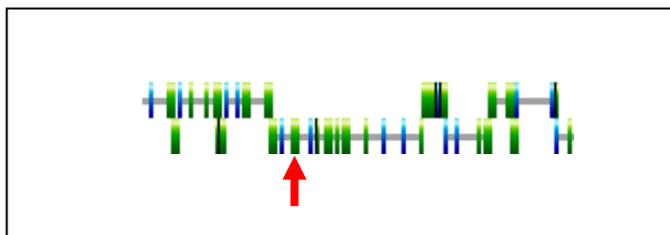


Ilustración 36. Esquema obtenido de ExPASy Prosite de sitios de actividad. La flecha roja indica el lugar en el que se encuentra T581S y H583N.

5.3.1.2. c.1747C>A

El SNP c.1747C>A (no descrito hasta el momento) se encuentra en la posición genómica 1747 y consiste en una transición nucleotídica de una citosina por una adenosina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 583 del aminoácido histidina (His) por una asparagina (Asn), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.H583N o p.His583Asn.

Al analizar mediante ExPASy Prosite el cambio proteico que produce este SNP se observó también la localización en otro sitio de miristoilación con lo que también podría tener repercusión funcional (ver Ilustración 36). No se observaron otros datos de interés.

Según el análisis llevado a cabo mediante SNPeffect este SNP no afecta a la tendencia a la agregación (TANGO), a la tendencia amiloidea (WALTZ), o a la unión a chaperonas (LIMBO) de la proteína.

Está presente en el sujeto A-116 perteneciente al Grupo Atópico (cuyas características se pueden ver en la Tabla 33).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 37.

5.3.1.3. c.1594C>T

El SNP c.1594C>T (no descrito hasta el momento) se encuentra en la posición genómica 1594 y consiste en una transición nucleotídica de una citosina

por una timina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 532 del aminoácido histidina (His) por una tirosina (Tyr), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.H532Y o p.His532Tyr.

Al analizar mediante ExPASy Prosite el cambio proteico que produce este SNP no se observó ningún dato de interés.

Según el análisis llevado a cabo mediante SNPeffect este SNP tampoco afecta a la tendencia a la agregación (TANGO), a la tendencia amiloidea (WALTZ), o a la unión a chaperonas (LIMBO) de la proteína.

Está presente en el sujeto I-046 perteneciente al Grupo Intrínseco (cuyas características se pueden ver en la Tabla 33).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 35.

5.3.1.4. c.1607T>A

El SNP c.1607T>A (no descrito hasta el momento) se encuentra en la posición genómica 1607 y consiste en una transición nucleotídica de una timina por una adenosina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 536 del aminoácido valina (Val) por un ácido glutámico (Glu), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.V536E o p.Val536Glu.

Está presente en el sujeto A-036 perteneciente al Grupo Atópico (cuyas características se pueden ver en la Tabla 33).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 36.

5.3.1.5. c.1676A>G

El SNP c.1676A>G (no descrito hasta el momento) se encuentra en la posición genómica 1676 y consiste en una transición nucleotídica de una adenosina por una guanina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 559 del aminoácido histidina (His) por una arginina (Arg), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.H559R o p.His559Arg.

Está presente en el sujeto A-107 perteneciente al Grupo Atópico (cuyas características se pueden ver en la Tabla 33).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 37.

5.3.1.6. c.1494G>C

El SNP c.1494G>C (rs13376095) se encuentra en la posición genómica 1494 y consiste en una transición nucleotídica de una guanina por una citosina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 498 del aminoácido ácido glutámico (Glu) por un ácido aspártico (Asp), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.E498D o p.Glu498Asp.

Está presente en el sujeto C-095 perteneciente al Grupo Control (cuyas características se pueden ver en la Tabla 34).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 35.

5.3.1.7. c.1560G>A

El SNP c.1560G>A (TMP_ESP_1_152285802) se encuentra en la posición genómica 1560 y consiste en una transición nucleotídica de una guanina por una adenosina. En la proteína no conlleva ningún cambio en la posición 520 dado que ambos codones codifican para el aminoácido prolina (Pro), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.P520P o p.Pro520Pro (o p.Pro520=).

Está presente en el sujeto C-054 perteneciente al Grupo Control (cuyas características se pueden ver en la Tabla 34).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 35.

5.3.1.8. c.1603T>C

El SNP c.1603T>C (rs74129464) se encuentra en la posición genómica 1603 y consiste en una transición nucleotídica de una timina por una citosina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 535 del aminoácido serina (Ser) por una prolina (Pro), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.S535P o p.Ser535Pro.

Está presente en el sujeto I-137 perteneciente al Grupo Intrínseco (cuyas características se pueden ver en la Tabla 34).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 36.

5.3.1.9. c.1632C>T

El SNP c.1632C>T (rs137997325) se encuentra en la posición genómica 1632 y consiste en una transición nucleotídica de una citosina por una timina. En la proteína no conlleva ningún cambio en la posición 544 dado que ambos codones codifican el aminoácido serina (Ser), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.S544S o p.Ser544Ser (o p.Ser544=)

Está presente en el sujeto I-004 perteneciente al Grupo Intrínseco (cuyas características se pueden ver en la Tabla 34).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 36.

5.3.1.10. c.1807G>A

El SNP c.1807G>A (rs137995883) se encuentra en la posición genómica 1807 y consiste en una transición nucleotídica de una guanina por una adenosina. En la proteína conlleva un cambio en la posición 603 del aminoácido valina (Val) por una metionina (Met), por lo que este SNP también puede ser nombrado como p.V603M o p.Val603Met.

Está presente en el sujeto A-017 perteneciente al Grupo Atópico (cuyas características se pueden ver en la Tabla 34).

La frecuencia genotípica está reflejada en la Tabla 37.

Ninguno de los cambios inducidos por los SNP c.1594C>T, c.1607T>A, c.1676A>G, c.1494G>C, c.1603T>C y c.1807G>A presentó modificación en los dominios de actividad analizados con el ExpASy ni tendencia de agregación, amiloidea o de unión a chaperonas con los estudio TANGO, WALTZ ni LIMBO.

Para los SNP c.1560G>A y c.1632C>T no se realizó estudio de Expasy por no codificar cambio en el aminoácido.

5.3.2. Estudio de las mutaciones R501X y 2282del4

En nuestra población todos los pacientes que presentaban las mutaciones analizadas portaban el alelo mutado en heterocigosis. El análisis de la mutación R501X ha permitido identificar el alelo T en heterocigosis en el 1,5% de los sujetos estudiados (2% en el Grupo Atópico, 0,7% en el Grupo Intrínseco y 2% en el Grupo Control, ver Tabla 47).

Tabla 47. Frecuencias genotípicas y alélicas de R501X en los diferentes grupos.

	n	Frecuencia genotípica R501X			Frecuencia alélica R501X	
		CC	CT	TT	C	T
TOTAL	400	0,985	0,015	0,000	0,993	0,007
Grupo Control	100	0,980	0,020	0,000	0,990	0,010
Grupo Atópico	150	0,980	0,020	0,000	0,990	0,010
Grupo Intrínseco	150	0,993	0,007	0,000	0,997	0,003
Total asmáticos	300	0,987	0,013	0,000	0,993	0,007

La delección 2282del4 se identificó en heterocigosis en el 0,5% de los individuos de todos los grupos (0% en el Grupo Atópico, 0,7% en el Grupo Intrínseco y 1% en el Grupo Control, ver Tabla 48).

La presencia de al menos una de estas mutaciones se detectó en el 2% de los sujetos estudiados (2% en el Grupo Atópico, 1,4% en el Grupo Intrínseco

y 3% en el Grupo Control). Las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas mutaciones en los distintos grupos estudiados aparecen reflejadas en la Tabla 47 y Tabla 48.

Tabla 48. Frecuencias genotípicas y alélicas de 2282del4 en los diferentes grupos.

	n	Frecuencia genotípica 2282del4			Frecuencia alélica 2282del4	
		NN*	ND	DD	N	D
TOTAL	400	0,995	0,005	0,000	0,997	0,003
Grupo Control	100	0,990	0,010	0,000	0,995	0,005
Grupo Atópico	150	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
Grupo Intrínseco	150	0,993	0,007	0,000	0,997	0,003
Total asmáticos	300	0,997	0,003	0,000	0,998	0,002

* N alelo normal, no mutado, D alelo delecionado

Las características clínicas de los sujetos portadores de los alelos mutados se muestran en la Tabla 49 y Tabla 50).

Tabla 49. Características de los sujetos del Grupo Control que presentaban mutaciones.

Sujeto	C-001	C-022	C-045
Mutación	Heterocigoto R501X	Heterocigoto R501X	Heterocigoto 2282del4
Grupo	G.Control	G.Control	G.Control
Edad	70	70	33
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
IgE Total (UI/ml)	12,0	3,5	17,5

5.3.2.1. Características de la población de estudio

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes en relación con la edad ni con el sexo (Tabla 51 y Tabla 52) lo que indica la ausencia de sesgo determinado por dichas variables.

Tabla 50. Características de los pacientes asmáticos portadores de las mutaciones.

Sujeto	A-138	A-139	A-140	I-112	I-131
Mutación	Heterocigoto R501X	Heterocigoto R501X	Heterocigoto R501X	Heterocigoto R501X	Heterocigoto 2282del4
Grupo	G.Atópico	G.Atópico	G.Atópico	G.Intrínseco	G.Intrínseco
Edad	67	42	24	52	52
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino	Femenino
Asma	Si	Si	Si	Si	Si
Antecedentes familiares de atopía	No	No	Si	Si	No
Dermatitis atópica	No	No	No	No	No
Dermatitis de contacto	No	No	Si (níquel)	No	No
Alergia alimentaria	No	No	No	No	No
Alergia a fármacos	No	No	No	No	No
Hipersensibilidad AINE	No	No	No	No	No
Psoriasis	No	No	No	No	No
Ictiosis vulgar	No	No	No	No	No
Test Cutáneos	Ag Estacionales y Perennes	Ag Estacionales	Ag Perennes	Negativos	Negativos
Nº Test Cutáneos positivos	6	6	1	0	0
IgE Total (UI/ml)	1.150,0	399,0	52,9	11,3	7,7
Rinitis	No	Si	Si	Si	Si
Rinosinusitis	No	No	No	Si	Si
Intensidad ARIA	-	Moderada persistente	Leve intermitente	-	-
Intensidad EPOS	-	-	-	Moderada	Moderada
Anosmia	No	No	No	No	No
Poliposis	No	No	No	No	No
Fenotipo de asma	Atópico	Atópico	Atópico	Intrínseco	Intrínseco
Asma ocupacional	No	No	No	No	No
Asma empeorada en el trabajo	No	No	No	No	Si
FVC (%)	80,8	106,2	92,6	61,2	88,2
FEV1 (%)	54,7	96,1	98,1	66,8	78,4
FEV1/FVC	48,7	70,0	86,6	82,1	68,4
PEF (%)	44,9	80,1	97,2	95,7	97,7
MMEF (%)	27	60	78	60	35
Mejoría PB (%)	21	10	5	13	13
FeNO (ppb)	11	32	34	13	5
Severidad GINA	Severa persistente	Persistente leve	Moderada persistente	Moderada persistente	Moderada persistente
Escalón TTO	Escalón 4	Escalón 2	Escalón 3	Escalón 4	Escalón 3
miniAQLQ	6,2	5,9	6,7	6,1	6,7
ACT	22	23	23	25	25

Tabla 51. Frecuencias genotípicas y alélicas de R501X en función del sexo.

	n	Frecuencia genotípica R501X				Frecuencia alélica R501X		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Varones	162	0,988	0,012	0,000	0,71	0,994	0,006	0,72
Mujeres	238	0,983	0,017	0,000		0,992	0,008	

Tabla 52. Frecuencias genotípicas y alélicas de 2282del4 en función del sexo.

	n	Frecuencia genotípica 2282del4				Frecuencia alélica 2282del4		
		NN	ND	DD	p	N	D	p
Varones	162	1,000	0,000	0,000	0,24	1,000	0,000	0,24
Mujeres	238	0,992	0,008	0,000		0,996	0,004	

No se observó ningún varón portador de la delección 2282del4.

5.3.2.2. Antecedentes familiares y personales de interés

No se ha encontrado asociación significativa entre las mutaciones estudiadas y los antecedentes familiares de atopia, antecedentes personales de dermatitis atópica, dermatitis de contacto, alergia alimentaria, alergia a fármacos, hipersensibilidad a AINE o psoriasis (Tabla 53). De hecho, el genotipo CT solo se detectó en el grupo con antecedentes familiares de atopia y en el de dermatitis de contacto. Además, para el caso de la delección no se observó la presencia del alelo T en ningún caso en los pacientes con estos antecedentes.

5.3.2.3. Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total

En este estudio tampoco se observó asociación estadística entre las mutaciones estudiadas y el valor de IgE total (Tabla 54), ni el número de test cutáneos positivos en las pruebas de alergia ni con el tipo de aeroalérgeno que produce la sensibilización (Tabla 55) aunque el más frecuente fue el del grupo de aeroalérgenos perennes.

Tabla 53. Frecuencias genotípicas y alélicas de R501X en función de los antecedentes familiares y personales.

	n	Frecuencia genotípica R501X				Frecuencia alélica R501X		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Control	100	0,980	0,020	0,000		0,990	0,010	
Ant.fam.atopia	120	0,983	0,017	0,000	0,85	0,992	0,008	0,85
D. atópica	15	1,000	0,000	0,000	0,58	1,000	0,000	0,58
D. contacto	73	0,986	0,014	0,000	0,75	0,993	0,007	0,75
A. alimentaria	32	1,000	0,000	0,000	0,42	1,000	0,000	0,42
A. fármacos	58	1,000	0,000	0,000	0,28	1,000	0,000	0,28
Hipersens.AINE	34	1,000	0,000	0,000	0,41	1,000	0,000	0,41
Psoriasis	4	1,000	0,000	0,000	0,77	1,000	0,000	0,78

Tabla 54. Media de IgE total según el genotipo de las mutaciones en los distintos grupos de pacientes.

Media por genotipo	R501X			2282del4		
	CC	CT	p	NN	ND	p
IgE total (UI/ml)	188,4±383,9	271,5±456,6	0,60	190,5±385,3	12,6±6,9	0,51

Tabla 55. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones estudiadas en relación con el tipo de aeroalérgeno.

	n	Frecuencia genotípica R501X				Frecuencia alélica R501X		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Control	100	0,980	0,020	0,000		0,990	0,010	
Ag.estacion	32	0,969	0,031	0,000	0,71	0,984	0,016	0,71
Ag.perenn	23	0,957	0,043	0,000	0,51	0,978	0,022	0,51
Ag.est y per	95	0,989	0,011	0,000	0,59	0,995	0,005	0,59
	n	Frecuencia genotípica 2282del4				Frecuencia alélica 2282del4		
		NN	ND			NN	ND	
Control	100	0,990	0,010			0,995	0,005	
Ag.estacion	32	1,000	0,000	Ag.estacion	32	1,000	0,000	Ag.estacion
Ag.perenn	23	1,000	0,000	Ag.perenn	23	1,000	0,000	Ag.perenn
Ag.est y per	95	1,000	0,000	A.est y per	95	1,000	0,000	A.est y per

5.3.2.4. Patología nasosinusal

Tampoco se encontró asociación entre la presencia de las mutaciones y los antecedentes personales de rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis crónica (Tabla 56 y Tabla 57).

Tabla 56. Frecuencias genotípicas y alélicas de R501X en relación con los antecedentes personales de rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis crónica.

	n	Frecuencia genotípica R501X				Frecuencia alélica R501X		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Control	100	0,980	0,020	0,000		0,990	0,010	
Rinitis	261	0,989	0,011	0,000	0,54	0,994	0,006	0,54
Anosmia	37	1,000	0,000	0,000	0,39	1,000	0,000	0,39
Poliposis	51	1,000	0,000	0,000	0,31	1,000	0,000	0,31
Rinosinusitis	78	0,987	0,013	0,000	0,71	0,994	0,006	0,71

Tabla 57. Frecuencias genotípicas y alélicas de 2282del4 en relación con los antecedentes personales de rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis crónica.

	n	Frecuencia genotípica 2282del4				Frecuencia alélica 2282del4		
		NN	ND	DD	p	N	D	p
Control	100	0,990	0,010	0,000		0,995	0,005	
Rinitis	261	0,996	0,004	0,000	0,48	0,998	0,002	0,48
Anosmia	37	1,000	0,000	0,000	0,54	1,000	0,000	0,54
Poliposis	51	1,000	0,000	0,000	0,47	1,000	0,000	0,47
Rinosinusitis	78	0,987	0,013	0,000	0,86	0,994	0,006	0,86

Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad de la rinitis alérgica determinada según criterios de la guía ARIA modificada y las mutaciones estudiadas (Tabla 58). Ni entre la intensidad de la rinosinusitis crónica medida según criterios de la guía EPOS y las mutaciones estudiadas (Tabla 58).

Tabla 58. Asociación estadística entre la intensidad según las guías ARIA y EPOS y las mutaciones estudiadas.

		R501X			2282del4		
Intensidad guía ARIA modificada	p	0,27			-		
	% por genotipo	CC	CT	TT	NN	ND	DD
	Leve intermitente	7,1%	0,7%	0,0%	7,8%	0,0%	0,0%
	Leve persistente	11,3%	0,0%	0,0%	11,3%	0,0%	0,0%
	Moderada intermitente	8,5%	0,0%	0,0%	8,5%	0,0%	0,0%
	Moderada persistente	70,2%	0,7%	0,0%	70,9%	0,0%	0,0%
	Grave intermitente	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Grave persistente	1,4%	0,0%	0,0%	1,4%	0,0%	0,0%
Intensidad guía EPOS	p	0,77			0,77		
	% por genotipo	CC	CT	TT	NN	ND	DD
	Leve	23,1%	0,0%	0,0%	23,1%	0,0%	0,0%
	Moderada	66,7%	1,3%	0,0%	66,7%	1,3%	0,0%
	Grave	9,0%	0,0%	0,0%	9,0%	0,0%	0,0%

5.3.2.5. Características del asma

En relación con la presencia de asma tampoco se identificó asociación con las mutaciones estudiadas, ni siquiera cuando se realizó el análisis por fenotipo atópico e intrínseco. (Tabla 59 y Tabla 60). Tampoco existieron diferencias significativas con los pacientes que presentaban asma empeorada en el puesto de trabajo o asma ocupacional (Tabla 59 y Tabla 60).

Al analizar los valores de la espirometría forzada y del óxido nítrico exhalado tampoco se encontraron diferencias significativas con las mutaciones estudiadas (Tabla 61).

Tabla 59. Frecuencias genotípicas y alélicas de R501X en función de la presencia de asma, fenotipo de asma, asma empeorada en el puesto de trabajo y asma ocupacional.

	n	Frecuencia genotípica R501X				Frecuencia alélica R501X		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Control	100	0,980	0,020	0,000		0,990	0,010	
Asma	300	0,987	0,013	0,000	0,63	0,993	0,007	0,64
Asma atópica vs intrínseca	150	0,980	0,020	0,000	0,31	0,990	0,010	0,32
	150	0,993	0,007	0,000		0,997	0,003	
Asma empeorada en el trabajo	18	1,000	0,000	0,000	0,54	1,000	0,000	0,55
Asma ocupacional	3	1,000	0,000	0,000	0,80	1,000	0,000	0,81

Tabla 60. Frecuencias genotípicas y alélicas de 2282del4 en función de la presencia de asma, fenotipo de asma, asma empeorada en el puesto de trabajo y asma ocupacional.

	n	Frecuencia genotípica 2282del4				Frecuencia alélica 2282del4		
		NN	ND	DD	p	N	D	p
Control	100	0,990	0,010	0,000		0,995	0,005	
Asma	300	0,997	0,003	0,000	0,41	0,998	0,002	0,41
Asma atópica vs intrínseca	150	1,000	0,000	0,000	0,32	1,000	0,000	0,32
	150	0,993	0,007	0,000		0,997	0,003	
Asma empeorada en el trabajo	18	0,944	0,056	0,000	0,17	0,972	0,028	0,17
Asma ocupacional	3	1,000	0,000	0,000	0,86	1,000	0,000	0,86

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la gravedad del asma que padecen los pacientes ni el escalón de tratamiento según la guía GINA con las mutaciones estudiadas (Tabla 62). Tampoco existieron diferencias significativas entre el control del asma medido mediante el cuestionario ACT, ni con la calidad de vida medida con el cuestionario miniAQLQ global o estudiando cada una de sus dimensiones (Tabla 63).

Tabla 61. Asociación estadística entre los valores de la espirometría y óxido nítrico exhalado con las mutaciones estudiadas.

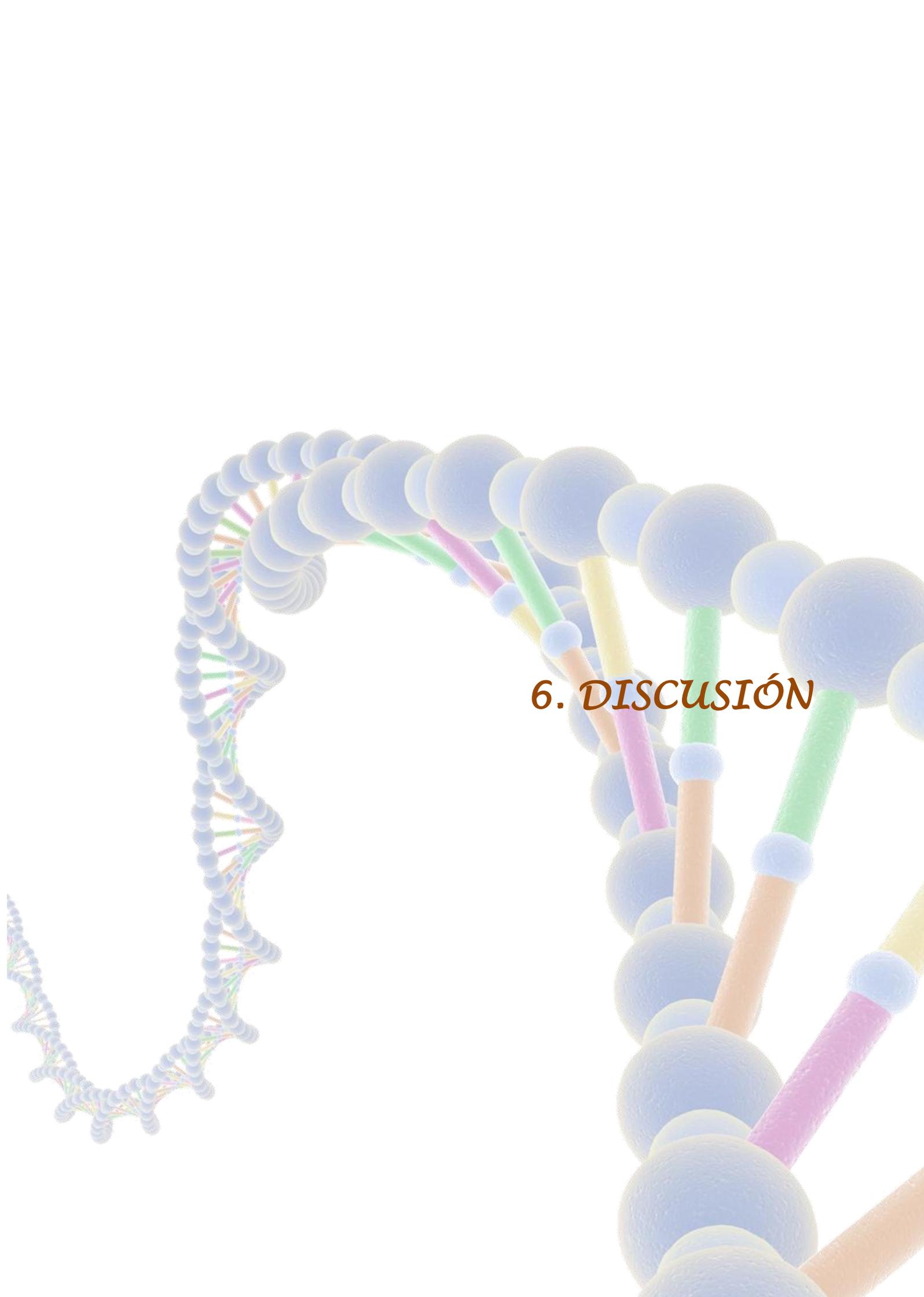
Media por genotipo	R501X			2282del4		
	CC	CT	p	NN	ND	p
FVC (%)	97,4 ± 15,9	85,2 ± 19,1	0,13	97,3 ± 16,0	88,2 ± 0	0,57
FEV1 (%)	93,2 ± 17,4	78,9 ± 21,6	0,10	93,1 ± 17,5	78,4 ± 0	0,40
FEV1/FVC	74,7 ± 8,4	71,8 ± 17,0	0,76	74,7 ± 8,6	68,4 ± 0	0,46
Mejoría en PB (%)	12,8 ± 9,2	12,2 ± 6,7	0,90	12,81 ± 9,2	12,7 ± 0	0,99
PEF (%)	95,2 ± 20,6	79,5 ± 24,3	0,13	95,02 ± 20,7	97,7 ± 0	0,90
MMEF (%)	63,5 ± 25,8	56,1 ± 21,4	0,57	63,5 ± 15,7	34,5 ± 0	0,26
FeNO (ppb)	32,5 ± 30,9	22,5 ± 12,2	0,52	32,4 ± 30,7	5,0 ± 0	0,37

Tabla 62. Asociación estadística entre la gravedad del asma y el escalón de tratamiento según la guía GINA con las mutaciones estudiadas.

Gravedad según la guía GINA	p	R501X			2282del4		
		CC	CT	TT	NN	ND	DD
		0,82			0,90		
	% por genotipo	CC	CT	TT	NN	ND	DD
Intermitente		2,7%	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%	0,0%
Persistente Leve		8,7%	0,3%	0,0%	9,0%	0,0%	0,0%
Moderada persistente		81,0%	0,7%	0,0%	81,3%	0,3%	0,0%
Grave persistente		6,3%	0,3%	0,0%	6,7%	0,0%	0,0%
Escalón de tratamiento según la guía GINA	p	0,77			0,72		
	% por genotipo	CC	CT	TT	NN	ND	DD
Escalón 1		3,3%	0,0%	0,0%	3,3%	0,0%	0,0%
Escalón 2		8,7%	0,3%	0,0%	9,0%	0,0%	0,0%
Escalón 3		56,3%	0,3%	0,0%	56,3%	0,3%	0,0%
Escalón 4		28,0%	0,7%	0,0%	28,7%	0,0%	0,0%
Escalón 5		3,3%	0,0%	0,0%	3,3%	0,0%	0,0%

Tabla 63. Asociación estadística entre el control de asma mediante el cuestionario ACT y la calidad de vida mediante el cuestionario miniAQLQ con las mutaciones estudiadas.

Media por genotipo	R501X			2282del4		
	CC	CT	p	NN	ND	p
ACT	21,5 ± 4,4	23,2 ± 1,3	0,44	21,6 ± 4,4	25,0 ± 0	0,43
miniAQLQ global	6,1 ± 0,8	6,2 ± 0,3	0,77	6,1 ± 0,8	6,7 ± 0	0,50
miniAQLQ dominios						
Síntomas	6,0 ± 1,2	5,8 ± 0,7	0,80	6,0 ± 1,2	6,8 ± 0	0,49
Ambiente	5,4 ± 1,3	5,8 ± 1,0	0,54	5,4 ± 1,3	6,0 ± 0	0,67
Emociones	6,3 ± 1,2	6,6 ± 0,8	0,76	6,3 ± 1,2	6,7 ± 0	0,77
Actividades	6,6 ± 0,7	6,8 ± 0,2	0,55	6,6 ± 0,7	7,0 ± 0	0,58



6. *DISCUSIÓN*

6. DISCUSIÓN

6.1. Características de la muestra estudiada

Hemos incluido en el estudio dos grupos de pacientes asmáticos con fenotipo bien diferenciado y que presentaban características muy diferentes. El método de selección aleatoria, con la elección de pacientes consecutivos (pacientes que acudían a revisión a la consulta, cumplían los criterios de inclusión y que aceptaban participar en el estudio) hace que las características de nuestra muestra sean un reflejo bastante fiel de los pacientes asmáticos que son seguidos en un servicio de alergia español.

Edad y sexo

En nuestro estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos al analizar la **edad**, siendo ésta mayor en el Grupo Intrínseco ($56,9 \pm 15,8$ años), que en el Grupo Atópico ($36,2 \pm 13,2$ años). También existieron diferencias estadísticamente significativas con el Grupo Control ($52,1 \pm 17,5$).

Con respecto al **sexo** se han encontrado diferencias significativas entre el Grupo Atópico (53,3% varones) y Grupo Intrínseco (32% varones). La proporción de varones de ambos grupos es 42,7%, sin existir diferencias significativas con el Grupo Control (34%).

Estas cifras contrastan con las obtenidas en el estudio clínico-epidemiológico Alergológica-2005 (341, 342) llevado a cabo en España, en el que la media de edad de los pacientes asmáticos fue $26,97 \pm 16,66$ años (con un rango de 1 a 86 años), pero no con el sexo, cuya proporción fue de 44,6% varones (47,4% en asma alérgica y 34,6% en intrínseca). Estas diferencias de edad media con el estudio Alergológica se deben casi con total seguridad a la imposibilidad de incluir pacientes menores de edad en nuestro estudio por requerimiento expreso del Comité de Ética del I.A.C.S., que aprobó la realización

del mismo y a la metodología de selección de pacientes en el Grupo Control (en general, pacientes que acudían a consulta de alergia para estudio de medicamentos). En Alergológica-2005 (341) también se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar los pacientes que acudían para estudio de alergia a medicamentos ($41,4 \pm 19,4$ años frente a $32,11 \pm 18,4$ de la muestra general).

Estas diferencias significativas en la edad (mayor en el Grupo Intrínseco) y de sexo (menor proporción de varones en el Grupo Intrínseco) se encuentran también en otros estudios (343-346).

Antecedentes familiares y personales

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar los **antecedentes familiares de atopia** (49,3% en el Grupo Atópico y 30,7% en el Grupo Intrínseco, siendo del 40% en ambos grupos). En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) los pacientes asmáticos referían antecedentes familiares en 42,2% de asma, 36,3% de rinitis, 14,4% de conjuntivitis y 6,7% de dermatitis atópica. No diferenciaron entre atópicos y no atópicos.

Se encontraron diferencias significativas entre grupos al estudiar los antecedentes personales de **dermatitis atópica** (5% de ambos grupos, 9,3% en el Grupo Atópico y 0,7% en el Grupo Intrínseco), **alergia alimentaria** (10,7% en ambos grupos, 18,7% en el Grupo Atópico y 2,7% del Grupo Intrínseco) y de **alergia a fármacos** (19,3% de ambos grupos, 12,7% en el Grupo Atópico y 26% en el Grupo Intrínseco). En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) los pacientes asmáticos referían antecedentes personales de dermatitis atópica en el 12,5% y de alergia alimentos en el 4%.

En cuanto a la **hipersensibilidad a AINE** existían diferencias significativas entre los grupos de nuestro estudio (11,3% del total de pacientes, 4% del Grupo Atópico y 18,7% del Grupo Intrínseco). En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) un 1,3% de los pacientes asmáticos presentaba hipersensibilidad a AINE, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con asma alérgica (0,4%) y los de asma intrínseca (5,6%).

Los estudios de prevalencia de la intolerancia a AINE en pacientes asmáticos muestran resultados bastante discordantes. Estas diferencias son muy probablemente debidas a dos causas: la primera está relacionada con el método de selección de la muestra estudiada ya que los resultados pueden depender, por ejemplo, de que se estudie una población asmática general o asmáticos graves asistidos en un hospital; en segundo lugar, los números varían dependiendo del método utilizado para realizar el diagnóstico. Si el diagnóstico se establece por criterios clínicos, el porcentaje de enfermos diagnosticados del síndrome, será inferior al obtenido cuando el diagnóstico se realiza mediante una prueba de provocación. Giraldo y cols. (347) aplicando criterios clínicos, detectaron hipersensibilidad a AINE en el 3% de los asmáticos. En otro estudio, McDonald y cols. (348) estimaron la prevalencia del fenómeno en un 10-16% de los asmáticos. Chafee y Settipane (349), en un estudio realizado en pacientes que acudían a una consulta de alergia, hallaron que un 4,3% de sus asmáticos presentaban hipersensibilidad a AINE cuando el diagnóstico se establecía mediante criterios clínicos, aumentando esta prevalencia al 6,8% cuando se empleaba la provocación oral. En un estudio prospectivo, estos mismos autores hallaron una prevalencia del 3,8% (350). Castillo y Picado (351) estudiaron la prevalencia de hipersensibilidad a AINE en asmáticos ingresados en el hospital y en pacientes procedentes de la consulta externa y hallaron una prevalencia del 16% por criterios clínicos y del 19% cuando se usaba la prueba de provocación oral. La sensibilidad de la historia clínica para el diagnóstico fue del 71% y la especificidad del 97%. La prevalencia era mayor en el subgrupo de pacientes ingresados que en los visitados en la consulta externa (30% frente a 7,9%). Estudios realizados recientemente en la población general han mostrado prevalencias de asma con hipersensibilidad a AINE del 4,3% en Polonia (352), del 8,8% en Finlandia (353) y del 10% en Australia (354).

En nuestro estudio no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre grupos al analizar antecedentes personales de **dermatitis de contacto, psoriasis o ictiosis vulgar**.

Sensibilización a aeroalérgenos y valor de IgE total

El resultado de las **pruebas cutáneas de alergia** en el Grupo Atópico mostraba que el 21,3% de los pacientes estaban sensibilizados exclusivamente a aeroalérgenos estacionales (pólenes), 15,3% para aeroalérgenos perennes (ácaros, hongos y epitelios) y que el 65,3% estaban sensibilizados a aeroalérgenos estacionales y perennes. En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) los pacientes estaban sensibilizados a nivel global de toda España en un 43,8% a pólenes, un 41,4% a ácaros, un 19,6% a epitelios y un 8,4% a hongos, pero si analizamos los datos referentes la Comunidad Autónoma de Aragón la proporción se asemeja más a la de nuestro estudio (28,6-60,7% estaban sensibilizados a los diferentes pólenes, 3,6-7,1% a ácaros 17,9% a epitelios y 10,7% a hongos ambientales).

En cuanto al **valor de IgE total** sérica existieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos, siendo mayor en el Grupo Atópico ($379,8 \pm 535,8$ IU/ml) que en el Grupo Intrínseco ($68,6 \pm 117,7$ IU/ml) y en el Grupo Control ($86,0 \pm 235,2$ IU/ml). También existieron diferencias significativas entre el valor medio global de los pacientes asmáticos ($224,2 \pm 417,4$ IU/ml) y los controles. Estos datos concuerdan con los observados en multitud de estudios dado que la atopia es, probablemente, el principal determinante de los niveles de IgE sérica total en las poblaciones de los países desarrollados (355).

Patología nasosinusal

Los pacientes asmáticos presentaban **rinitis** en un 87% a nivel global, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos (siendo del 94% en el Grupo Atópico y del 80% en el Grupo Intrínseco).

Estas cifras contrastan con las obtenidas en el estudio Alergológica-2005 (341, 342), siendo en este estudio solo el 36,7% (39,5% en los asmáticos alérgicos y 29,9% en los intrínsecos), hecho que llamó la atención a los propios autores, dado que otros estudios epidemiológicos previos cifran la frecuencia de esta asociación en torno a un 70-90% (356-358). Estas diferencias pueden tener

su explicación en determinados sesgos de los estudios y, sobre todo, en el método utilizado para el diagnóstico de la rinitis y del asma. A este respecto, los alergólogos participantes en el estudio Alergológica-2005 (341, 342) pudieron seguir unos criterios más restrictivos a la hora de diagnosticar la rinitis, hecho que se argumenta porque en el propio estudio Alergológica-2005 se puede apreciar que el 67,2% de los pacientes diagnosticados de asma habían acudido al especialista con síntomas nasales en los motivos de consulta.

Un 17% de los asmáticos habían sido diagnosticados previamente de **poliposis nasal**, encontrando diferencias significativas entre los dos grupos (6% en el Grupo Atópico y 28% en el Grupo Intrínseco). Al analizar la presencia de **anosmia** también existieron diferencias significativas entre los grupos (12,3% a nivel global, con 8% en el Grupo Atópico y 16,7% en el Grupo Intrínseco).

En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) se observó una presencia menor de poliposis nasal, siendo ésta 2,7% (0,9% en los asmáticos alérgicos y 10,8% en los intrínsecos). En el Documento POLINA de Consenso sobre Poliposis Nasal de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica y de la Sociedad Española de Otorrinolaringología (359) se refiere que las cifras de prevalencia en población general oscilan entre un 0,2% y un 5,6% dependiendo de si el diagnóstico se realiza mediante un cuestionario o mediante endoscopia nasal, pero pudiendo llegar a 26-32% si el estudio se realiza de forma sistemática en autopsias. Además refieren que esta incidencia está modificada por factores asociados como tabaquismo, alergia, asma, hipersensibilidad a AINE o factores genético-hereditarios.

Recientemente se ha llevado cabo un estudio multicéntrico en España en 67 unidades de alergia (360). De los 671 pacientes con poliposis nasal incluidos un 66% presentaban asma y un 26% hipersensibilidad a AINE. Se observó una mayor gravedad de la rinitis en pacientes intrínsecos y una mayor gravedad del asma en pacientes alérgicos.

En un estudio realizado por Ceylan y cols. (361) en 342 pacientes asmáticos, los investigadores observaron que el 9% padecía poliposis nasal y que la presencia de esta patología se asociaba con una mayor gravedad del asma. Estos mismos autores manifiestan que estos datos concuerdan con los

obtenidos en otros estudios que cifran la presencia de poliposis nasal en pacientes asmáticos en un 4 al 32% (cifra que aumenta al 48-95% en pacientes asmáticos con hipersensibilidad a AINE).

Asimismo los pacientes que presentan poliposis nasal presentan una mayor prevalencia de asma (21-48,9%) e hiperreactividad bronquial (20-35%) según diversos estudios (359).

Características del asma

Existieron diferencias estadísticamente significativas en todos los **valores medios de la espirometría** entre el Grupo Atópico y el Grupo Intrínseco, salvo en el porcentaje de mejoría del FEV1 en la prueba broncodilatadora. Estos valores fueron menores en el Grupo Intrínseco que en el Grupo Atópico (como por ejemplo el FVC que fue $93,6 \pm 17,9$ frente a $100,9 \pm 13,0$), indicando un mayor deterioro funcional del asma en los pacientes con asma intrínseca.

Asimismo también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en cuanto a la **gravedad del asma** según la guía GINA (los pacientes del Grupo Atópico presentan una gravedad menor) y en el **escalón de tratamiento** que requieren los pacientes según la misma guía (los pacientes del Grupo Atópico requieren escalones más bajos de tratamiento).

De forma clásica, se ha comentado la mayor gravedad del asma intrínseca frente a la alérgica y su peor pronóstico, pero este tema es controvertido en la bibliografía. Unger (362) ya en 1936 analizó un grupo de 147 pacientes con asma alérgica y 60 con asma intrínseca y observó que el 29% de los pacientes alérgicos había estado asintomático durante al menos 1 año, en comparación con un 5% de los pacientes con asma intrínseca. Pearson (363) y Ogilvie (364) describieron que los pacientes con asma alérgica presentaban menor gravedad del asma que los intrínsecos. Ulrik y cols. (344) siguieron una cohorte de pacientes asmáticos durante 10 años y encontraron un descenso mayor en la función pulmonar en el Grupo Intrínseco. Romanet-Manent y cols. (343), en su estudio que incluía 122 pacientes con asma alérgica y 43 con asma intrínseca, hallaron un menor FEV1 en los asmáticos intrínsecos, así como una

mayor puntuación en un cuestionario de gravedad elaborado de forma específica para dicho estudio. En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) también se objetivó que los pacientes con asma alérgica presentaban una menor gravedad de la enfermedad con respecto a los intrínsecos.

Por el contrario, Rackemann y Edwards (365), en 1952, volvieron a evaluar a 688 pacientes con asma después de 20 años y encontraron que una mayor proporción de pacientes con asma intrínseca no presentaba en ese momento asma (62% frente a 24% de los alérgicos). Inouye y cols. (346) compararon la gravedad del asma entre los asmáticos con pruebas cutáneas positivas y negativas y no encontraron diferencias significativas entre los dos grupos. Cline y cols. (366) tampoco encontraron diferencias significativas en el FEV1 o en la gravedad del asma entre asmáticos con pruebas cutáneas positivas y negativas. Palmer y Kelman (345) no encontraron diferencias significativas en los parámetros fundamentales de la espirometría (aunque sí en el Volumen Residual [RV o VR] y en su cociente con la capacidad pulmonar total [RV/TLC]) al analizar 292 asmáticos alérgicos y 63 intrínsecos.

Curiosamente, en nuestro estudio, a pesar de haber encontrado diferencias significativas en la gravedad del asma determinada según la guía GINA, al analizar el **control del asma** y la **calidad de vida** de los pacientes, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el cuestionario de control de asma ACT ni en el cuestionario de calidad de vida miniAQLQ.

Al analizar el grado de inflamación bronquial mediante la **fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO)** se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, siendo los valores más elevados en el Grupo Atópico ($38,0 \pm 35,3$ ppb frente a $26,6 \pm 24,2$ ppb del Grupo Intrínseco).

Este hecho concuerda con otros estudios llevados a cabo por Gratziou y cols. (367), Adisesh y cols. (368) y Silvestri y cols. (369) en los que objetivan también un valor mayor de óxido nítrico exhalado en los pacientes con asma alérgica frente a los que presentan asma intrínseca, aunque algunos autores lo achacan directamente a la atopia (370).

En nuestro estudio, un 6% de los pacientes presentaba **asma que empeoraba en el puesto de trabajo**, sin diferencias significativas entre los dos grupos (5,3% en el Grupo Atópico y un 6,7% en el Grupo Intrínseco). Un 2% de los pacientes del Grupo Atópico fueron diagnosticados de **asma ocupacional**.

En el estudio Alergológica-2005 (341, 342) se observó un porcentaje similar de pacientes con asma ocupacional (1,2% del total). Esta cifra contrasta con los datos publicados por otros estudios, que indican que alrededor del 10-15% de los casos de asma tiene un origen laboral (371), y también con los datos del ECRHS, que muestran que el porcentaje de casos de asma en adultos jóvenes debida al trabajo oscila entre el 5% y el 10% (372). En el subgrupo de pacientes españoles del mismo estudio, el riesgo de asma atribuible a exposición laboral era del 5% al 6,7% (373). No obstante, hay que tener en cuenta que en los estudios epidemiológicos realizados en la población general no se diferencia el asma inducida por la exposición laboral (asma ocupacional propiamente) del asma empeorada en el puesto de trabajo, con lo que ambas entidades se engloban bajo el término más amplio de “asma relacionada con el trabajo”. Los casos de asma ocupacional descritos en nuestro estudio (y probablemente también los aportados por los alergólogos del estudio Alergológica-2005) corresponden a pacientes con asma ocupacional bien demostrada.

Asociaciones estadísticas entre todas las variables

Hemos encontrado una serie de asociaciones estadísticas obtenidas del análisis bivalente de todas las variables del estudio que al ser asociaciones ampliamente aceptadas por múltiples trabajos corroboran la validez de nuestra muestra.

Como se ha comunicado previamente (374) se han encontrado diferencias significativas entre el **sexo y la dermatitis de contacto** en ambos grupos, siendo más frecuente en las mujeres (28,6% frente al 3,1% de los hombres).

La **edad y los valores de la espirometría** presentaban un coeficiente de correlación de signo negativo (mayores valores de edad se correlacionaban con menores valores de espirometría), sugiriendo el deterioro de la función pulmonar

que ocurre con los años. Del mismo modo el coeficiente entre la **edad y el óxido nítrico exhalado** también presentaba signo negativo.

Concuerda con estudios previos (375) que los **antecedentes familiares de atopia** se asociasen con los **antecedentes personales de dermatitis atópica, dermatitis de contacto, alergia alimentaria, rinitis y con valores superiores de IgE total**.

También existieron diferencias estadísticamente significativas entre padecer o haber padecido **dermatitis atópica** y los **antecedentes familiares de atopia, los antecedentes personales de dermatitis de contacto, alergia alimentaria o rinitis, menor edad y mayores valores de IgE total**, al igual que se ha descrito en otras ocasiones (375).

Los antecedentes personales de **alergia alimentaria** se asociaron en nuestro estudio a los **antecedentes familiares de atopia y los antecedentes personales de rinitis y dermatitis atópica, con menor edad y con mayores valores de IgE total**, hecho que concuerda con lo referido en la bibliografía (375). La **alergia a fármacos** presentaba una asociación estadística con **mayor edad** y con la rinitis, anosmia, poliposis nasal y rinosinusitis (probablemente debido a la asociación de la hipersensibilidad a AINE con estas variables).

La presencia de **rinitis** se asoció con los **antecedentes familiares de atopia, antecedentes personales de dermatitis atópica, dermatitis de contacto, alergia alimentaria e hipersensibilidad a AINE y con valores mayores de óxido nítrico exhalado (34,4 ppb de media frente a 18,6 ppb) y de IgE total**.

La **gravedad del asma según la guía GINA** estuvo, lógicamente, asociada con el **escalón de tratamiento según la misma guía, mayor edad, peor función pulmonar y peores puntuaciones en los cuestionarios miniAQLQ y ACT**.

El **cuestionario miniAQLQ** para evaluar la calidad de vida en pacientes asmáticos se correlacionó de forma directamente proporcional con los valores de **FEV1, PEF** y puntuación del **cuestionario ACT** y de forma inversamente proporcional con los valores de **óxido nítrico exhalado**. Los pacientes que

presentaban **asma ocupacional** o **asma empeorada en el trabajo** presentaban valores significativamente menores en este cuestionario.

El **cuestionario ACT** para evaluar el control del asma se correlacionó de forma directamente proporcional con los valores de **FEV1**, **FEV1/FVC**, **PEF**, **MMEF** y puntuación del **cuestionario miniAQLQ** y de forma inversamente proporcional con los **valores de óxido nítrico exhalado**.

Otras asociaciones estadísticas encontradas y que no son corroboradas por otros trabajos deben ser tenidas en cuenta con cautela debido a que este estudio no ha sido diseñado para valorar la asociación entre todas sus variables.

6.2. Estudio genético

Las mutaciones del gen de la filagrina han demostrado tener gran importancia en la ictiosis vulgar (290) y en la dermatitis atópica (291, 293-311), pero no está clara su relación con el asma (291, 295-297, 300, 303, 305-308, 310-312, 314-320). Existe una gran controversia sobre la posible asociación con el asma y no está claro si la asociación detectada en algunos estudios se debe a la propia presencia de asma o a la influencia del eczema o dermatitis atópica en los sujetos que tienen asma asociado a estas enfermedades dermatológicas.

Nuestro estudio ha sido elaborado desde el primer momento para evaluar la influencia de estas mutaciones del gen de la filagrina en el asma y la posible importancia de la atopia en dicha asociación.

En este estudio hemos identificado por primera vez polimorfismos que no habían sido descritos previamente en el gen de la filagrina. Resulta muy interesante destacar que uno de los polimorfismos identificados en este trabajo, que no ha sido previamente analizado en ningún otro estudio, c.1741A>T, presenta una asociación con el asma intrínseca, en concreto con los grados más graves del asma. De hecho, los pacientes portadores del alelo T presentaron valores de la espirometría FVC, FEV1 y PEF significativamente menores y el escalón de tratamiento requerido fue superior.

No podemos comparar esta situación en otras poblaciones ya que somos los primeros en describir esta asociación. Sin embargo merece destacar que se han aplicado los oportunos controles del estudio estadístico, descartando la probabilidad de sesgo debida a covariantes como la edad y el sexo y que el poder estadístico para este tamaño muestral fue superior al 75% llegando en el caso del PEF y de FEV1 casi al 100%.

Además, es importante mencionar que todos los pacientes portadores del alelo mutado presentaron un escalón superior al 3 de tratamiento con una probabilidad de emitir un resultado positivo falso (FPRP) casi nula. Sin embargo, no en todos los casos el FPRP fue bajo, lo que junto a la escasa frecuencia alélica detectada en nuestra muestra nos hace considerar la necesidad de otros estudios en poblaciones más amplias para confirmar su implicación como biomarcador.

Este SNP genera una modificación en el aminoácido codificado pasando de treonina a serina. Esta modificación se localiza en un motivo de miristoilación de la proteína. La miristoilación de proteínas tiene lugar cuando se produce la transferencia de un grupo miristoilo al grupo amino de la glicina de una secuencia proteica específica, utilizando como sustrato Myr-CoA. Se asume que la miristoilación es un proceso irreversible y que ocurre co-traduccionalmente. De hecho la miristoilación de proteínas aumenta su hidrofobicidad por lo podría tener repercusión funcional.

Se han identificado otros 9 polimorfismos; cuatro de ellos c.1594C>T, c.1607T>A, c.1676A>G y c.1747C>A se describen por primera vez en este estudio. Si bien no se han identificado asociaciones clínicas, quizá debido a la baja frecuencia de aparición al menos en nuestra población.

Por lo que respecta a las mutaciones estudiadas en nuestro trabajo (R501X y 2282del4) no se han identificado asociadas a ninguna de las características clínico-biológicas de los pacientes.

Estas mutaciones fueron las primeras descritas en el gen de la filagrina por Smith y cols. (290) asociadas a la ictiosis vulgar, que es una enfermedad dermatológica caracterizada por la alteración en la queratinización provocada por

un descenso o ausencia de la expresión de la filagrina en la piel. Esta proteína es clave para la diferenciación de la epidermis y la formación del estrato córneo. Este estrato constituye la capa más externa de la piel, que previene de la pérdida de agua por la epidermis e impide la entrada de alérgenos, sustancias químicas tóxicas y gérmenes (272). Estas mutaciones, funcionalmente, se consideran alelos nulos al dar lugar a un fragmento N-terminal enormemente truncado de la preproteína profilagrina, lo que provoca una pérdida de producción de filagrina en la piel. Su herencia es semidominante, es decir, el gen dominante no domina totalmente sobre el gen recesivo y, por ello, en el fenotipo de los individuos heterocigotos se observan efectos del gen recesivo, el cual queda parcialmente enmascarado. Como resultado, los heterocigotos para alguna de las mutaciones no tienen ningún fenotipo discernible o tienen ictiosis leve, mientras que los homocigotos mutados y los heterocigotos compuestos (heterocigotos para las dos mutaciones) tienen una marcada ictiosis con un defecto histológico evidente de la barrera cutánea (290).

Posteriormente, estas dos mutaciones se asociaron con la dermatitis atópica por diversos autores. El primero de ellos fue el de Palmer y cols. (291), pero han sido muchos los que posteriormente han encontrado una asociación entre la presencia de estas mutaciones y la dermatitis atópica (293-311).

Se han identificado más de 20 mutaciones distintas de la filagrina (292) que provocan una alteración de su expresión cutánea, pero R501X y 2282del4 han sido las más estudiadas y, en muchas ocasiones, son las únicas analizadas en trabajos actuales.

Frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población

La población incluida en nuestro estudio no mostraba diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes en relación con la **edad** ni con el **sexo** para evitar un posible sesgo determinado por dichas variables.

No se encontró ningún paciente varón portador de la delección 2282del4, probablemente debido a la baja frecuencia encontrada en nuestra población.

El análisis de la mutación **R501X** ha permitido identificar el alelo T exclusivamente en heterocigosis. No se encontró ningún paciente homocigoto para esta mutación. La frecuencia alélica detectada en nuestra población fue inferior a la obtenida en estudios poblacionales europeos (291) tanto irlandeses/escoceses y franceses como en norteamericanos con origen europeo. En estudios poblacionales no europeos, no se encuentra esta mutación en norteafricanos, chinos, japoneses o indios (291).

Del mismo modo, la delección 2282del4 se identificó también solo en heterocigosis, con una frecuencia también inferior a la obtenida en los mismos estudios poblacionales europeos (291). En los estudios de asociación de población no caucásica (291) tampoco se ha encontrado esta mutación, excepto con escasa incidencia en la población india.

Merece la pena destacar que en nuestra población no se identificó ningún caso heterocigoto compuesto (heterocigoto para las dos mutaciones), por lo que en los resultados hemos analizado también el grupo de pacientes portadores de al menos una de las dos mutaciones.

La menor frecuencia poblacional observada de las mutaciones R501X y 2282del del gen *FLG* en nuestra población, podría ser debida a los criterios de inclusión del estudio, pero también puede indicar que la población española no se asemeja a otras poblaciones europeas en este aspecto.

Características de los sujetos que presentan mutaciones

En el **Grupo Control** tres personas portaban al menos una mutación, lo que supone una incidencia ligeramente superior en este grupo que en el de pacientes. Dos de estos individuos resultaron heterocigotos para R501X y uno para 2282del4. Como se ha comentado, en el grupo de pacientes la frecuencia del alelo mutado fue inferior, tanto en los pacientes atópicos como en el Grupo Intrínseco. En estos pacientes destaca la ausencia de antecedentes personales de dermatitis atópica, alergia alimentaria, alergia a fármacos, psoriasis o ictiosis vulgar y la escasez de antecedentes familiares de atopia o dermatitis.

No se ha encontrado asociación significativa entre las mutaciones estudiadas y los **antecedentes familiares de atopia** o los antecedentes personales de **dermatitis de contacto**

Los resultados de los estudios que han tratado de demostrar la asociación entre la dermatitis alérgica de contacto y éstas mutaciones no son concluyentes y no muestran una asociación clara (294, 301, 325, 326), salvo en el caso de la sensibilización al níquel, en el que parece haber cierta relación (301, 326, 327) aunque los autores creen que la alta prevalencia de sensibilización a níquel en la población general y en la población estudiada puede actuar como factor de confusión.

Tampoco se han encontrado asociaciones significativas entre dichas mutaciones y los antecedentes personales de **alergia alimentaria, alergia a fármacos, hipersensibilidad a AINE o psoriasis**. De hecho, no se encontró ningún paciente portador de las mutaciones R501X o 2282del4 que presentara dichos antecedentes. Se han llevado a cabo varios estudios que para evaluar la asociación con psoriasis en población alemana (322, 323), inglesa (324) e italiana (309). Ninguno de ellos ha logrado establecer una relación entre estas mutaciones y la presencia de psoriasis (incluyendo en los estudios distintos tipos de psoriasis) o artritis psoriásica.

En cuanto a la **dermatitis atópica**, en nuestro estudio el 5% de los pacientes asmáticos refirieron presentar o haber presentado dermatitis atópica y ninguno de ellos era portador de estas mutaciones.

Esto contrasta con los resultados obtenidos en multitud de estudios en los que la asociación de estas mutaciones con la dermatitis atópica es clara. Se han encontrado diferencias significativas en poblaciones europeas: irlandesa (291, 293), escocesa (291, 294), danesa (291), alemana (295-301), inglesa (302-307), francesa (308), italiana (309), sueca (310) y varias poblaciones europeas (311).

En otras poblaciones, como la norteamericana, hay estudios que encuentran diferencias estadísticamente significativas (312) pero otros no (313), probablemente debido a la mezcla étnica presente en esa población y a la

escasa frecuencia alélica de dichas mutaciones de las poblaciones no caucásicas presentes en dicho país (nordestafricana, china, japonesa e india).

Dado que el diagnóstico se ha realizado de forma retrospectiva en sujetos adultos, puede existir algún sesgo que dificulte la detección de todos los pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica. Esto es debido fundamentalmente a que los pacientes adultos presentan una menor prevalencia de dermatitis atópica y los que la han presentado en la infancia pueden no acordarse (sesgo de recuerdo) o puede que no hayan sido correctamente diagnosticados. La prevalencia de la dermatitis atópica en niños se estima entre un 10-20% (376), otros autores refieren que entre el primer y segundo año de vida es del 9%, del 6% entre los 2 y 3 años y posteriormente este porcentaje desciende al 1% en niños mayores de 6 años (377) y en adultos entre el 1-3% (376). No hemos encontrado estudios hasta la fecha realizados en población española que estudien la asociación de estas mutaciones con la dermatitis atópica, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con otros.

Esta ausencia de asociación estadística en los pacientes de nuestro estudio que presentan dermatitis atópica y las mutaciones estudiadas también podría sugerir que, en la población española, estas mutaciones no predisponen a padecer dicha enfermedad.

Asma

Tampoco se encontró asociación estadística entre las mutaciones estudiadas y la presencia de **asma**, ni siquiera cuando se realizó el análisis por **fenotipo atópico o intrínseco**. De los 3 pacientes con asma atópica que eran portadores de las mutaciones, todos eran heterocigotos para R501X, y de los 2 pacientes con asma intrínseca, uno era heterocigoto para R501X y el otro para 2282del4. Si analizamos los **valores de la espirometría forzada** y del **óxido nítrico exhalado** tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas con las mutaciones estudiadas. Ni se identificó asociación con la **gravedad del asma** que padecen los pacientes y el **escalón de tratamiento** según la guía GINA con las mutaciones estudiadas, ni con el **control del asma**

medido mediante el cuestionario ACT, ni con la **calidad de vida** medida con el cuestionario miniAQLQ global o estudiando cada una de sus dimensiones.

Tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas entre las mutaciones y el **asma empeorada en el puesto de trabajo** o con el **asma ocupacional**. Ningún paciente portador de dichas mutaciones presentaba asma ocupacional y solamente uno presentó asma empeorada en el trabajo.

En la bibliografía varios de los trabajos diseñados para el estudio de la relación entre la dermatitis atópica y las mutaciones del gen de la filagrina incluían sujetos que habían sido diagnosticados de asma. Muchos de ellos, a pesar de haber sido diseñados con otro objetivo, llegaron a las primeras conclusiones sobre la asociación del asma y dichas mutaciones. Si se analizaban sujetos que presentaban eczema, muchos de ellos encontraban una asociación estadística entre el asma y las mutaciones (291, 295, 296, 300, 303, 306, 307, 310), pero en algunos, al analizar los sujetos sin dermatitis, esta asociación desaparecía (291, 306, 307). Solamente Marenholz y cols. (311) encontraron diferencias significativas con el asma, independientemente de la presencia de dermatitis atópica asociada. Varios estudios (291, 305, 308) no encontraron diferencias significativas entre el asma y estas mutaciones en pacientes con dermatitis atópica.

Posteriormente, se han llevado a cabo multitud de trabajos en los que la población de estudio eran pacientes asmáticos (procedentes en ocasiones de estudios diseñados con otros objetivos). Rogers y cols. (312) no encontraron una relación significativa entre estas mutaciones y el hecho de que los pacientes padecieran asma (independientemente de si padecían eczema o no). Tampoco encontraron diferencias en el FEV₁, cociente FEV₁/FVC, porcentaje de mejoría de FEV₁ en la prueba broncodilatadora o PC₂₀ de la prueba de metacolina.

Palmer y cols. (314) encontraron que los sujetos con el genotipo combinado o que presentaban la mutación 2282del4 presentaban un menor cociente FEV₁/FVC. Además, los pacientes con el genotipo combinado o que presentaban la mutación R501X requerían tratamiento con escalones superiores de tratamiento de la Sociedad Británica de Tórax (*British Thoracic Society*). La diferencia en este marcador de gravedad desaparecía al analizar por separado

pacientes asmáticos con eczema y pacientes asmáticos sin eczema. También describieron que los pacientes portadores de estas mutaciones requerían mayor uso de medicación de rescate independientemente de padecer eczema. Basu y cols. (315) observaron que estas mutaciones eran más frecuentes solamente en los pacientes asmáticos que asociaban eczema. Además, encontraron un mayor número de exacerbaciones en los pacientes que presentaban la mutación R501X o el genotipo combinado. Los pacientes portadores de la mutación R501X tenían mayor frecuencia de absentismo escolar. Además, los portadores de R501X precisaban un mayor uso de corticoides orales al igual que los portadores del genotipo combinado. No existieron diferencias significativas al analizar las hospitalizaciones por asma.

Weidinger y cols. (297) analizaron 5 mutaciones del gen *FLG* (R501X, 2282del4, R2447X, S3247X y 3702delG) y encontraron una mayor frecuencia del genotipo combinado en los pacientes que padecían asma y asma con eczema asociado, pero no en los que padecían asma alérgica. Al ajustar por diagnóstico de eczema o de dermatitis atópica observaron que no existían diferencias significativas en ninguno de los grupos de pacientes asmáticos.

Marenholz y cols. (316) encontraron una asociación estadística entre estas mutaciones y el asma. Esta relación se mantenía en los pacientes que padecían, además, eczema pero no en los que no lo padecían. Al tratarse de una cohorte longitudinal de nacimiento estimaron que el valor predictivo positivo (VPP) de padecer asma presentando estas mutaciones era del 31% y el valor predictivo negativo (VPN) del 83,9%. Estos valores predictivos cambiaban al 45,9% y 71,9%, respectivamente, en los pacientes que, además, padecían dermatitis atópica.

Müller y cols. (317) encontraron que los pacientes con asma presentaban más frecuentemente las mutaciones R501X, 2282del4, así como el genotipo combinado y no encontraron diferencias significativas al analizar si la transmisión había sido paterna o materna.

Schuttelaar y cols. (318) encontraron una asociación estadística entre estas mutaciones y la presencia de asma. Esta asociación se mantenía en los

pacientes que habían presentado eczema en el primer año de vida pero no en los que no lo habían padecido.

Osawa y cols. (319) analizaron 8 mutaciones del gen *FLG* frecuentes en la población japonesa (R501X, 3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X y K4022X) y no encontraron diferencias significativas en los pacientes que padecían asma, pero sí en los asmáticos que padecían, además, dermatitis atópica.

Poninska y cols. (320) encontraron que estas mutaciones eran más frecuentes en los pacientes asmáticos independientemente de que padecieran dermatitis atópica o no la padecieran. Al analizar por separado los dos fenotipos de asma encontraron diferencias significativas en los pacientes que presentan asma alérgica pero no en los que padecían asma intrínseca.

Como punto común a todos estos estudios podemos destacar que se encuentra una asociación estadística entre las mutaciones del gen de la filagrina y la presencia de asma, pero analizados con detenimiento, ésta desaparece al estudiar los pacientes asmáticos que no padecen o han padecido dermatitis atópica. Esto podría deberse a que los pacientes incluidos proceden de estudios diseñados para otros fines o porque la dermatitis atópica esté actuando como un factor de confusión. Solamente el estudio de Poninska y cols. (320) permite, por su diseño, la comparación de los fenotipos de asma alérgica e intrínseca, encontrando diferencias significativas en el asma alérgica pero no en la intrínseca en población polaca.

Otras variables clínico-biológicas

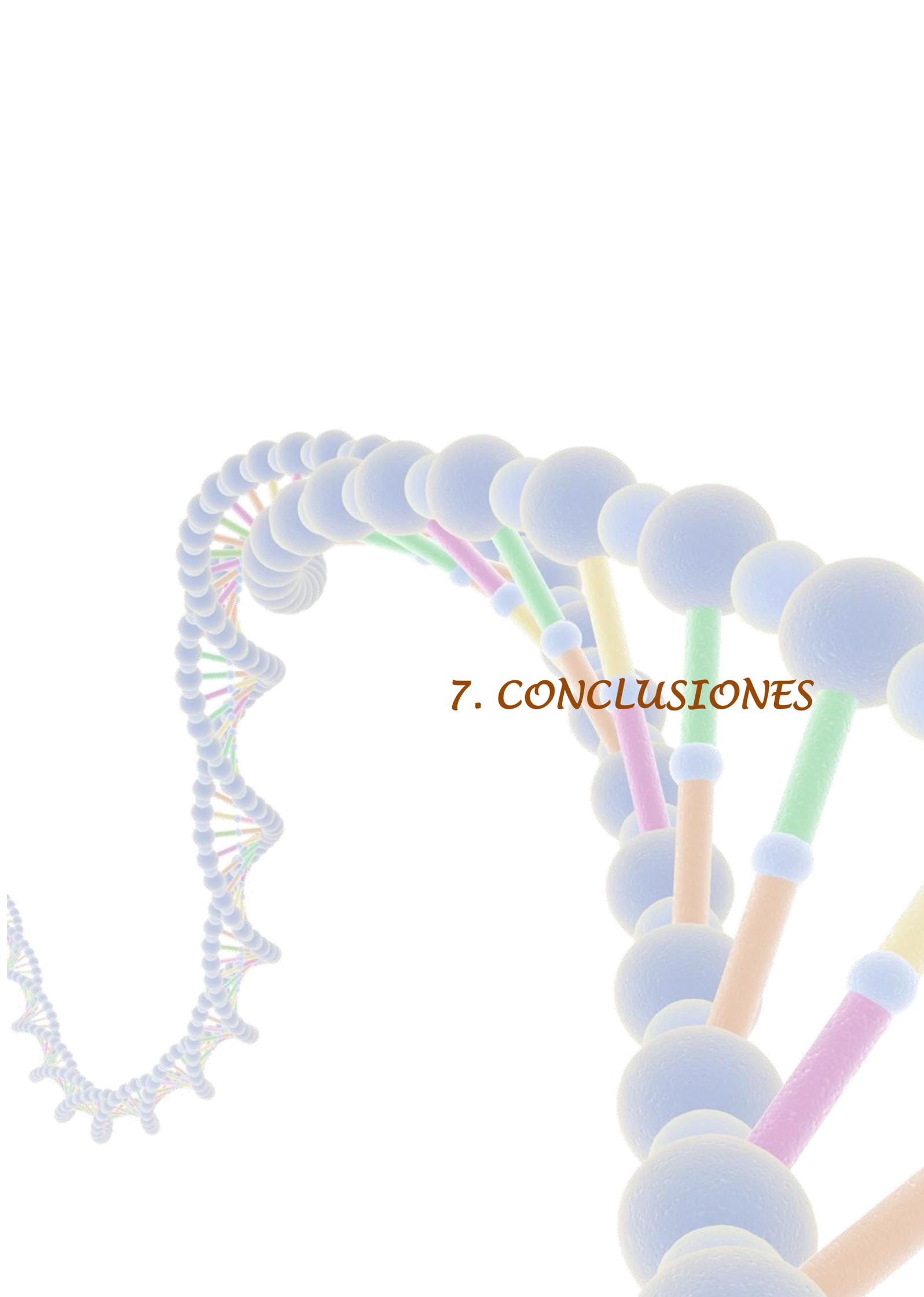
Tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las mutaciones estudiadas y el valor de **IgE total**, ni el **número de pruebas cutáneas positivas** en las pruebas de alergia ni con el **tipo de aeroalérgeno** que produce la sensibilización. En este caso también existe cierta controversia en la bibliografía, si bien en la mayoría de los artículos encuentran asociación estadística entre estas mutaciones y la sensibilización a aeroalérgenos (295, 311) y a aeroalérgenos y alimentos (297, 303, 318); sin

embargo otros autores (369) no han encontrado dicha asociación en una de las dos muestras estudiadas en su trabajo.

En nuestro trabajo tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de las mutaciones estudiadas y los antecedentes personales de **rinitis, rinosinusitis crónica, anosmia o poliposis nasal**. Si bien, casi todos los pacientes portadores de la mutación presentaron rinitis sin anosmia ni poliposis nasal.

Tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad de la rinitis alérgica medida según criterios de la guía ARIA ni la intensidad de la rinosinusitis crónica medida mediante criterios de la guía EPOS y las mutaciones estudiadas.

Sin embargo, al revisar la bibliografía varios estudios observaron diferencias significativas en los pacientes que tenían rinitis y eczema asociado (pero no en las personas que padecían rinitis sin eczema) (310, 311). Por su parte, Weidinger y cols. (297) llegaron a la conclusión de que estas mutaciones estaban sobrerrepresentadas en los pacientes que padecían rinitis alérgica independientemente de si padecían eczema. Sin embargo, Schuttelaar y cols. (318) no encontraron una asociación estadística entre la rinitis alérgica y estas mutaciones.



7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

PRIMERA

Nuestra población de adultos asmáticos presenta unas características clínico-biológicas y evolutivas similares a las de otras poblaciones descritas en nuestro entorno.

SEGUNDA

En nuestro estudio se identifican por primera vez 4 polimorfismos en el gen de la filagrina, que no han sido previamente descritos. Además se identifican y analizan otros 6 SNP anotados en las bases de datos, pero que no han sido nunca estudiados en poblaciones de pacientes.

TERCERA

En general, las frecuencias alélicas y genotípicas de todas las variantes génicas identificadas son relativamente bajas en nuestra población, por lo que consideramos que la contribución génica debe ser moderada, fenómeno ya descrito para las enfermedades complejas y en especial para el asma.

CUARTA

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre las mutaciones R501X y 2282del4 de la filagrina y la presencia de asma. Sin embargo, la región génica comprendida entre ambas es altamente polimórfica, lo que podría contribuir, junto a la enorme heterogeneidad fenotípica del asma, a explicar las discrepancias observadas en algunos estudios de asociación.

QUINTA

En nuestra muestra, uno de los SNP no previamente estudiados en pacientes c.1741A>T se asoció a la presencia de asma intrínseca, peores valores de FVC, FEV1 y PEF y a requerir un mayor escalón de tratamiento. Este SNP genera una modificación del aminoácido codificado en una región de miristoilación que podría tener repercusión funcional. Debido al hecho de ser los primeros en describirlo no podemos comparar la asociación en otras poblaciones y dada la baja frecuencia alélica detectada en nuestra muestra consideramos que se necesitan estudios en otras poblaciones para confirmar su implicación como biomarcador.



8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2006. www.ginasthma.com.
2. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78.
3. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. 2007.
4. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998 Apr 25;351(9111):1225-32.
5. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998 Aug;12(2):315-35.
6. Grupo Español del Estudio Europeo de Asma. Estudio Europeo del Asma. Prevalencia de síntomas relacionados con el asma en cinco áreas españolas. *Med Clin (Barc)*. 1995;104:487-92.
7. Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J*. 1994 May;7(5):954-60.
8. Burney PG, Chinn S, Rona RJ. Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the national study of health and growth 1973-86. *BMJ*. 1990 May 19;300(6735):1306-10.
9. Robertson CF, Heycock E, Bishop J, Nolan T, Olinsky A, Phelan PD. Prevalence of asthma in Melbourne schoolchildren: changes over 26 years. *BMJ*. 1991 May 11;302(6785):1116-8.
10. Weitzman M, Gortmaker SL, Sobol AM, Perrin JM. Recent trends in the prevalence and severity of childhood asthma. *JAMA*. 1992 Nov 18;268(19):2673-7.
11. Shaw RA, Crane J, O'Donnell TV, Porteous LE, Coleman ED. Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population: 1975-89. *Arch Dis Child*. 1990 Dec;65(12):1319-23.
12. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J*. 1996 Apr;9(4):687-95.
13. Jarvis D, Burney P. Epidemiology of asthma. In: Busse WW, Holgate ST, editors. *Asthma and Rhinitis*. 2nd ed: Blackwell Science Ltd; 2000. p. 17-32.
14. Martínez-Moragón E, Serra-Batlles J, De Diego A, Palop M, Casan P, Rubio-Terres C, et al. [Economic cost of treating the patient with asthma in Spain: the AsmaCost study]. *Arch Bronconeumol*. 2009 Oct;45(10):481-6.
15. Weiss KB, Sullivan SD. The economic costs of asthma: a review and conceptual model. *Pharmacoeconomics*. 1993 Jul;4(1):14-30.
16. Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública AyC. Red de médicos Centinela de la Comunidad de Madrid, año 2003. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*. 2004;10:9-14.
17. Ballester F, Perez-Hoyos S, Rivera ML, Merelles T, Tenias JM, Soriano JB, et al. [The patterns of use and factors associated with the patient admission of hospital emergencies for asthma and chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 1999 Jan;35(1):20-6.
18. Otero Gonzalez I, Blanco Aparicio M, Montero Martinez C, Valino Lopez P, Vereá Hernando H. [The epidemiology of COPD and asthma exacerbations in a general hospital]. *Arch Bronconeumol*. 2002 Jun;38(6):256-62.

19. International Consensus Report on Diagnosis and Treatment of Asthma. *Clin Exp Allergy*. 1992 May;22 Suppl 1:1-72.
20. Warner JO, Naspitz CK. Third International Pediatric Consensus statement on the management of childhood asthma. International Pediatric Asthma Consensus Group. *Pediatr Pulmonol*. 1998 Jan;25(1):1-17.
21. Sanz Larruga ML, Martínez Quesada J, Escudero R, García Figueroa BE. Anticuerpos. Inmunológica. Síntesis y regulación de la IgE. In: Peláez A, Dávila IJ, editors. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 27-53.
22. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 May;87(5):893-910.
23. Barnes PJ. Neuropeptides and asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Mar;143(3 Pt 2):S28-32.
24. Siersted HC, Boldsen J, Hansen HS, Mostgaard G, Hyldebrandt N. Population based study of risk factors for underdiagnosis of asthma in adolescence: Odense schoolchild study. *BMJ*. 1998 Feb 28;316(7132):651-5; discussion 5-6.
25. Enright PL, McClelland RL, Newman AB, Gottlieb DJ, Lebowitz MD. Underdiagnosis and undertreatment of asthma in the elderly. Cardiovascular Health Study Research Group. *Chest*. 1999 Sep;116(3):603-13.
26. Martínez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics*. 2002 Feb;109(2 Suppl):362-7.
27. Colás Sanz C, de la Hoz Caballer MB, Rodríguez Rodríguez M, Roger Reig A. Calidad de vida en las enfermedades alérgicas. *Epidemiología de las enfermedades alérgicas*. In: Peláez A, Dávila IJ, editors. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 1709-34.
28. de Diego Damiá A. La calidad de vida relacionada con la salud como indicador del efecto terapéutico farmacológico del asma. *Arch Bronconeumol*. 2001;37 (Suppl 3):40-5.
29. World Health Organization. *Constitution of the World Health Organization*. Nueva York. 1946.
30. Rackemann FM. A clinical study of one hundred and fifty cases of bronchial asthma. *Arch Intern Med*. 1918 October 1, 1918;XXII(4):517-52.
31. Burrows B, Martínez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 1989 Feb 2;320(5):271-7.
32. Kalliel JN, Goldstein BM, Braman SS, Settupane GA. High frequency of atopic asthma in a pulmonary clinic population. *Chest*. 1989 Dec;96(6):1336-40.
33. Lin FJ, Wong D, Chan-Yeung M. Immediate skin reactivity in adult asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995 May;74(5):398-404.
34. Schlumberger HD. Drug-induced pseudo-allergic syndrome as exemplified by Acetylsalicylic Acid intolerance. *PAR Pseudo-allergic reactions Involvement of drugs and chemicals*. Basilea: Karger; 1980.
35. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*. 1999 Nov;20(11):528-33.
36. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet*. 2005;46(1):93-104.
37. Bandeira-Melo C, Weller PF. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Aug-Sep;69(2-3):135-43.
38. Behm CA, Ovington KS. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today*. 2000 May;16(5):202-9.
39. Vidal Pan C, Garde Garde J, Alvarez Puebla MJ. Formas especiales de asma: edad infantil, edad avanzada, asma inducida por el ejercicio, asma en el embarazo, enfermedad pulmonar inducida por Aspirina, asma de difícil control. In: Peláez A, Dávila

- IJ, editors. Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 655-84.
40. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):804-13.
 41. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012 May;18(5):716-25.
 42. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug 1;178(3):218-24.
 43. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):315-23.
 44. Siroux V, Basagana X, Boudier A, Pin I, Garcia-Aymerich J, Vesin A, et al. Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *Eur Respir J*. 2011 Aug;38(2):310-7.
 45. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008 Sep 20;372(9643):1107-19.
 46. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):355-60.
 47. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):1107-36.
 48. Bacharier LB, Strunk RC, Mauger D, White D, Lemanske RF, Jr., Sorkness CA. Classifying asthma severity in children: mismatch between symptoms, medication use, and lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15;170(4):426-32.
 49. Snider GL, Kory RC, Lyons HA. Grading of Pulmonary Function Impairment by Means of Pulmonary Function Tests Recommendations of the Committee on Pulmonary Physiology. *CHEST Journal*. 1967;52(2):270-1.
 50. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J*. 1995 Aug;8(8):1398-420.
 51. Swanney MP, Jensen RL, Crichton DA, Beckert LE, Cardno LA, Crapo RO. FEV(6) is an acceptable surrogate for FVC in the spirometric diagnosis of airway obstruction and restriction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Sep;162(3 Pt 1):917-9.
 52. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Nov;144(5):1202-18.
 53. Dundas I, Chan EY, Bridge PD, McKenzie SA. Diagnostic accuracy of bronchodilator responsiveness in wheezy children. *Thorax*. 2005 Jan;60(1):13-6.
 54. Sanchis J, Casan P, Castillo J, González Mangado N, Palenciano L, Roca J. Normativa para la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol*. 1989;25:132-42.
 55. Sanchís Aldás J, Casan Clará P, Castillo Gómez J, Gómez Mangado N, Palenciano Ballesteros L, Roca Torrent J. Espirometría forzada. Normativas SEPAR. Revisado en 1998.
 56. Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy*. 1977 May;7(3):235-43.
 57. Cockcroft DW, Ruffin RE, Dolovich J, Hargreave FE. Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy*. 1977 Nov;7(6):503-13.
 58. Halperin SA, Eggleston PA, Beasley P, Suratt P, Hendley JO, Groschel DH, et al. Exacerbations of asthma in adults during experimental rhinovirus infection. *Am Rev Respir Dis*. 1985 Nov;132(5):976-80.
 59. Woolcock AJ. What is bronchial hyperresponsiveness from the clinical standpoint? In: Page CP, Gardiner PJ, editors. *Airway hyperresponsiveness: is it really important for asthma?*: Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1993. p. 1-9.

60. Snashall PD, Pauwels R. Definitions and historical perspectives. Bronchial hyperresponsiveness: normal and abnormal control, assessment and therapy: Oxford: Blackwell Scientific Publication 1993. p. 1-9.
61. Malo JL, A. L. Hyperexcitabilité non-allergénique. *Med Sc.* 1987(3):522-9.
62. Orehek J, Gayraud P, Smith AP, Grimaud C, Charpin J. Airway response to carbachol in normal and asthmatic subjects: distinction between bronchial sensitivity and reactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1977 Jun;115(6):937-43.
63. Woolcock AJ, Salome CM, Yan K. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Jul;130(1):71-5.
64. Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF, et al. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol.* 1981 Nov;68(5):347-55.
65. Pattermore PK, Asher MI, Harrison AC, Mitchell EA, Rea HH, Stewart AW. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma, and asthma symptoms. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Sep;142(3):549-54.
66. Anderson SD, Brannan J, Spring J, Spalding N, Rodwell LT, Chan K, et al. A new method for bronchial-provocation testing in asthmatic subjects using a dry powder of mannitol. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Sep;156(3 Pt 1):758-65.
67. Grupo de Trabajo para el Estudio de la Enfermedad Asmática en el niño. Bases anatómico-funcionales de la obstrucción bronquial. *An Pediatr (Barc).* 2002;56(Supl 7):2-7.
68. Juniper EF, Kline PA, Vanzielegem MA, Ramsdale EH, O'Byrne PM, Hargreave FE. Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Oct;142(4):832-6.
69. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl.* 1993 Mar;16:53-83.
70. Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, McLean JA, Rosenthal RR, et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol.* 1975 Oct;56(4):323-7.
71. Beaupre A, Orehek J. Factors influencing the bronchodilator effect of a deep inspiration in asthmatic patients with provoked bronchoconstriction. *Thorax.* 1982 Feb;37(2):124-8.
72. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacoline inhalations test: tidal breathing method. Laboratory procedure: a standardisation.: Luna: AB Draco; 1991.
73. Pellicer-Ciscar C, Sanchís-Aldas J. Prueba de provocación farmacológica bronquial. In: Perpiña M, editor. Hiperreactividad bronquial inespecífica. Barcelona: Ed Doyma S.A. ; 1993. p. 99-115.
74. Jones RS, Wharton MJ, Buston MH. The Place of Physical Exercise and Bronchodilator Drugs in the Assessment of the Asthmatic Child. *Arch Dis Child.* 1963 Dec;38:539-45.
75. Anderson SD, Silverman M, Konig P, Godfrey S. Exercise-induced asthma. *Br J Dis Chest.* 1975 Jan;69(1):1-39.
76. Chen WY, Horton DJ. Heat and water loss from the airways and exercise-induced asthma. *Respiration.* 1977;34(6):305-13.
77. Anderson SD. Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 1984 May;73(5 Pt 2):660-5.
78. Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. A comparison of the osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis.* 1987 May;135(5):1043-8.

79. McFadden ER, Jr. Hypothesis: exercise-induced asthma as a vascular phenomenon. *Lancet*. 1990 Apr 14;335(8694):880-3.
80. Gilbert IA, McFadden ER, Jr. Airway cooling and rewarming. The second reaction sequence in exercise-induced asthma. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):699-704.
81. Anderson SD, Daviskas E. The airway microvasculature and exercise induced asthma. *Thorax*. 1992 Sep;47(9):748-52.
82. Freed AN. Models and mechanisms of exercise-induced asthma. *Eur Respir J*. 1995 Oct;8(10):1770-85.
83. Anderson SD, Charlton B, Weiler JM, Nichols S, Spector SL, Pearlman DS. Comparison of mannitol and methacholine to predict exercise-induced bronchoconstriction and a clinical diagnosis of asthma. *Respir Res*. 2009;10:4.
84. Koskela HO, Hyvarinen L, Brannan JD, Chan HK, Anderson SD. Responsiveness to three bronchial provocation tests in patients with asthma. *Chest*. 2003 Dec;124(6):2171-7.
85. Currie GP, Haggart K, Brannan JD, Lee DK, Anderson SD, Lipworth BJ. Relationship between airway hyperresponsiveness to mannitol and adenosine monophosphate. *Allergy*. 2003 Aug;58(8):762-6.
86. Rundell KW, Slee JB. Exercise and other indirect challenges to demonstrate asthma or exercise-induced bronchoconstriction in athletes. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):238-46; quiz 47-8.
87. Alvarez Puebla MJ, Olaguibel Rivera JM, Alvarez Puebla RA. Evaluación del componente inflamatorio en las vías respiratorias inferiores. In: Peláez A, Dávila IJ, editors. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 189-200.
88. Baraldi E, de Jongste JC. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Respir J*. 2002 Jul;20(1):223-37.
89. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1;184(5):602-15.
90. Roberts G, Hurley C, Bush A, Lack G. Longitudinal study of grass pollen exposure, symptoms, and exhaled nitric oxide in childhood seasonal allergic asthma. *Thorax*. 2004 Sep;59(9):752-6.
91. Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax*. 2002 Jul;57(7):586-9.
92. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993 Mar;16:5-40.
93. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Aug;142(2):434-57.
94. Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Mar;151(3 Pt 1):879-86.
95. Barranzo Sanz P, Galan Labaca I, Cid Sanchez AB, Valls Sanchez A. Epidemiología y etiopatogenia del asma. In: Peláez A, Dávila IJ, editors. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 609-30.
96. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax*. 1993 Jan;48(1):26-32.
97. Clark TJ, Hetzel MR. Diurnal variation of asthma. *Br J Dis Chest*. 1977 Apr;71(2):87-92.

98. Groupe cooperatif Paarc. Pollution atmosphérique et affection respiratoires chroniques ou à répétition. I. Methodes et sujets. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1982 Jan-Feb;18(1):87-99.
99. Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, et al. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Aug;146(2):500-6.
100. Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson DS, Bradley BL, et al. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1992 Apr;89(4):821-9.
101. Frew AJ, Chan H, Lam S, Chan-Yeung M. Bronchial inflammation in occupational asthma due to western red cedar. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Feb;151(2 Pt 1):340-4.
102. Chang-Yeung M, Lam S, Kennedy SM, Frew AJ. Persistent asthma after repeated exposure to high concentrations of gases in pulpmills. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Jun;149(6):1676-80.
103. Sugai T, Sakiyama Y, Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 1992 Feb;22(2):275-81.
104. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet.* 1988 May 21;1(8595):1129-32.
105. Holgate ST, Wilson JR, Howarth PH. New insights into airway inflammation by endobronchial biopsy. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Feb;145(2 Pt 2):S2-6.
106. Fukuda T, Dunnette SL, Reed CE, Ackerman SJ, Peters MS, Gleich GJ. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1985 Nov;132(5):981-5.
107. Frick WE, Sedgwick JB, Busse WW. The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Jun;139(6):1401-6.
108. Taylor GW, Taylor I, Black P, Maltby NH, Turner N, Fuller RW, et al. Urinary leukotriene E4 after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis. *Lancet.* 1989 Mar 18;1(8638):584-8.
109. Sampson AP, Pizzichini E, Bisgaard H. Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1 Suppl):S49-59; discussion S-61.
110. Echazarreta AL, Dahlen B, Garcia G, Agusti C, Barbera JA, Roca J, et al. Pulmonary gas exchange and sputum cellular responses to inhaled leukotriene D(4) in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jul 15;164(2):202-6.
111. Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy.* 2001;56 Suppl 66:7-11.
112. Peters-Golden M, Sampson AP. Cysteinyl leukotriene interactions with other mediators and with glucocorticosteroids during airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1 Suppl):S37-42; discussion S3-8.
113. Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, Maier WC. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J.* 2000 Nov;16(5):802-7.
114. Rabe KF, Adachi M, Lai CK, Soriano JB, Vermeire PA, Weiss KB, et al. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jul;114(1):40-7.
115. Adams RJ, Fuhlbrigge A, Guilbert T, Lozano P, Martinez F. Inadequate use of asthma medication in the United States: results of the asthma in America national population survey. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jul;110(1):58-64.
116. Blanc FX, Postel-Vinay N, Boucot I, De Blic J, Scheinmann P. [The AIRE Study: data analysis of 753 European children with asthma]. *Rev Mal Respir.* 2002 Oct;19(5 Pt 1):585-92.

117. Juniper EF, Johnston PR, Borkhoff CM, Guyatt GH, Boulet LP, Haukioja A. Quality of life in asthma clinical trials: comparison of salmeterol and salbutamol. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Jan;151(1):66-70.
118. Juniper EF, Guyatt GH, Epstein RS, Ferrie PJ, Jaeschke R, Hiller TK. Evaluation of impairment of health related quality of life in asthma: development of a questionnaire for use in clinical trials. *Thorax*. 1992 Feb;47(2):76-83.
119. C Colás C, Lezaun A, Fraj J, Domínguez MA, Duce F, Larrad L. Calidad de vida y ECP sérica en pacientes asmáticos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*. 1997;12:58-60.
120. Marks GB, Dunn SM, Woolcock AJ. A scale for the measurement of quality of life in adults with asthma. *J Clin Epidemiol*. 1992 May;45(5):461-72.
121. Perpina M, Belloch A, Pascual LM, de Diego A, Compte L. [The quality of life in asthma: an evaluation of the AQLQ questionnaire for its use on a Spanish population. Asthma Quality of Life Questionnaire]. *Arch Bronconeumol*. 1995 May;31(5):211-8.
122. Riccioni G, D'Orazio N, Di Ilio C, Della Vecchia R, Ballone E, Menna V, et al. Bronchial hyperresponsiveness and quality of life in asthmatics. *Respiration*. 2003 Sep-Oct;70(5):496-9.
123. Orr LC, Fowler SJ, Lipworth BJ. Relationship between changes in quality of life and measures of lung function and bronchial hyper-responsiveness during high-dose inhaled corticosteroid treatment in uncontrolled asthma. *Am J Respir Med*. 2003;2(5):433-8.
124. Rutten-van Molken MP, Custers F, van Doorslaer EK, Jansen CC, Heurman L, Maesen FP, et al. Comparison of performance of four instruments in evaluating the effects of salmeterol on asthma quality of life. *Eur Respir J*. 1995 Jun;8(6):888-98.
125. Leidy NK, Coughlin C. Psychometric performance of the Asthma Quality of Life Questionnaire in a US sample. *Qual Life Res*. 1998 Feb;7(2):127-34.
126. Juniper EF, Norman GR, Cox FM, Roberts JN. Comparison of the standard gamble, rating scale, AQLQ and SF-36 for measuring quality of life in asthma. *Eur Respir J*. 2001 Jul;18(1):38-44.
127. Boulet LP, Boulet V, Milot J. How should we quantify asthma control? A proposal. *Chest*. 2002 Dec;122(6):2217-23.
128. Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T, Koyama H, et al. Longitudinal changes in patient vs. physician-based outcome measures did not significantly correlate in asthma. *J Clin Epidemiol*. 2005 May;58(5):532-9.
129. Juniper EF, Guyatt GH, Ferrie PJ, Griffith LE. Measuring quality of life in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Apr;147(4):832-8.
130. Juniper EF, Guyatt GH, Cox FM, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of the Mini Asthma Quality of Life Questionnaire. *Eur Respir J*. 1999 Jul;14(1):32-8.
131. Moy ML, Israel E, Weiss ST, Juniper EF, Dube L, Drazen JM. Clinical predictors of health-related quality of life depend on asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(4):924-9.
132. Osman LM, Calder C, Robertson R, Friend JA, Legge JS, Douglas JG. Symptoms, quality of life, and health service contact among young adults with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):498-503.
133. Sanjuas C, Alonso J, Sanchis J, Casan P, Broquetas JM, Ferrie PJ, et al. [The quality-of-life questionnaire with asthma patients: the Spanish version of the Asthma Quality of Life Questionnaire]. *Arch Bronconeumol*. 1995 May;31(5):219-26.
134. Sanjuas C, Alonso J, Ferrer M, Curull V, Broquetas JM, Anto JM. Adaptation of the Asthma Quality of Life Questionnaire to a second language preserves its critical properties: the Spanish version. *J Clin Epidemiol*. 2001 Feb;54(2):182-9.
135. Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM, Littlejohns P. A self-complete measure of health status for chronic airflow limitation. The St. George's Respiratory Questionnaire. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jun;145(6):1321-7.
136. Ferrer M, Alonso J, Prieto L, Plaza V, Monso E, Marrades R, et al. Validity and reliability of the St George's Respiratory Questionnaire after adaptation to a different language and culture: the Spanish example. *Eur Respir J*. 1996 Jun;9(6):1160-6.

137. Maille AR, Koning CJ, Zwinderman AH, Willems LN, Dijkman JH, Kaptein AA. The development of the 'Quality-of-life for Respiratory Illness Questionnaire (QOL-RIQ)': a disease-specific quality-of-life questionnaire for patients with mild to moderate chronic non-specific lung disease. *Respir Med.* 1997 May;91(5):297-309.
138. Hyland ME, Finnis S, Irvine SH. A scale for assessing quality of life in adult asthma sufferers. *J Psychosom Res.* 1991;35(1):99-110.
139. Letrait M, Lurie A, Bean K, Mesbah M, Venot A, Strauch G, et al. The Asthma Impact Record (AIR) index: a rating scale to evaluate the quality of life of asthmatic patients in France. *Eur Respir J.* 1996 Jun;9(6):1167-73.
140. Juniper EF, Guyatt GH, Feeny DH, Ferrie PJ, Griffith LE, Townsend M. Measuring quality of life in children with asthma. *Qual Life Res.* 1996 Feb;5(1):35-46.
141. Tauler E, Vilagut G, Grau G, Gonzalez A, Sanchez E, Figueras G, et al. The spanish version of the paediatric asthma quality of life questionnaire (PAQLQ): metric characteristics and equivalence with the original version. *Qual Life Res.* 2001;10(1):81-91.
142. Juniper EF, Guyatt GH, Feeny DH, Ferrie PJ, Griffith LE, Townsend M. Measuring quality of life in the parents of children with asthma. *Qual Life Res.* 1996 Feb;5(1):27-34.
143. Santanello NC, Demuro-Mercon C, Davies G, Ostrom N, Noonan M, Rooklin A, et al. Validation of a pediatric asthma caregiver diary. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Nov;106(5):861-6.
144. Alonso Lebrero E. [Utilization and clinical validation of the Spanish version of the Pediatric Asthma Quality of Life Questionnaire (PAQLQ) and the Diary for Caregivers of Asthmatic Children (DCA). VALAIR study]. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2000 May-Jun;28(3):175-83.
145. Christie MJ, French D, Sowden A, West A. Development of child-centered disease-specific questionnaires for living with asthma. *Psychosom Med.* 1993 Nov-Dec;55(6):541-8.
146. Rutishauser C, Sawyer SM, Bond L, Coffey C, Bowes G. Development and validation of the Adolescent Asthma Quality of Life Questionnaire (AAQOL). *Eur Respir J.* 2001 Jan;17(1):52-8.
147. Bergner M, Bobbitt RA, Carter WB, Gilson BS. The Sickness Impact Profile: development and final revision of a health status measure. *Med Care.* 1981 Aug;19(8):787-805.
148. Alonso J, Prieto L, Anto JM. [The Spanish version of the SF-36 Health Survey (the SF-36 health questionnaire): an instrument for measuring clinical results]. *Med Clin (Barc).* 1995 May 27;104(20):771-6.
149. Gandek B, Ware JE, Aaronson NK, Apolone G, Bjorner JB, Brazier JE, et al. Cross-validation of item selection and scoring for the SF-12 Health Survey in nine countries: results from the IQOLA Project. *International Quality of Life Assessment. J Clin Epidemiol.* 1998 Nov;51(11):1171-8.
150. Badia Llach X, Herdman M, Schiaffino A. Determining correspondence between scores on the EQ-5D "thermometer" and a 5-point categorical rating scale. *Med Care.* 1999 Jul;37(7):671-7.
151. Alonso J, Prieto L, Anto JM. The Spanish version of the Nottingham Health Profile: a review of adaptation and instrument characteristics. *Qual Life Res.* 1994 Dec;3(6):385-93.
152. Juniper EF, Guyatt GH, Willan A, Griffith LE. Determining a minimal important change in a disease-specific Quality of Life Questionnaire. *J Clin Epidemiol.* 1994 Jan;47(1):81-7.
153. Cooke RA, Veer AV, Jr. Human Sensitization. *J Immunol.* 1916 June;1(3):201-305.
154. Drinkwater H. An Address on recent theories and experiments on heredity and inheritance: Delivered before the Denbigh and Flint Division of the British Medical Association. *Br Med J.* 1908 Nov 21;2(2499):1538-41.

155. Rackemann FM. Studies in asthma: II. An analysis of two hundred and thirteen cases in which the patients were relieved for more than two years. *Arch Intern Med.* 1928 March 1, 1928;41(3):346-69.
156. Spain WC, Cooke R. Studies in Specific Hypersensitiveness: XI. The Familial Occurrence of Hay Fever and Bronchial Asthma. *J Immunol.* 1924 November;9(6):521-69.
157. Blumenthal MN, Namboodiri K, Mendell N, Gleich G, Elston RC, Yunis E. Genetic transmission of serum IgE Levels. *Am J Med Genet.* 1981;10(3):219-28.
158. Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ, Jr., Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet.* 1991 May;48(5):873-9.
159. Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet.* 1989 Jun 10;1(8650):1292-5.
160. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature.* 1996 Sep 19;383(6597):247-50.
161. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996 Sep 13;273(5281):1516-7.
162. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature.* 2004 May 27;429(6990):446-52.
163. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):470-3.
164. Akhbar L, Sandford AJ. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology.* 2011 Apr;16(3):396-406.
165. Sleiman PM, Flory J, Imielinski M, Bradford JP, Annaiah K, Willis-Owen SA, et al. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *N Engl J Med.* 2010 Jan 7;362(1):36-44.
166. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 23;363(13):1211-21.
167. Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkorn T, Peters SP, Meyers DA, et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):328-35 e11.
168. Mathias RA, Grant AV, Rafaels N, Hand T, Gao L, Vergara C, et al. A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):336-46 e4.
169. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadóttir A, Sulem P, Jonsdóttir GM, et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet.* 2009 Mar;41(3):342-7.
170. Vercelli D, Martinez FD. The Faustian bargain of genetic association studies: bigger might not be better, or at least it might not be good enough. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jun;117(6):1303-5.
171. Williams SM, Canter JA, Crawford DC, Moore JH, Ritchie MD, Haines JL. Problems with genome-wide association studies. *Science.* 2007 Jun 29;316(5833):1840-2.
172. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res.* 2003;4:14.
173. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.* 2006 Mar;7(2):95-100.
174. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res.* 2008;9:4.
175. Obeidat M, Hall IP. Genetics of complex respiratory diseases: implications for pathophysiology and pharmacology studies. *Br J Pharmacol.* 2011 May;163(1):96-105.

176. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):169-82.
177. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 May;20(5):976-83.
178. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Mar;113(3):482-8.
179. Werner M, Topp R, Wimmer K, Richter K, Bischof W, Wjst M, et al. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Aug;112(2):323-30.
180. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Sep;114(3):561-7.
181. Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R, Palmer LJ, Raby BA, Kwiatkowski DJ, et al. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun.* 2004 Aug;5(5):343-6.
182. Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev.* 2002 Dec;190:9-25.
183. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, Schedel M, Carr D, Zhang Y, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet.* 2005 Apr 1;14(7):935-41.
184. Kabesch M, Peters W, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;111(4):813-7.
185. Rosenstiel P, Till A, Schreiber S. NOD-like receptors and human diseases. *Microbes Infect.* 2007 Apr;9(5):648-57.
186. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Nov;22(11):1760-6.
187. Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart.* 2004 Sep;90(9):983-8.
188. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Dec;158(6):1958-62.
189. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan 15;169(2):214-9.
190. Litonjua AA, Tantisira KG, Lake S, Lazarus R, Richter BG, Gabriel S, et al. Polymorphisms in signal transducer and activator of transcription 3 and lung function in asthma. *Respir Res.* 2005;6:52.
191. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens.* 2004 Dec;64(6):631-49.
192. Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, et al. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet.* 2004 Dec 15;13(24):3203-17.
193. Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, et al. Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med.* 2005 Feb 21;201(4):627-36.

194. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. 2005 Jan 21;307(5708):430-3.
195. Pykalainen M, Kinos R, Valkonen S, Rydman P, Kilpelainen M, Laitinen LA, et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):80-7.
196. Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA, Silverman ES, Lake SL, Richter BG, et al. TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 28;101(52):18099-104.
197. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritsch C, et al. A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):893-8.
198. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jul;114(1):80-7.
199. Loza MJ, Chang BL. Association between Q551R IL4R genetic variants and atopic asthma risk demonstrated by meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):578-85.
200. Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, et al. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Nov;114(5):1100-5.
201. Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, et al. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):455-9.
202. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.
203. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*. 1998 Dec 18;282(5397):2261-3.
204. Ghaffar O, Laberge S, Jacobson MR, Lowhagen O, Rak S, Durham SR, et al. IL-13 mRNA and immunoreactivity in allergen-induced rhinitis: comparison with IL-4 expression and modulation by topical glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Jul;17(1):17-24.
205. Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, Konstantinidis A, Holloway JW, Thornber M, et al. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):407-14.
206. Dealtry GB, Clark DE, Sharkey A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Expression and localization of the Th2-type cytokine interleukin-13 and its receptor in the placenta during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1998 Oct;40(4):283-90.
207. Ribeiro-do-Couto LM, Boeije LC, Kroon JS, Hooibrink B, Breur-Vriesendorp BS, Aarden LA, et al. High IL-13 production by human neonatal T cells: neonate immune system regulator? *Eur J Immunol*. 2001 Nov;31(11):3394-402.
208. Wenzel S, Wilbraham D, Fuller R, Getz EB, Longphre M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet*. 2007 Oct 20;370(9596):1422-31.
209. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):747-54.
210. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Mar;105(3):506-13.

211. Liu X, Nickel R, Beyer K, Wahn U, Ehrlich E, Freidhoff LR, et al. An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90). *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):167-70.
212. Wang M, Xing ZM, Lu C, Ma YX, Yu DL, Yan Z, et al. A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis. *Hum Genet*. 2003 Oct;113(5):387-90.
213. Heinzmann A, Jerkic SP, Ganter K, Kurz T, Blattmann S, Schuchmann L, et al. Association study of the IL13 variant Arg110Gln in atopic diseases and juvenile idiopathic arthritis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Oct;112(4):735-9.
214. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet*. 2000 Mar 1;9(4):549-59.
215. He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, et al. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun*. 2003 Jul;4(5):385-9.
216. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Kakinuma T, et al. Interleukin-13 gene polymorphism G4257A is associated with atopic dermatitis in Japanese patients. *J Dermatol Sci*. 2002 Nov;30(2):100-7.
217. DeMeo DL, Lange C, Silverman EK, Senter JM, Drazen JM, Barth MJ, et al. Univariate and multivariate family-based association analysis of the IL-13 ARG130GLN polymorphism in the Childhood Asthma Management Program. *Genet Epidemiol*. 2002 Nov;23(4):335-48.
218. van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, et al. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):61-5.
219. Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, et al. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Sep;25(3):377-84.
220. Hummelshoj T, Bodtger U, Datta P, Malling HJ, Oturai A, Poulsen LK, et al. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. *Eur J Immunogenet*. 2003 Oct;30(5):355-9.
221. Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, et al. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Mar;113(3):489-95.
222. Cameron L, Webster RB, Stempel JM, Kiesler P, Kabesch M, Ramachandran H, et al. Th2 cell-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation. *J Immunol*. 2006 Dec 15;177(12):8633-42.
223. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, et al. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet*. 1994 Jun;7(2):125-9.
224. Donnadieu E, Jouvin MH, Rana S, Moffatt MF, Mockford EH, Cookson WO, et al. Competing functions encoded in the allergy-associated F(c)epsilonR1beta gene. *Immunity*. 2003 May;18(5):665-74.
225. Kabesch M, Depner M, Dahmen I, Weiland SK, Vogelberg C, Niggemann B, et al. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. *Allergy*. 2007 Apr;62(4):423-8.
226. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Cho HJ, Kim S, Shin ES, et al. IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans. *Allergy*. 2007 Aug;62(8):934-42.
227. Nickel RG, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes KC, Plunkett BS, et al. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1612-6.

228. Levy H, Raby BA, Lake S, Tantisira KG, Kwiatkowski D, Lazarus R, et al. Association of defensin beta-1 gene polymorphisms with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;115(2):252-8.
229. Sengler C, Heinzmann A, Jerkic SP, Haider A, Sommerfeld C, Niggemann B, et al. Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Mar;111(3):515-9.
230. Nakamura H, Luster AD, Nakamura T, In KH, Sonna LA, Deykin A, et al. Variant eotaxin: its effects on the asthma phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Dec;108(6):946-53.
231. Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):141-2.
232. Walley AJ, Chavanas S, Moffatt MF, Esnouf RM, Ubhi B, Lawrence R, et al. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):175-8.
233. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, et al. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10483-8.
234. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet*. 1997 Apr;6(4):551-4.
235. Sayers I, Barton S, Rorke S, Beghe B, Hayward B, Van Eerdewegh P, et al. Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leukotriene C4 synthase gene (LTC4S) in asthma. *Thorax*. 2003 May;58(5):417-24.
236. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Spiteri MA. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1437-42.
237. Kabesch M, Hoefler C, Carr D, Leupold W, Weiland SK, von Mutius E. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax*. 2004 Jul;59(7):569-73.
238. Shin HD, Park BL, Jung JH, Wang HJ, Park HS, Choi BW, et al. Association of thromboxane A2 receptor (TBXA2R) with atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Aug;112(2):454-7.
239. Drazen JM, Yandava CN, Dube L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):168-70.
240. Matsuda A, Hirota T, Akahoshi M, Shimizu M, Tamari M, Miyatake A, et al. Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma. *Hum Mol Genet*. 2005 Oct 1;14(19):2779-86.
241. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, et al. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 27;267(3):761-3.
242. Hall IP, Sayers I. Pharmacogenetics and asthma: false hope or new dawn? *Eur Respir J*. 2007 Jun;29(6):1239-45.
243. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002 Jul 25;418(6896):426-30.
244. Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Howarth PH, Haitchi HM, Holloway JW. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J*. 2007 Apr;29(4):793-803.
245. Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet*. 2003 Jun;34(2):181-6.
246. Mellor J. It takes a PHD to read the histone code. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):22-4.

247. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):258-63.
248. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science.* 2004 Apr 9;304(5668):300-4.
249. Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet.* 2005 Feb;76(2):349-57.
250. Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet.* 2007 Oct;81(4):829-34.
251. Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, Shibuya K, Shibuya A, Bannai M, et al. Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jul 15;172(2):183-8.
252. Balaci L, Spada MC, Olla N, Sole G, Loddo L, Anedda F, et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *Am J Hum Genet.* 2007 Jun;80(6):1103-14.
253. Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy.* 1995 Sep;25(9):815-9.
254. Upton MN, McConnachie A, McSharry C, Hart CL, Smith GD, Gillis CR, et al. Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults: the Midspan family study surveys of parents and offspring. *BMJ.* 2000 Jul 8;321(7253):88-92.
255. Ptak C, Petronis A. Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:257-76.
256. Pascual M, Davila I, Isidoro-Garcia M, Lorente F. Epigenetic aspects of the allergic diseases. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:815-24.
257. McAlees JW, Smith LT, Erbe RS, Jarjoura D, Ponzio NM, Sanders VM. Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in T(H)1 and T(H)2 cells. *Brain Behav Immun.* 2011 Mar;25(3):408-15.
258. Mattick JS. A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol.* 2007 May;210(Pt 9):1526-47.
259. Isidoro-Garcia M, Davila-Gonzalez I, Pascual de Pedro M, Sanz-Lozano C, Lorente-Toledano F. Interactions between genes and the environment. *Epigenetics in allergy. Allergol Immunopathol (Madr).* 2007 Nov-Dec;35(6):254-8.
260. Martino D, Prescott S. Epigenetics and prenatal influences on asthma and allergic airways disease. *Chest.* 2011 Mar;139(3):640-7.
261. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):857-65.
262. Pascual RM, Bleeker ER. Pharmacogenetics of asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Jun;10(3):226-35.
263. Reihnsaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB. Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 Mar;8(3):334-9.
264. Hawkins GA, Tantisira K, Meyers DA, Ampleford EJ, Moore WC, Klanderman B, et al. Sequence, haplotype, and association analysis of ADRbeta2 in a multiethnic asthma case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Nov 15;174(10):1101-9.
265. Hawkins GA, Weiss ST, Bleeker ER. Clinical consequences of ADRbeta2 polymorphisms. *Pharmacogenomics.* 2008 Mar;9(3):349-58.
266. Chung LP, Waterer G, Thompson PJ. Pharmacogenetics of beta2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting beta-agonists and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2011 Mar;41(3):312-26.

267. Tantisira KG, Drazen JM. Genetics and pharmacogenetics of the leukotriene pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Sep;124(3):422-7.
268. Sanz C, Isidro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Lorente F. Analysis of 927T> C CYSLTR1 and -444A > C LTC4S polymorphisms in patients with asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2006;16(6):331-7.
269. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jan;83(1):144-51.
270. Hawkins GA, Lazarus R, Smith RS, Tantisira KG, Meyers DA, Peters SP, et al. The glucocorticoid receptor heterocomplex gene STIP1 is associated with improved lung function in asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jun;123(6):1376-83 e7.
271. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES, Palmer LJ, Lazarus R, Silverman EK, et al. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Hum Mol Genet.* 2004 Jul 1;13(13):1353-9.
272. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Apr;6(4):328-40.
273. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry.* 1990 Oct 9;29(40):9432-40.
274. Resing KA, Dale BA, Walsh KA. Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry.* 1985 Jul 16;24(15):4167-75.
275. Resing KA, Johnson RS, Walsh KA. Characterization of protease processing sites during conversion of rat profilaggrin to filaggrin. *Biochemistry.* 1993 Sep 28;32(38):10036-45.
276. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jul;78(7):4097-101.
277. Mack JW, Steven AC, Steinert PM. The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper hypothesis. *J Mol Biol.* 1993 Jul 5;232(1):50-66.
278. Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1993 Jan;13(1):613-25.
279. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(4):383-408.
280. De Benedetto A, Qualia CM, Baroody FM, Beck LA. Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol.* 2008 Jun;128(6):1594-7.
281. Ying S, Meng Q, Corrigan CJ, Lee TH. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Dec;118(6):1386-8.
282. Marenholz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D. Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome Res.* 2001 Mar;11(3):341-55.
283. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunskiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem.* 1992 Nov 25;267(33):23772-81.
284. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* 2009 May 1;122(Pt 9):1285-94.
285. Fleckman P, Holbrook KA, Dale BA, Sybert VP. Keratinocytes cultured from subjects with ichthyosis vulgaris are phenotypically abnormal. *J Invest Dermatol.* 1987 May;88(5):640-5.

286. Pena Penabad C, Perez Arellano JL, Becker E, Gutierrez de Diego J, Garcia Salgado MJ, Valle FJ, et al. Differential patterns of filaggrin expression in lamellar ichthyosis. *Br J Dermatol*. 1998 Dec;139(6):958-64.
287. Sybert VP, Dale BA, Holbrook KA. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J Invest Dermatol*. 1985 Mar;84(3):191-4.
288. Nirunsuksiri W, Zhang SH, Fleckman P. Reduced stability and bi-allelic, coequal expression of profilaggrin mRNA in keratinocytes cultured from subjects with ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol*. 1998 Jun;110(6):854-61.
289. Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2000 Dec;115(6):1072-81.
290. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006 Mar;38(3):337-42.
291. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):441-6.
292. Brown SJ, McLean WH. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;129(3):543-52.
293. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):650-4.
294. Lerbaek A, Bisgaard H, Agner T, Ohm Kyvik K, Palmer CN, Menne T. Filaggrin null alleles are not associated with hand eczema or contact allergy. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157(6):1199-204.
295. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jul;118(1):214-9.
296. Weidinger S, Rodriguez E, Stahl C, Wagenpfeil S, Klopp N, Illig T, et al. Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):724-6.
297. Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, et al. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 May;121(5):1203-9 e1.
298. Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S. Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):722-4.
299. Ruether A, Stoll M, Schwarz T, Schreiber S, Folster-Holst R. Filaggrin loss-of-function variant contributes to atopic dermatitis risk in the population of Northern Germany. *Br J Dermatol*. 2006 Nov;155(5):1093-4.
300. Betz RC, Pforr J, Flaquer A, Redler S, Hanneken S, Eigelshoven S, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and alopecia areata: strong risk factor for a severe course of disease in patients comorbid for atopic disease. *J Invest Dermatol*. 2007 Nov;127(11):2539-43.
301. Novak N, Baurecht H, Schafer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1430-5.
302. Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, et al. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar;127(3):564-7.
303. Morar N, Cookson WO, Harper JI, Moffatt MF. Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007 Jul;127(7):1667-72.

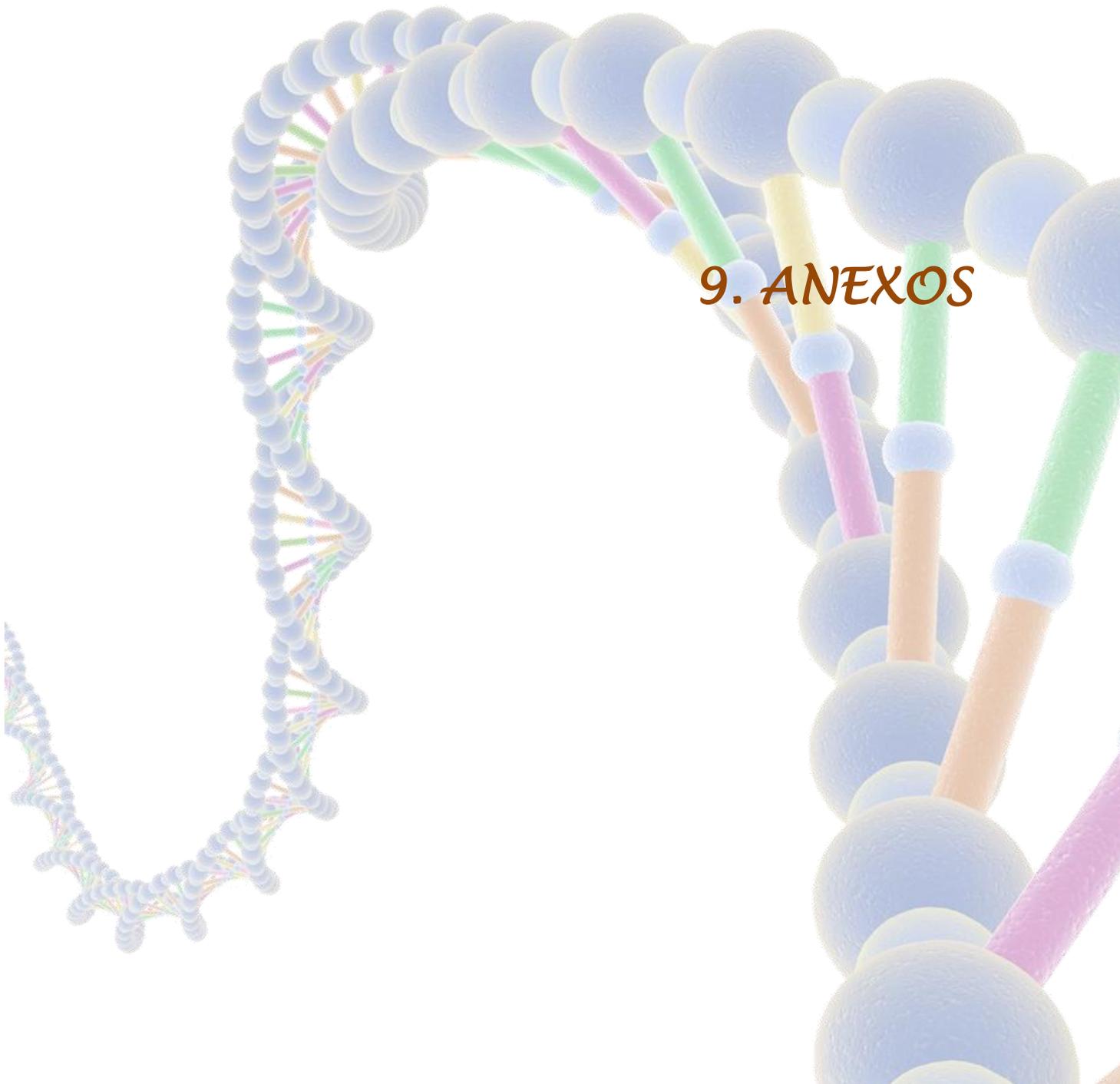
304. Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, et al. Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema. *J Invest Dermatol.* 2008 Jun;128(6):1591-4.
305. Brown SJ, Relton CL, Liao H, Zhao Y, Sandilands A, Wilson IJ, et al. Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: a population-based case-control study. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Apr;121(4):940-46 e3.
306. Henderson J, Northstone K, Lee SP, Liao H, Zhao Y, Pembrey M, et al. The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Apr;121(4):872-7 e9.
307. Rice NE, Patel BD, Lang IA, Kumari M, Frayling TM, Murray A, et al. Filaggrin gene mutations are associated with asthma and eczema in later life. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Oct;122(4):834-6.
308. Hubiche T, Ged C, Benard A, Leaute-Labreze C, McElreavey K, de Verneuil H, et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol.* 2007;87(6):499-505.
309. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology.* 2008;216(1):83-4.
310. Ekelund E, Lieden A, Link J, Lee SP, D'Amato M, Palmer CN, et al. Loss-of-function variants of the filaggrin gene are associated with atopic eczema and associated phenotypes in Swedish families. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(1):15-9.
311. Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Oct;118(4):866-71.
312. Rogers AJ, Celedon JC, Lasky-Su JA, Weiss ST, Raby BA. Filaggrin mutations confer susceptibility to atopic dermatitis but not to asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Dec;120(6):1332-7.
313. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):150-5.
314. Palmer CN, Ismail T, Lee SP, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):64-8.
315. Basu K, Palmer CN, Lipworth BJ, Irwin McLean WH, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma exacerbations in children and young adults. *Allergy.* 2008 Sep;63(9):1211-7.
316. Marenholz I, Kerscher T, Bauerfeind A, Esparza-Gordillo J, Nickel R, Keil T, et al. An interaction between filaggrin mutations and early food sensitization improves the prediction of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):911-6.
317. Muller S, Marenholz I, Lee YA, Sengler C, Zitnik SE, Griffioen RW, et al. Association of Filaggrin loss-of-function-mutations with atopic dermatitis and asthma in the Early Treatment of the Atopic Child (ETAC) population. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009 Jun;20(4):358-61.
318. Schuttelaar ML, Kerkhof M, Jonkman MF, Koppelman GH, Brunekreef B, de Jongste JC, et al. Filaggrin mutations in the onset of eczema, sensitization, asthma, hay fever and the interaction with cat exposure. *Allergy.* 2009 Dec;64(12):1758-65.
319. Osawa R, Konno S, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, Nomura Y, et al. Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma. *J Invest Dermatol.* 2010 Dec;130(12):2834-6.
320. Poninska J, Samolinski B, Tomaszewska A, Raciborski F, Samel-Kowalik P, Walkiewicz A, et al. Filaggrin gene defects are independent risk factors for atopic asthma in a Polish population: a study in ECAP cohort. *PLoS One.* 2011;6(2):e16933.
321. Fischer M, William T, Helmbold P, Wohlrab J, Marsch W. Expression of epidermal N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR1) depends on formation of the

- granular layer--analysis in diseases with parakeratotic cornification. *Arch Dermatol Res.* 2004 Sep;296(4):157-62.
322. Huffmeier U, Traupe H, Oji V, Lascorz J, Stander M, Lohmann J, et al. Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in German patients. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1367-70.
323. Weichenthal M, Ruether A, Schreiber S, Nair R, Voorhees JJ, Schwarz T, et al. Filaggrin R501X and 2282del4 mutations are not associated with chronic plaque-type psoriasis in a German cohort. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1535-7.
324. Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Liao H, Lee SP, Allen MH, Hull PR, et al. Filaggrin null alleles are not associated with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2007 Aug;127(8):1878-82.
325. de Jongh CM, Khrenova L, Verberk MM, Calkoen F, van Dijk FJ, Voss H, et al. Loss-of-function polymorphisms in the filaggrin gene are associated with an increased susceptibility to chronic irritant contact dermatitis: a case-control study. *Br J Dermatol.* 2008 Sep;159(3):621-7.
326. Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menne T, Nielsen NH, Meldgaard M, et al. The association between null mutations in the filaggrin gene and contact sensitization to nickel and other chemicals in the general population. *Br J Dermatol.* 2010 Jun;162(6):1278-85.
327. Ross-Hansen K, Menne T, Johansen JD, Carlsen BC, Linneberg A, Nielsen NH, et al. Nickel reactivity and filaggrin null mutations--evaluation of the filaggrin bypass theory in a general population. *Contact Dermatitis.* 2011 Jan;64(1):24-31.
328. Carlsen BC, Johansen JD, Menne T, Meldgaard M, Szecsi PB, Stender S, et al. Filaggrin null mutations and association with contact allergy and allergic contact dermatitis: results from a tertiary dermatology clinic. *Contact Dermatitis.* 2010 Aug;63(2):89-95.
329. Bousquet J, Khaltsev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160.
330. Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM, Monclus L, Marti-Guadano E, et al. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):359-65.
331. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl.* 2007(20):1-136.
332. Castellsague J, Burgos F, Sunyer J, Barbera JA, Roca J. Prediction equations for forced spirometry from European origin populations. Barcelona Collaborative Group on Reference Values for Pulmonary Function Testing and the Spanish Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Respir Med.* 1998 Mar;92(3):401-7.
333. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986 May-Jun;22(3):217-24.
334. Dreborg S, Frew A. Position Paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy.* 1993;48(s14):49-54.
335. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jan;113(1):59-65.
336. Vega JM, Badia X, Badiola C, Lopez-Vina A, Olaguibel JM, Picado C, et al. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Test (ACT). *J Asthma.* 2007 Dec;44(10):867-72.
337. Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005 Feb;15(2):97-8.

338. Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res.* 2009 Apr;19(4):519-23.
339. Fleiss JL. Determining Sample Sizes Needed to Detect a Difference Between Two Proportions. *Statistical Methods for Rates and Proportions*: John Wiley & Sons, Inc.; 1981.
340. Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 17;96(6):434-42.
341. Alergológica-2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, Schering-Plough, editors. Madrid: Egraf SA; 2006.
342. Quirce S. Asthma in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19 Suppl 2:14-20.
343. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy.* 2002 Jul;57(7):607-13.
344. Ulrik CS, Backer V, Dirksen A. A 10 year follow up of 180 adults with bronchial asthma: factors important for the decline in lung function. *Thorax.* 1992 Jan;47(1):14-8.
345. Palmer KN, Kelman GR. A comparison of pulmonary function in extrinsic and intrinsic bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1973 Jun;107(6):940-5.
346. Inouye T, Tarlo S, Broder I, Corey P, Davies G, Leznoff A, et al. Severity of asthma in skin test-negative and skin test-positive patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1985 Feb;75(2):313-9.
347. Giraldo B, Blumenthal MN, Spink WW. Aspirin intolerance and asthma. A clinical and immunological study. *Ann Intern Med.* 1969 Sep;71(3):479-96.
348. McDonald JR, Mathison DA, Stevenson DD. Aspirin intolerance in asthma. Detection by oral challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 1972 Oct;50(4):198-207.
349. Chafee FH, Settipane GA. Aspirin intolerance: I. Frequency in an allergic population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1974;53(4):193-9.
350. Settipane GA, Chafee FH, Klein DE. Aspirin intolerance. II. A prospective study in an atopic and normal population. *J Allergy Clin Immunol.* 1974 Apr;53(4):200-4.
351. Castillo JA, Picado C. Prevalence of aspirin intolerance in asthmatics treated in a hospital. *Respiration.* 1986;50(3):153-7.
352. Kasper L, Sladek K, Duplaga M, Bochenek G, Liebhart J, Gladysz U, et al. Prevalence of asthma with aspirin hypersensitivity in the adult population of Poland. *Allergy.* 2003 Oct;58(10):1064-6.
353. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol.* 1999 Aug;28(4):717-22.
354. Vally H, Taylor ML, Thompson PJ. The prevalence of aspirin intolerant asthma (AIA) in Australian asthmatic patients. *Thorax.* 2002 Jul;57(7):569-74.
355. Vidal C, González Quintela A, Gude F. Evaluación de la elevación de la IgE. In: Peláez A, Dávila IJ, editors. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007. p. 81-94.
356. Pedersen PA, Weeke ER. Asthma and allergic rhinitis in the same patients. *Allergy.* 1983 Jan;38(1):25-9.
357. Greisner WA, 3rd, Settipane RJ, Settipane GA. Co-existence of asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Asthma Proc.* 1998 Jul-Aug;19(4):185-8.
358. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Mar;109(3):419-25.
359. Alobid I, Anton E, Armengot M, Chao J, Colas C, del Cuvillo A, et al. SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011;21 Suppl 1:1-58.

360. Davila I, Rondon C, Navarro A, Anton E, Colas C, Dordal MT, et al. Aeroallergen sensitization influences quality of life and comorbidities in patients with nasal polyposis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012 Sep-Oct;26(5):e126-31.
361. Ceylan E, Gencer M, San I. Nasal polyps and the severity of asthma. *Respirology*. 2007 Mar;12(2):272-6.
362. Unger L. Bronchial asthma: Results of treatment in 207 patients under observation for a period varying from one to thirteen years. *Journal of Allergy*. 1936;7(4):364-71.
363. Pearson RS. Natural history of asthma. *Acta Allergol*. 1958;12(4-5):277-94.
364. Ogilvie AG. Asthma: a study in prognosis of 1,000 patients. *Thorax*. 1962 Sep;17:183-9.
365. Rackemann FM, Edwards MC. A follow-up study of 688 patients after an interval of twenty years. *N Engl J Med*. 1952 May 22;246(21):815-23; contd.
366. Cline MG, Dodge R, Lebowitz MD, Burrows B. Determinants of percent predicted FEV1 in current asthmatic subjects. *Chest*. 1994 Oct;106(4):1089-93.
367. Gratziou C, Lignos M, Dassiou M, Roussos C. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J*. 1999 Oct;14(4):897-901.
368. Adisesh LA, Kharitonov SA, Yates DH, Snashell DC, Newman-Taylor AJ, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide is increased in laboratory animal allergy. *Clin Exp Allergy*. 1998 Jul;28(7):876-80.
369. Silvestri M, Sabatini F, Spallarossa D, Fregonese L, Battistini E, Biraghi MG, et al. Exhaled nitric oxide levels in non-allergic and allergic mono- or polysensitized children with asthma. *Thorax*. 2001 Nov;56(11):857-62.
370. Scott M, Raza A, Karmaus W, Mitchell F, Grundy J, Kurukulaaratchy RJ, et al. Influence of atopy and asthma on exhaled nitric oxide in an unselected birth cohort study. *Thorax*. 2010 Mar;65(3):258-62.
371. Blanc P. Occupational asthma in a national disability survey. *Chest*. 1987 Oct;92(4):613-7.
372. Kogevinas M, Anto JM, Sunyer J, Tobias A, Kromhout H, Burney P. Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: a population-based study. European Community Respiratory Health Survey Study Group. *Lancet*. 1999 May 22;353(9166):1750-4.
373. Kogevinas M, Anto JM, Soriano JB, Tobias A, Burney P. The risk of asthma attributable to occupational exposures. A population-based study in Spain. Spanish Group of the European Asthma Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Jul;154(1):137-43.
374. Thyssen JP, Linneberg A, Menne T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007 Nov;57(5):287-99.
375. Peláez A., Dávila I.J. *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Madrid: Ediciones Ergon; 2007.
376. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2003 Jan 11;361(9352):151-60.
377. Mesa del Castillo M. La marcha alérgica: dermatitis atópica, rinitis y asma. Factores de riesgo. *Jano*. 2002;1455:49-52.

9. ANEXOS



9.1. ANEXO 1

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la filagrina y fenotipo de asma.

INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CUMPLIMENTACIÓN DEL CUESTIONARIO

DATOS

- Todos los datos requeridos en el cuestionario deberán cumplimentarse en su totalidad de acuerdo con la información requerida, y deberá hacerse con bolígrafo. En caso de error no debe emplearse "lapp-ex", sino que debe de trazarse una línea sobre el dato a corregir y anotar a continuación el dato correcto, y colocando al lado la firma o iniciales de la persona que realiza la corrección y la fecha en que se realiza la misma.
- El investigador deberá cerciorarse de que todas las hojas del cuestionario estén correctamente cumplimentadas, firmadas y fechadas.

ABANDONOS

- Si algún paciente abandonara el estudio deberá especificarse claramente la causa. En caso de incomparencia se intentará localizar al paciente, y si es posible, se aclarará cuál fue la causa.

COMENTARIOS / OBSERVACIONES

- Cualquier observación relacionada con el estudio que el investigador considere oportuno realizar, se anotará en el apartado: COMENTARIOS / OBSERVACIONES

- 1 -

MUTACIONES DEL GEN DE LA FILAGRINA Y FENOTIPO DE ASMA	PACIENTE:	<table border="1"> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td colspan="5" style="text-align: center;">-</td> </tr> </table>						-				
-												
	Iniciales: Sexo: Edad:											

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

MUTACIONES DEL GEN DE LA FILAGRINA Y FENOTIPO DE ASMA

La información contenida en este documento es de uso exclusivo para el proyecto este investigación. Solamente pueden tener acceso a ella los investigadores que participan en el estudio y sus colaboradores.

CONTROL PREVIO: FASE DE SELECCIÓN

Fecha: _____

En esta visita previa se realiza la fase de selección, que consta de las siguientes evaluaciones:

- a) PRUEBAS DIAGNÓSTICAS
 - IN VIVO*
 - Tests cutáneos a batería estándar
 - Espirometría y prueba broncodilatadora
 - IN VITRO*
 - IgE total
- b) CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN
- c) INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO
- d) ADJUDICACIÓN DE CÓDIGO AL PACIENTE
- e) COMENTARIOS/OBSERVACIONES

b) CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

- **Grupo FENOTIPO ATÓPICO:**
 - Diagnosticados de asma según la GINA.
 - IgE total mayor de 140 UI/ml.
 - Tests cutáneos positivos para algún aeroalergeno de la batería estándar.
 - Historia clínica compatible con asma extrínseca y en la que concuerde la sensibilización con la clínica que presenta el paciente.
 - Raza caucásica y ascendencia española.
- **Grupo FENOTIPO INTRÍNSECO:**
 - Diagnosticados de asma según la GINA.
 - IgE total menor de 100 UI/ml.
 - Tests cutáneos negativos para la batería estándar de aeroalergenos.
 - Historia clínica compatible con asma intrínseca.
 - Raza caucásica y ascendencia española.
- **Grupo CONTROL:**
 - No debe presentar historia personal de asma, atopia u otra enfermedad alérgica.
 - Raza caucásica y ascendencia española.

EL PACIENTE	<input type="checkbox"/> <small>escribir SI o NO</small>	CUMPLE TODOS LOS CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y NINGUNO DE LOS DE EXCLUSIÓN
-------------	--	---

1.- DATOS DE FILIACIÓN Y ANTECEDENTES PERSONALES

- Fecha de Nacimiento:

- Sexo: Masculino Femen.

- ¿Antecedentes Familiares de Atopia? Si No

- ¿Presenta o ha presentado Dermatitis Atópica? Si No

- ¿Padece Dermatitis de Contacto? Si No

(Contactantes:)

- ¿Padece Alergia Alimentaria? Si No

(Alimentos:)

Tipo: S.A.O. Urticaria-AE Anafilaxia Otros

- ¿Padece alergia a algún fármaco? Si No

(Fármacos:)

- ¿Tolera AINES? Si No

- ¿Padece Psoriasis? Si No

Índice PASE:

- ¿Padece Ictiosis Vulgar? Si No

- ¿Padece Rinitis? Si No

Intensidad según ARIA:

Leve Intermiteinte

No alteración del ocio, actividades, deporte.
Escuela / trabajo normal.
No síntomas molestos. ≤4 días a la semana o ≤4 semanas

Moderada (1-3 ítems) Persistente

Sueño alterado.
Alteración del ocio, actividades, deporte.
Alteración escuela / trabajo.
Síntomas molestos. >4 días a la semana Y >4 semanas

Severa (4 ítems)

Sueño alterado.
Alteración del ocio, actividades, deporte.
Alteración escuela / trabajo.
Síntomas molestos.

- ¿Asocia Anosmia? Si No

- ¿Asocia Poliposis nasal? Si No

- ¿Asocia Rinosinusitis Crónica? Si No

Gravedad según EPOS:

Leve (EVA 0-3cm)

Moderada (EVA >3-7cm)

Grave (EVA >7-10cm)

¿Hasta qué punto son molestos sus síntomas de rinosinusitis?

↔

No son molestos La peor molestia imaginable

- ¿Tiene Asma Ocupacional? Si No

- ¿Tiene asma empeorado en su puesto de trabajo? Si No

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la filagrina y fenotipo de asma.

2.1.- TESTS CUTÁNEOS A BATERÍA ESTÁNDAR

FECHA:
 dd mm aaaa

Histamina =

C.Negativo = (diámetro mayor)

Phleum	
Cynodon	
Olivo	
Parietaria	
Chenopodium	
Salsola	
Platano	
Ciprés	
Alternaria	
D. pteromyssinus	
E.perro	
E.gato	
Cladosporium	
Aspergillus	
Tyrophagus	
Lepydoglyphus	

- 8 -

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la filagrina y fenotipo de asma.

2.2.- ESPIROMETRÍA Y PRUEBA BRONCODILATADORA

FECHA:
 dd mm aaaa

FVC basal	% teórico
FEV1 basal	% teórico
FEV1/FVC	
PEF basal	% teórico
MMEF basal	% teórico

Respuesta broncodilatadora previa: % mejora FEV1

2.3.- OXIDO NÍTRICO EXHALADO

FECHA:
 dd mm aaaa

FeNO:

- 9 -

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la filagrina y fenotipo de asma.

2.4.- IGE TOTAL

FECHA:

<input type="text"/>					
dd	mm	aaaa			

IgE Total:

--

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la filagrina y fenotipo de asma.

2.5.- ANÁLISIS DE MUTACIONES DEL GEN DE LA FILAGRINA

3.- SEVERIDAD DEL ASMA SEGÚN LA GINA

Intermitente	<ul style="list-style-type: none"> -Síntomas menos de 1 vez por semana -Exacerbaciones de corta duración -Síntomas Nocturnos no más de 2 veces al mes -FEV1 o PEF > 80% del valor predicho -Variabilidad en el PEF o FEV1 < 20%
Persistente leve	<ul style="list-style-type: none"> -Síntomas más de 1 vez por semana pero menos de 1 vez al día -Exacerbaciones pueden afectar la actividad y el sueño -Síntomas Nocturnos más de 2 veces al mes -FEV1 o PEF > 80% del valor predicho -Variabilidad en el PEF o FEV1 < 20 – 30%
Moderada persistente	<ul style="list-style-type: none"> -Síntomas diarios -Exacerbaciones afectan la actividad y el sueño -Síntomas Nocturnos más de 1 vez a la semana -Uso diario de inhaladores con beta2 agonistas de acción corta -FEV1 o PEF 60-80% valor predicho -Variabilidad en el PEF o FEV1 > 30%
Severa persistente	<ul style="list-style-type: none"> -Síntomas Diarios -Exacerbaciones frecuentes -Síntomas frecuentes de asma nocturna -Limitación de realizar actividades físicas -FEV1 o PEF ≤ 60% valor predicho -Variabilidad en el PEF o FEV1 > 30%

4.- ESCALÓN DE TRATAMIENTO ACTUAL SEGÚN LA GINA

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Educación sobre el asma Cambio ambiental				
Agonistas β2 de acción rápida según se requiera				
Decisiones de controladores	Seleccionar uno CSI inhalado de baja dosis	Seleccionar uno CSI inhalado de baja dosis más un medicamento antiinflamatorio	Agregar uno o más CSI inhalado de media o alta dosis más un medicamento antiinflamatorio	Agregar uno o más Glucocorticoides oral (corta alta dosis)
	Modificador de leucotrieno*	CSI de baja dosis o alta dosis	Modificador de leucotrieno	Tratamiento anti IGE
		CSI de baja dosis más un medicamento antiinflamatorio	Terapias de liberación sostenida	
		CSI de baja dosis más un medicamento antiinflamatorio	Terapias de liberación sostenida	

	Paso 1
	Paso 2
	Paso 3
	Paso 4
	Paso 5

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la flagrina y fenotipo de asma.

5.- CUESTIONARIO MINI-AQLQ

Mini-AQLQ: Cuestionario de Calidad de Vida en pacientes con asma

Le rogamos responda a todas las preguntas señalando con un círculo la respuesta que mejor describa cómo se ha encontrado **durante las dos últimas semanas, debido al asma.**

EN GENERAL, ¿CON QUÉ FRECUENCIA DURANTE LAS 2 ÚLTIMAS SEMANAS:

	Siempre 1	Casi siempre 2	Gran parte del tiempo 3	Parte del tiempo 4	Poco tiempo 5	Casi nunca 6	Nunca 7
1. NOTÓ QUE LE FALBA EL AIRE debido al asma?	1	2	3	4	5	6	7
2. Sintió que le molestaba el POLVO, o tuvo que evitar un lugar debido al POLVO?	1	2	3	4	5	6	7
3. Se sintió FRUSTRADO O IRRITADO debido al asma?	1	2	3	4	5	6	7
4. Sintió molestias debido a la TOS?	1	2	3	4	5	6	7
5. TUVO MIEDO DE NO TENER A MANO SU MEDICACIÓN PARA EL ASMA?	1	2	3	4	5	6	7
6. Notó una sensación de AHOGO U OPRESIÓN EN EL PECHO?	1	2	3	4	5	6	7
7. Sintió que le molestaba el HUMO DEL TABACO, o tuvo que evitar un lugar debido al HUMO DEL TABACO?	1	2	3	4	5	6	7
8. Tuvo DIFICULTADES PARA DORMIR BIEN POR LA NOCHE debido al asma?	1	2	3	4	5	6	7

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Mutaciones del gen de la flagrina y fenotipo de asma.

	Siempre 1	Casi siempre 2	Gran parte del tiempo 3	Parte del tiempo 4	Poco tiempo 5	Casi nunca 6	Nunca 7
9. Se sintió PREOCUPADO POR TENER ASMA?	1	2	3	4	5	6	7
10. Sintió SILBIDOS O PITOS en el pecho?	1	2	3	4	5	6	7
11. Sintió que le molestaba o tuvo que evitar salir de casa DEBIDO AL TIEMPO O LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA?	1	2	3	4	5	6	7

¿HASTA QUÉ PUNTO EL ASMA LE HA LIMITADO PARA HACER ESTAS ACTIVIDADES DURANTE LAS 2 ÚLTIMAS SEMANAS?

	Totalmente limitado 1	Extremada- mente limitado 2	Muy limitado 3	Moderada- mente limitado 4	Algo limitado 5	Poco limitado 6	Nada limitado 7
12. ESFUERZOS INTENSOS (como darse prisa, hacer ejercicio, subir escaleras corriendo, hacer deporte)	1	2	3	4	5	6	7
13. ESFUERZOS MODERADOS (como caminar, hacer las tareas del hogar, trabajar en el jardín o en el huerto, hacer la compra, subir escaleras sin correr)	1	2	3	4	5	6	7
14. ACTIVIDADES SOCIALES (como hablar, jugar con niños/animales domésticos, visitar a amigos/familiares)	1	2	3	4	5	6	7
15. ACTIVIDADES REALIZADAS CON SU TRABAJO (tareas que tiene que hacer en su trabajo*)	1	2	3	4	5	6	7

* Si no está trabajando, responda a esta pregunta pensando en las tareas que tiene que hacer la mayoría de los días

Puntuación Total:

9.2. ANEXO 2

SEXO vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Dermatitis de Contacto	V=3,1% (5) vs M=28,6% (68) p<0,001 OR 0,77 (0,27-2,17)	V=6,3%(5) vs M=41,4%(29) p<0,001 OR 10,61 (3,812-29,50)	V=0%(0) vs M=38,2%(39) p<0,001 OR no calculable
IgE total	V=291,67±541,64 vs M=120,21±194,28 p<0,001	V=459,94±678,08 vs M=288,18±278,53 p=0,040	V=116,30±180,96 vs M=46,20±60,11 p=0,012
FEV1/FVC		V=74,97±7,81 vs M=77,90±7,98 p=0,025	
PEF	V=92,21±18,94 vs M=97,06±21,76 p=0,045		V=83,93±19,50 vs M=93,36±22,55 p=0,014

EDAD vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Edad – IgE total	R=-0,121 p=0,015		
Edad - FVC	R=-0,318 p<0,001	R=-0,180 p=0,028	R=-0,269 p=0,001
Edad – FEV1	R=-0,317 p<0,001	R=-0,186 p=0,022	p=-0,301 p<0,001
Edad – FEV1/FVC	R=-0,437 p<0,001	R=-0,342 p<0,001	p=-0,457 p<0,001
Edad - PEF	R=-0,329 p<0,001		R=-0,344 p<0,001
Edad - MMEF	R=-0,445 p<0,001	R=-0,323 p<0,001	p=-0,420 p<0,001
Edad – mejoría PBD	R=0,177 p=0,002	R=0,230 p=0,005	p=0,177 p=0,031
Edad - FeNO	R=-0,160 p=0,006		

ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Dermatitis Atópica	8,3% (10) vs 1,8% (5) p=0,003 OR 5,00 (1,67-14,97)		
Dermatitis de Contacto	28,3% (34) vs 13,9% (39) p=0,001 OR 2,44 (1,45-4,12)		37,0%(17) vs 21,2%(22) p=0,047 OR 2,18 (1,02-4,68)
Alergia Alimentaria	15,8% (19) vs 4,6% (13) p<0,001 OR 3,86 (1,84-8,11)		
Rinitis	90,0% (108) vs 54,6% (153) p<0,001 OR 7,47 (3,93-14,18)	98,6%(73) vs 89,5%(68) p=0,034 OR 8,59 (1,05-70,48)	
Edad	41,33±15,78 vs 50,77±18,05 p<0,001	33,69±11,18 vs 38,57±14,50 p=0,023	
FEV1	96,51±16,07 vs 90,73±17,99 p=0,005	98,93±14,00 vs 93,91±14,03 p=0,030	
FEV1/FVC	77,46±7,05 vs 72,84±9,01 p<0,001	78,72±7,12 vs 74,02±8,17 p<0,001	75,42±6,52 vs 71,98±9,53 p=0,011
PEF	99,06±18,89 vs 92,35±21,47 p=0,006		
MMEF	69,63±22,69 vs 59,33±26,82 p=0,001	74,37±21,15 vs 65,29±20,18 p=0,008	
IgE total	269,76±486,20 vs 155,31±326,72 p=0,019		

IgE TOTAL vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Edad – IgE total	R=-0,121 p=0,015		

DERMATITIS ATÓPICA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Dermatitis de Contacto	40,0% (6) vs 17,4% (67) p=0,038 OR 3,16 (1,09-9,19)		
Alergia Alimentaria	33,3% (5) vs 7,0% (27) p=0,004 OR 6,63 (2,11-20,78)		
Rinitis	93,3% (14) vs 64,2% (247) p=0,024 OR 7,82 (1,02-60,12)		
Gravedad GINA	20,0%(3)/6,7%(1)/73,3%(11)/0% vs 1,8%(5)/9,1%(26)/82,1%(234)/7,0%(20) p=0,014		
Escalon TTO GINA	20,0%(3)/13,3%(2)/53,3%(8)/13,3%(2)/0% vs 2,5%(7)/8,8%(25)/56,8%(162)/29,5%(84)/2,5%(7) p=0,026		
Antecedentes familiares de Atopia	66,7% (10) vs 28,6% (110) p=0,003 OR 5,00 (1,67-14,96)		
Edad	31,13±11,61 vs 48,59±17,81 p<0,001	21,0±0 vs 57,18±15,61 p=0,022	
IgE total		664,69±917,82 vs 350,56±475,89 p=0,036	

DERMATITIS DE CONTACTO vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Alergia Alimentaria	15,1%(11) vs 6,4%(21) p=0,028 OR 2,58 (1,19-5,63)		
Psoriasis	4,1%(3) vs 0,4%(1) p=0,046 OR 9,69 (0,99-94,60)		
Rinitis	87,7% (64) vs 60,2% (197) p<0,001 OR 4,69 (2,26-9,76)		
Sexo	V=6,8%(5)vs48,0%(157) y M=93,2%(68)vs52,0% (170) p<0,001 OR 12,56(4,94-31,95)	V= 14,7%(5) vs 64,7%(75) / M=85,3%(29) vs 35,3%(41) p<0,001 OR 10,61(3,82-29,50)	V=0%(0) vs 43,2%(48) / M=100%(39) vs 58,8%(63) p<0,001 OR no calculable
Antecedentes familiares de Atopia	46,6%(34) vs 26,3%(86) p=0,001 OR 2,44 (1,45-4,12)		43,6%(17) vs 26,1%(29) p=0,047 OR 2,18 (1,02-4,68)
Dermatitis Atópica	8,2%(6) vs 2,8%(9) p=0,038 OR 3,16 (1,09-9,19)		
miniAQLQ	5,92±0,95 vs 6,17±0,78 p=0,026		
ACT	20,49±4,85 vs 21,91±4,18 p=0,027	20,47±4,09 vs 21,93±3,66 p=0,048	

PSORIASIS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Gravedad ARIA	0%/50%(1)/50%(1) vs 19,4%(27)/79,9%(111))0,7%(1) p=0,028	0%/19,4%(27) vs 50,0%(1)/79,9%(111) vs 50,0%(1)/0,7%(1) p=0,026	
Dermatitis de Contacto	75,0%(3) vs 23,6%(70) p=0,046 OR 9,686 (0,992 - 94,599)		
FVC		127,65±3,04 vs 100,49±12,66 p=0,003	

ALERGIA ALIMENTARIA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Rinitis	90,6%(29) vs 63,0%(232) p=0,002 OR 5,67 (1,69-18,95)		
Antecedentes familiares de Atopia	59,4%(19) vs 27,4%(101) p<0,001 OR 3,86 (1,84-8,11)		
Dermatitis Atópica	15,6%(5) vs 2,7% (10) p=0,004 OR 6,63 (2,11-20,78)		
Dermatitis de Contacto	34,4%(11) vs 16,8%(62) p=0,028 OR 2,58 (1,19 5,63)		
Edad	36,25±13,87 vs 48,95±17,88 p<0,001		
IgE total	446,06±672,20 vs 167,35±341,17 p=0,027		
PEF		93,39±19,75 vs 101,18±17,60 p=0,041	
miniAQLQ		5,81±0,92 vs 6,20±0,70 p=0,014	
ACT		20,25±4,25 vs 21,91±3,64 p=0,037	

ALERGIA A FÁRMACOS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Rinitis	91,4%(53) vs 60,8%(208) p<0,001 OR 6,83 (2,66-17,52)		
Anosmia	31,0%(18) vs 7,9%(19) p<0,001 OR 5,28 (2,55-10,93)	21,1%(4) vs 6,1%(8) p=0,047 OR 4,100 (1,101 - 15,264)	35,9%(14) vs 9,9%(11) p=0,001 OR 5,09 (2,06-12,56)
Poliposis	39,7%(23) vs 8,2%(28) p<0,001 OR 7,37 (3,84-14,16)		51,3%(20) vs 19,8%(22) p<0,001 OR 4,26 (1,95-9,31)
Rinosinusitis	35,9%(14) vs 57,7%(64) p=0,025 OR 0,41 (0,19-0,87)		35,9%(14) vs 57,7%(64) p=0,025 OR 0,41 (0,19-0,87)
Edad	52,78±17,54 vs 47,12±17,87 p=0,026		
MMEF	56,77±24,81 vs 65,05±25,72 p=0,027		
Gravedad GINA		15,8%(3)/3,1%(4) vs 15,8%(3)/12,2%(16) vs 63,2%(12)/83,2%(109)) vs 5,3%(1)/1,5%(2) p=0,035	
Escalón tratamiento		21,1%(4)/3,8%(5) vs 10,5%(2)/12,2%(16) vs 36,8%(7)/63,4%(83) vs 31,6%(6)/20,6%(27) vs 0%/0% p=0,014	

HIPERSENSIBILIDAD A AINE vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Rinitis	91,2%(31) vs 62,8%(230) p=0,001 OR 6,11 (1,83-20,36)		
Anosmia	47,1%(16) vs 7,9%(21) p<0,001 OR 10,37(4,65-23,25)		50,0%(14) vs 9,0%(11) p<0,001 OR 10,09(3,84-26,51)
Poliposis	67,6%(23) vs 7,7%(28) p<0,001 OR 25,24(11,17-57,04)	50,0%(3) vs 4,2%(6) p=0,003 OR 23,00(3,81-138,72)	71,4%(20) vs 18,0%(22) p<0,001 OR 11,36(4,43-29,12)
Rinosinusitis	17,9%(5) vs 59,8%(73) p<0,001 OR 0,15(0,05- 0,41)		17,9%(5) vs 59,8%(73) p<0,001 OR 0,15(0,05-0,41)
EPOS	80,0%(4)/20,0%(1)/0% vs 19,2%(14)/71,2%(52)/9,6%(7) p=0,014		80,0%(4)/19,2%(14) vs 20,0%(1)/71,2%(52) vs 0%/9,6%(7) p=0,015
Gravedad GINA		16,7%(1)4,2%(6) vs 16,7%(1)/12,5%(18) vs 50%(3)/81,9%(118) vs 16,7%(1) vs 1,4%(2) p=0,034	
Escalon TTO Asma	5,9%(2)/5,9%(2)/35,3%(12)/50,0%(17)/2,9%(1) vs 3,0%(8)/9,4%(25)/59,4%(158)/25,9%(69)/2,3%(6) p=0,025	33,3%(2)/4,9%(7) vs 0%/12,5%(18) vs 0%/62,5%(90) vs 66,7%(4)/20,1%(29) vs 0%/0% p=0,001	
Edad	57,41±14,44 vs 47,06±17,97 p<0,001		
FEV1/FVC	90,24±20,50 vs 93,40±17,04 p=0,003	69,99±12,70 vs 76,60±7,70 p=0,047	
PEF	88,04±22,73 vs 95,92±20,30 p=0,036		
MMEF	53,58±26,56 vs 64,72±25,38 p=0,017		
FeNO	26,29±14,07 vs 33,10±32,21 p=0,032		
miniAQLQ	6,40±0,70 vs 6,07±0,84 p=0,030		6,44±0,65 vs 6,01±0,94 p=0,024

RINITIS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Poliposis	19,5%(51) vs 0%(0) p<0,001 OR 1,24 (1,17-1,32)		35,0%(42) vs 0% p<0,001 OR no calculable
Anosmia			20,0%(24) vs 3,3%(1) p=0,028 OR 7,25 (0,94- 55,93)
Gravedad GINA	3,1%(8)/9,2%(24)/83,1%(217)/4,6%(12) vs 0%/7,7%(3)/71,8%(28)/20,5%(8) p=0,008	5,0%(7)/0% vs 13,5%(19)/0% vs 80,9%(114)/77,8%(7) vs 0,7%(1)/22,2%(2) p=0,021	
Antecedentes Familiares de atopia	41,4%(108) vs 8,6%(12) p<0,001 OR 7,47 (3,93-14,18)	51,8%(73) vs 11,1%(1) p=0,034 OR 8,59 (1,05-70,48)	
Dermatitis Atópica	5,4%(14) vs 0,7%(1) p=0,024 OR 7,82 (1,02-60,12)		
Dermatitis de Contacto	24,5%(64) vs 6,5%(9) p<0,001 OR 4,69 (2,26-9,76)		
Alergia Alimentaria	11,1%(29) vs 2,2%(3) p=0,002 OR 5,67 (1,69-18,95)		
Alergia a Farmacos	20,3%(53) vs 3,6%(5) p<0,001 OR 6,83 (2,66-17,52)		
Hipersensibilidad a AINE	11,9%(31) vs 2,2%(3) p=0,001 OR 6,11 (1,83-20,36)		
Edad	45,02±16,91 vs 53,42±18,52 p<0,001		
FVC	98,41±15,64 vs 89,34±16,26 p=0,001		95,45±17,87 vs 86,17±15,97 p=0,010
FEV1	94,36±16,55 vs 84,26±20,76 p=0,006		91,55±19,32 vs 82,26±19,67 p=0,020
PEF	96,62±20,07 vs 84,41±21,96 p=0,001		92,26±21,68 vs 82,65±21,99 p=0,032
MMEF	64,89±24,86 vs 53,86±29,43 p=0,012		
FeNO	34,39±32,20 vs 18,59±11,17 p<0,001	39,32±35,93 vs 17,67±9,78 p<0,001	28,59±26,15 vs 18,87±11,70 p=0,003
IgE	235,57±430,35 vs 103,42±259,27 p<0,001		
ACT		21,50±3,88 vs 23,22±1,30 p=0,005	

INTENSIDAD GUIA ARIA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
FeNO	31,45±18,64 vs 40,56±43,53 vs 40,92±36,08 vs 38,16±31,89 vs 121,00±140,01 p=0,024	31,45±18,64 vs 40,56±43,53 vs 40,92±36,08 vs 38,16±31,89 vs 121,00±140,01 p=0,024	
IgE total	302,71±180,49 vs 858,51±1197,34 vs 354,37±198,85 vs 310,51±373,79 vs 32,50±14,00 p=0,003	302,71±180,49 vs 858,51±1197,34 vs 354,37±198,85 vs 310,52±373,79 vs 32,50±14,00 p=0,003	
Anosmia		0%(0)/18,8%(3)/8,3%(1)/5,0%(5)/50%(1) vs 100%(11)/81,3%(13)/91,7%(11)/95,0%(95)/50%(1) p=0,045	

ANOSMIA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Poliposis	67,6%(25) vs 9,9%(26) p<0,001 OR 18,99(8,54-42,20)	33,3%(4) vs 3,6%(5) p=0,002 OR 13,30 (2,98-59,36)	84,0%(21) vs 16,8%(21) p<0,001 OR 26,00(8,09-83,57)
Rinitis			96,0%(24) vs 76,8%(96) p=0,028 OR 7,25 (0,94-55,93)
Rinosinusitis	12,0%(3) vs 60,0%(75) p<0,001 OR 0,09 (0,03-0,32)		12,0%(3) vs 60,0%(75) p<0,001 OR 0,09 (0,03-0,32)
Escalon TTO Asma	8,1%(3)/0%/51,4%(19)/40,5%(15)/0% vs 2,7%(7)/10,3%(27)/57,4%(151)/27,0%(71)/2,7%(7) p=0,034	25,0%(3)/4,3%(6) vs 0%/13,0%(18) vs 50,0%(6) vs 60,9%(84) vs 25,0%(3)/21,7%(30) vs 0%/0% p=0,049	
Alergia a Farmacos	48,6%(18) vs 15,2%(40) p<0,001 OR 5,28 (2,55-10,93)	33,3%(4) vs 10,9%(15) p=0,047 OR 4,10 (1,10-15,26)	56,0%(14) vs 20,0%(25) p=0,001 OR 5,09 (2,06-12,56)
Hipersensibilidad a AINE	43,2%(16) vs 6,8%(18) p<0,001 OR 10,37(4,62-23,25)		56,0%(14) vs 11,2%(14) p<0,001 OR 10,09(3,84-26,51)
Edad	55,14±14,19 vs 45,34±18,03 p<0,001		

POLIPOSIS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Escalon TTO Asma	3,9%(2)/5,9%(3)/37,3 %(19)/51,0%(26)/2,0 %(1) vs 3,2%(8)/9,6%(24)/60, 6%(151)/24,1%(60)/2, 4%(6) p=0,004		0%/0,9%(1) vs 4,8%(2)/6,5%(7) vs 38,1%(16)/59,3%(64) vs 54,8%(23)/27,8%(30) vs 2,4%(1)/5,6%(6) p=0,034
Alergia a Farmacos	45,1%(23) vs 10,0%(35) p<0,001 OR 7,37 (3,84-14,16)		47,6%(20) vs 17,6%(19) p<0,001 OR 4,26 (1,95-9,31)
Hipersensibilidad a AINE	45,1%(23) vs 3,2%(11) p<0,001 OR 25,24(11,17- 57,04)	33,3%(3) vs 2,1%(3) p=0,003 OR 23,00 (3,81- 138,72)	47,6%(20) vs 7,4%(8) p<0,001 OR 11,36(4,43-29,12)
Rinitis	100%(51) vs 60,2%(210) p<0,001 OR no calculable		100%(42) vs 72,2%(78) p<0,001 OR no calculable
Anosmia	49,0%(25) 4,8%(12) p<0,001 OR 18,99 (8,54- 42,20)	44,4%(4) vs 5,7%(8) p=0,002 OR 13,30(2,98-59,36)	50,0%(21) vs 3,7%(4) p<0,001 OR 26,00(8,09-83,57)
Edad	56,59±14,45 vs 46,67±18,04 p<0,001		
FVC			101,19±16,65 vs 91,03±17,71 p=0,004
FEV1			95,40±20,06 vs 87,47±19,17 p=0,026
FEV1/FVC	72,51±7,75 vs 75,13±8,68 p=0,047		
PEF			96,31±22,46 vs 88,01±21,48 p=0,038
miniAQLQ	6,44±0,48 vs 6,04±0,87 p<0,001		6,46±0,50 vs 5,95±0,98 p<0,001
ACT	22,96±2,82 vs 21,28±4,60 p=0,001		23,02±3,02 vs 20,95±5,39 p=0,004

RINOSINUSITIS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Alergia a Farmacos	17,9%(14) vs 34,7%(25) p=0,025 OR 0,41 (0,19-0,87)		17,9%(14) vs 34,7%(25) p=0,025 OR 0,41 (0,19-0,87)
Hipersensibilidad a AINE	6,4%(5) vs 31,9%(23) p<0,001 OR 0,14 (0,05-0,41)		6,4%(5) vs 31,9%(23) p<0,001 OR 0,15 (0,05-0,41)
Anosmia	3,8%(3) vs 30,6%(22) p<0,001 OR 0,09 (0,03-0,32)		3,8%(3) vs 30,6%(22) p<0,001 OR 0,09 (0,03-0,32)
miniAQLQ	5,86±1,06 vs 6,34±0,61 p=0,001		5,86±1,06 vs 6,34±0,61 p=0,001
ACT	20,56±5,67 vs 22,58±3,71 p=0,010		20,56±5,67 vs 22,58±3,71 p=0,010

INTENSIDAD GUIA EPOS vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Hipersensibilidad a AINE	80,0%(4)/20,0%(1)/0 % p=0,014		22,2%(4) vs 1,9%(1) vs 0% p=0,013

FeNO vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Edad - FeNO	R=-0,160 p=0,006		
FeNO - miniAQLQ	R=-0,143 p=0,013		R=-0,178 p=0,029
FeNO - ACT	R=-0,0125 p=0,030		R=-0,165 p=0,044

GRAVEDAD GUIA GINA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Escalon TTO Asma	100%(8)/0%/0%/0%/0% vs 7,4%(2)/92,6%(25)/0%/0%/0% vs 0%/0,8%(2)/68,2%(167)/ 31,0%(76)/0% vs 0%/0%/15,0%(3)/50%(10)/35%(7) p<0,001	100%(7)/0%/0%/0%/0% vs 10,5%(2)/89,5%(17)/0%/0%/0% vs 0%/0,8%(1)/74,4%(90)/24,8%(30)/0% vs 0%/0%/0%/100%(3)/0% p<0,001	100%(1)/0%/0%/0%/0% vs 0%/100%(8)/0%/0%/0% vs 0%/0,8%(1)/62,1%(77)/37,1%(46)/0% vs 0%/0%/17,6%(3)/41,2%(7)/41,2%(7) p<0,001
Dermatitis Atopica	20%(3) vs 6,7%(1) vs 73,3%(11) vs 0% p=0,013		
Alergia a Fármacos		42,9%(3) vs 15,8%(3) vs 9,9% (12) vs 33,3%(1) p=0,036	
Hipersensibilidad a AINE		14,3%(1) vs 5,3%(1) vs 2,5%(3) vs 33,3%(1) p=0,036	
Rinitis	3,1%(8) vs 9,2%(24) vs 83,1%(217) vs 4,6%(12) p=0,007	100%(7) vs 100%(19) vs 94,2%(114) vs 33,3%(1) p=0,021	
Edad	34,50±15,01 vs 36,00±12,53 vs 46,69±17,65 vs 63,85±13,94 p<0,001	36,29±15,27 vs 33,95±11,22 vs 35,75±12,58 vs 66,33±11,01 p=0,001	22,00±0 vs 40,88±14,86 vs 57,37±15,19 vs 63,41±14,64 p=0,001
FVC	102,10±13,54 vs 101,56±14,05 vs 97,89±15,59 vs 81,35±15,97 p<0,001		83,50±0 vs 98,07±18,41 vs 95,19±17,34 vs 80,49±16,99 p=0,011
FEV1	102,36±9,27 vs 97,62±13,01 vs 94,39±16,52 vs 66,58±14,02 p<0,001	102,67±9,97 vs 96,25±12,32 vs 97,09±13,26 vs 54,53±2,45 p<0,001	100,20±0 vs 100,89±14,87 vs 91,77±18,87 vs 68,71±14,17 p<0,001
FEV1/FVC	80,55±8,87 vs 76,98±8,00 vs 75,18±7,63 vs 63,21±11,35 p<0,001	77,91±5,17 vs 74,69±6,43 vs 77,18±7,18 vs 48,89±3,29 p<0,001	99,03±0 vs 82,41±9,13 vs 73,22±7,58 vs 65,74±10,32 p<0,001
PEF	110,86±14,91 vs 103,30±18,98 vs 95,59±19,48 vs 70,72±21,68 p<0,001	110,04±15,91 vs 102,73±18,21 vs 99,90±16,60 vs 49,40±12,95 p<0,001	116,60±0 vs 104,64±21,97 vs 91,38±21,15 vs 74,48±20,90 p=0,002
MMEF	76,60±21,85 vs 72,73±20,86 vs 64,67±25,20 vs 30,82±11,96 p<0,001	71,77±18,42 vs 67,96±14,87 vs 71,10±21,07 vs 22,77±5,38 p=0,001	110,40±0 vs 84,08±28,97 vs 58,38±27,31 vs 32,24±12,33 p<0,001
mejoría PBD	6,81±2,99 vs 10,37±8,04 vs 12,63±8,91 vs 20,67±10,98 p<0,001	6,90±3,22 vs 11,26±8,97 vs 12,80±8,49 vs 24,23±3,09 p=0,025	6,20±0 vs 8,25±5,07 vs 12,46±9,34 vs 20,05±11,80 p=0,008
miniAQLQ	6,41±0,41 vs 6,27±0,56 vs 6,16±0,75 vs 5,20±1,49 p<0,001		6,20±0 vs 6,44±0,65 vs 6,20±0,70 vs 5,13±1,57 p<0,001
ACT	23,25±1,58 vs 21,93±3,50 vs 21,88±3,93 vs 16,60±7,68 p<0,001		23,00±0 vs 22,63±4,41 vs 22,24±3,85 vs 15,76±7,94 p<0,001

ESCALON TTO GINA vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
Dermatitis Atópica	20%(3) vs 13,3%(2) vs 53,3%(8) vs 13,3%(2) vs 0% p=0,030		
Alergia a Fármacos		44,4%(4) vs 11,1%(2) vs 7,8%(7) vs 18,2%(6) vs 0% p=0,015	
Hipersensibilidad a AINE	5,9%(2) vs 5,9%(2) vs 35,3%(12) vs 50%(17) vs 2,9%(1) p=0,023	22,2%(2) vs 0% vs 0% vs 12,1%(4) vs 0% p=0,001	
Anosmia	8,1%(3) vs 0% vs 51,4%(19) vs 40,5%(15) vs 0% p=0,031	33,3%(3) vs 0% vs 6,7%(6) vs 9,1%(3) vs 0% p=0,042	
Poliposis	3,9%(2) vs 5,9%(3) vs 37,2%(19) vs 51,0%(26) vs 2,0%(1) p=0,004		0% vs 22,2%(2) vs 20,0%(16) vs 43,4%(23) vs 14,3%(1) p=0,033
Gravedad GINA	80,0%(8)/20,0%(2)/0%/0% vs 0%/92,6%(25)/7,4%(2)/0% vs 0%/0%/98,2%(167)/1,8%(3) vs 0%/0%/88,4%(76)/11,6%(10) vs 0%/0%/0%/100%(7) p<0,001	77,8%(7)/22,2%(2)/0%/0% vs 0%/94,4%(17)/5,6%(1)/0% vs 0%/0%/100%(90)/0% vs 0%/0%/90,9%(30)/9,1%(3) vs 0%/0%/0%/0% p<0,001	100%(1)/0%/0%/0% vs 0%/88,9%(8)/11,1%(1)/0% vs 0%/0%/96,3%(77)/3,8%(3) vs 0%/0%/86,8%(46)/13,2%(7) vs 0%/0%/0%/100%(7) p<0,001
Edad	34,40±13,54 vs 34,93±13,85±46,21±17,54 ± 50,73±18,01 vs 65,71±9,39 p<0,001		22,00±0 vs 38,67±15,39 vs 57,43±15,63 vs 58,81±14,33 vs 65,71±9,39 p<0,001
FEV1	104,48±10,91 vs 96,44±11,85 vs 94,72±16,41 vs 89,08±19,70 vs 71,40±13,80 p<0,001	104,96±11,46 vs 94,70±10,49 vs 97,85±12,94 vs 90,99±17,96 p=0,024	100,20±0 vs 99,92±14,21 vs 91,21±19,06 vs 87,89±20,79 vs 71,40±13,80 p=0,044
FEV1/FVC	79,92±7,97 vs 77,06±8,19 vs 75,94±7,91 vs 71,78±8,77 vs 63,26±6,10 p<0,001	77,80±4,56 vs 74,96±6,98 vs 77,95±6,90 vs 72,28±10,41 p=0,004	99,03±0 vs 81,26±9,21 vs 73,68±8,40 vs 71,47±7,66 vs 63,26±6,10 p<0,001
PEF	111,74±14,71 vs 101,27±18,82 vs 97,21±19,43 vs 88,69±21,32 vs 72,10±21,50 p<0,001	111,20±15,50 vs 100,97±17,63 vs 101,56±16,88 vs 90,92±19,98 p=0,006	116,60±0 vs 101,89±22,15 vs 92,32±20,99 vs 87,30±22,19 vs 72,10±21,50 p=0,032
MMEF	76,72±19,40 vs 72,41±21,13 vs 66,01±24,01 vs 56,51±28,57 vs 33,27±7,31 p<0,001		110,40±0 vs 81,30±28,35 vs 58,24±25,39 vs 53,51±30,65 vs 33,27±7,31 p=0,002
Mejoría en PBD	6,69±2,83 vs 10,36±8,04 vs 11,89±8,58 vs 15,67±10,25 vs 18,10±8,35 p=0,001	6,74±2,99 vs 11,43±9,20 vs 12,05±7,96 vs 16,16±9,54 p=0,012	
FeNO	55,60±61,17 vs 38,85±34,10 vs 28,79±27,70 vs 33,64±29,58 vs 44,00±29,06 p=0,034		16,00±0 vs 24,11±18,30 vs 21,03±16,20 vs 33,45±31,59 vs 44,00±29,06 p=0,013
ACT	160,22±122,62 vs 214,03±254,68 vs 254,49±475,43 vs 185,40±369,07 vs 96,20±100,61 p=0,027		

miniAQLQ vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
FEV1 - miniAQLQ	R=0,146 p=0,012		
PEF - miniAQLQ	R=0,157 p=0,006	R=0,184 p=0,024	
FeNO - miniAQLQ	R=-0,143 p=0,013		R=-0,178 p=0,029
miniAQLQ - ACT	R=0,754 p<0,001	R=0,768 p<0,001	R=0,746 p<0,001

ACT vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
FEV1 - ACT	R=0,127 p=0,028		
FEV1/FVC - ACT	R=0,115 p=0,046		
PEF - ACT	R=0,126 p=0,029		
MMEF - ACT	R=0,123 p=0,033		
FeNO - ACT	R=-0,125 p=0,030		R=-0,165 p=0,044
miniAQLQ - ACT	R=0,754 p<0,001	R=0,768 p<0,001	R=0,746 p<0,001

ASMA OCUPACIONAL vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
miniAQLQ	4,60±1,04 vs 6,12±0,82 p=0,002	4,60±1,04 vs 6,16±0,73 p<0,001	
PEF		78,17±14,20 vs 100,16±18,05 p=0,038	

ASMA EMPEORADA EN EL TRABAJO vs	Asma TOTAL	Grupo Atópico	Grupo Intrínseco
miniAQLQ	5,66±0,94 vs 6,14±0,82 p=0,019	5,42±0,98 vs 6,17±0,73 p=0,007	
Mejoría en PBD	9,62±5,04 vs 13,01±9,34 p=0,016		