



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA,
GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA

ANÁLISIS DEL GEN FOXP3 EN PACIENTES CON ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y AUTOINMUNITARIAS

Doña Rosa M^a Pacheco González

2013



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA,
GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA

ANÁLISIS DEL GEN FOXP3 EN PACIENTES CON ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y AUTOINMUNITARIAS

Memoria presentada por
Doña Rosa M^a Pacheco González
para optar al grado de Doctor

Directores:

Catalina Sanz Lozano

María Isidoro García

Félix Lorente Toledano



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Da. MARÍA ISIDORO GARCÍA, Da. CATALINA SANZ LOZANO y D. FÉLIX LORENTE TOLEDANO, Profesores de la Universidad de Salamanca certifican que el trabajo de Tesis titulado “ANÁLISIS DEL GEN FOXP3 EN PACIENTES CON ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y AUTOINMUNITARIAS” ha sido realizado bajo su dirección por Da. ROSA M^a PACHECO GONZÁLEZ en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría, área de Pediatría, Unidad de Alergia e Inmunología Clínica y que reúne los requisitos necesarios para optar al título de Doctor.

En Salamanca a treinta de Marzo del dos mil trece.

Fdo. Da. María Isidoro García

Fdo. D. Félix Lorente Toledano

Fdo. Da. Catalina Saz Lozano

Dedicado a mi familia, por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer su colaboración,

A mis directores, porque sin ellos esto nunca habría sido posible. Félix Lorente, gran profesional y mejor persona. María Isidoro, diseñadora de este proyecto, con mente privilegiada. Calina Sanz, apasionada por su trabajo y siempre al pie del cañón.

Al Servicio de Pediatría del Hospital Universitario de Salamanca, por enseñarme cuanto sé de Pediatría. Especialmente a Jesús Prieto, Jesús Cedeño, Montse Martín, Pablo Prieto, Ricardo Torres, Antonio Grande y Julio De Manueles, por su colaboración desinteresada en la recogida de pacientes.

Al Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de Salamanca, por acogerme con cariño. Especialmente a Eva Macías, por enseñarme y colaborar en la recogida de pacientes.

Al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, por facilitarme sus servicios.

A Carmelo Ávila, por haberme enseñado con tanta dedicación el campo de la Estadística, desconocido para mí.

A Laura, Choni y David, por su paciencia y gran ayuda en el laboratorio.

Al resto de compañeros del grupo de investigación, por sus largas compañías.

A Carmen Lorenzo, por sus inestimables consejos.

A todos los residentes de pediatría del Hospital Universitario de Salamanca, por crecer juntos.

A mis compañeras de piso, por ser mi familia durante estos últimos años.

A mis amigos, por estar siempre ahí. Especialmente a Eli, que ha dado estilo a la tesis.

A Murcia, por ser mi nuevo hogar. Especialmente a Luís, Manolo, Vicente, Antonela, María y Virginia por ser mi nueva familia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades autoinmunitarias.....	3
1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	3
1.1.2. Tiroiditis autoinmunitaria o de Hashimoto.....	10
1.1.3. Enfermedad celiaca.....	12
1.1.4. Trombocitopenia inmune primaria.....	16
1.2. Enfermedades alérgicas.....	18
1.2.1. Asma.....	21
1.3. Síndrome IPEX.....	25
1.4. Gen <i>FOXP3</i>	27
1.4.1. Reseña histórica.....	27
1.4.2. Estructura de <i>FOXP3</i>	28
1.4.3. Expresión de <i>FOXP3</i>	31
1.5. Proteína FOXP3.....	31
1.5.1. Función de FOXP3.....	33
1.6. <i>FOXP3</i> y células t reguladoras.....	34
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.....	44
4.1. Diseño del estudio.....	45
4.2. Población de estudio.....	45
4.2.1. Pacientes.....	45
4.2.2. Controles.....	48
4.3. Protocolo y variables de estudio.....	48

4.4. Análisis molecular.....	52
4.4.1. Extracción del ADN.....	52
4.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	53
4.4.3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.....	56
4.4.4. Purificación de los fragmentos de ADN amplificados.....	57
4.4.5. Secuenciación automática del ADN.....	58
4.4.6. Control de calidad del laboratorio.....	59
4.5. Análisis de los datos.....	59
4.5.1. Análisis descriptivo.....	59
4.5.2. Análisis bivariante.....	60
4.5.3. Análisis multivariante de correspondencias.....	60
4.5.4. Control de calidad del análisis estadístico.....	61
4.6. Análisis bioinformático.....	62
4.6.1. Estudio de la secuencia nucleotídica de referencia de <i>FOXP3</i>	62
4.6.2. Diseño de oligonucleótidos.....	64
4.6.3. Análisis de las secuencias.....	67
4.6.4. Búsqueda de los polimorfismos.....	69
4.6.5. Análisis de las frecuencias alélicas.....	70
4.6.6. Predicción proteica.....	72
5. RESULTADOS.....	74
5.1. Estudio descriptivo.....	75
5.1.1. Pacientes con enfermedad autoinmune.....	76
5.1.2. Pacientes con atopia.....	78
5.1.3. Pacientes con atopia y autoinmunidad.....	82
5.1.4. IPEX- like.....	85
5.2. Análisis bivariante.....	88
5.2.1. Grupo global.....	88

5.2.2. Pacientes con enfermedad autoinmune.....	93
5.2.3. Pacientes con atopia.....	94
5.2.4. Pacientes con enfermedad autoinmune y atopia.....	95
5.2.5. Análisis multivariante de correspondencias (HOMALS).....	95
5.3. Estudio de asociación genética.....	107
5.3.1. Características de los polimorfismos.....	108
5.3.2. Frecuencias alélicas y genotípicas.....	109
5.3.3. Frecuencias haplotípicas.....	114
5.3.4. Comparación con las frecuencias alélicas descritas en otras poblaciones.....	116
5.3.5. Predicción proteica.....	117
6. DISCUSIÓN.....	119
6.1. Descripción general y variables ambientales.....	120
6.1.1. Análisis multivariante de correspondencias (HOMALS).....	124
6.2. Estudio genético.....	124
6.3. Limitaciones del estudio.....	135
7. CONCLUSIONES.....	137
8. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA.....	140

TABLA DE ABREVIATURAS

A: adenina
ACM: análisis de correspondencias múltiple
AcTPO: anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea
ADA: asociación americana de diabetes
ADN: ácido desorribonucleico
AINE: antiinflamatorio no esteroideo
API: activador proteico 1
ATG: globulina anti-linfocito T
ATS: sociedad torácica americana
C: citosina
CDS: región codificante
Cél: célula
Cols: colaboradores
CPA: célula presentadora de antígeno
CTLA4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
DM: diabetes mellitus
DNA: ácido desorribonucleico
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: test inmunosorbente ligado a enzima
ESPGHAN: sociedad europea de gastroenterología pediátrica, hepatología y nutrición
F: *forward*
FAST: test alergosorbente de fluorescencia
FEV₁: volumen espirado forzado en el primer segundo
FPRP: probabilidad de emitir un resultado positivo falso
FVC: capacidad vital forzada
FKH: *forkhead*
FOX: *forkhead box*
FOXP3: *forkhead box P3*
G: guanina
GAD65: anticuerpo anti-deshidrogenasa del ácido glutámico
GITR: receptor de TNF inducido por glucocorticoides
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA: antígeno leucocitario humano
HOMALS: *homogeneity analysis by means of alternate least squares*
IAA: anticuerpo anti-insulina
IC: intervalo de confianza
ICA: anticuerpos anti-células de los islotes
ICA512/IA-2: anticuerpo anti-homólogo de la tirosina fosfatasa
IDDM: diabetes mellitus dependiente de insulina
IDO: indoleamine-2,3-dioxigenasa
IFN: interferón
IgE: inmunoglobulina E
IgG: inmunoglobulina G
IL: interleucina
IL2RA: cadena alfa del receptor de IL-2
IPEX: inmunodisregulación poliendocrinopatía enteropatía ligada al X
ISAAC: estudio internacional de asma y alergia en la infancia

Log₁₀ IgE: logaritmo en base 10 de la IgE total
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
MGPs: partículas magnéticas de cristal
mRNA: RNA mensajero
mTOR: diana de la Rapamicina en mamíferos
NCBI: centro nacional para la información biotecnológica
NFAT: factor nuclear de las células T activadas
NHIS: encuesta de salud nacional
NK: célula *Natural Killer*
OMIM: herencia mendeliana online en humanos
OMS: organización mundial de la salud
OR: *odds ratio*
PAF: factor activador plaquetario
PC: pruebas cutáneas
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: poder estadístico
PGE2: prostaglandina E2
PTI: trombocitopenia inmune primaria
PTPN22: proteína tirosina fosfatasa, no-receptor tipo 22
R: *reverse*
RAST: test radioalergosorbente
RNA: ácido ribonucleico
SNP: polimorfismo de un único nucleótido
T: timina
TCR: receptor de célula T
TGF: factor de crecimiento de transformación
TGF-βR: receptor del factor de crecimiento de transformación β
Th1: linfocito T cooperador del tipo 1
Th2: linfocito T cooperador del tipo 2
Tm: temperatura de anillamiento
TNF: factor de necrosis tumoral
Treg: célula T reguladora
TSH: hormona estimulante del tiroides
TSH-R: receptor de hormona estimulante del tiroides
tTG: anticuerpo antitransglutaminasa tisular
T4: tiroxina
VNTR: número variable de repeticiones en tándem
XLAAD: disregulación autoinmunitaria alérgica ligada al X
χ²: chi cuadrado
ZnT8: anticuerpo anti-transportador de zinc 8

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 1.....	8
2. Etiopatogenia de la enfermedad celiaca.....	15
3. Participación de las citocinas Th2 en la cascada de la alergia.....	20
4. Localización cromosómica Xp11.2 del gen <i>FOXP3</i>	29
5. Fragmento cromosómico donde se localiza <i>FOXP3</i>	29
6. Representación gráfica del Gen <i>FOXP3</i>	29
7. Estructura de la proteína FOXP3.....	32
8. Expresión de <i>FOXP3</i> en las células T reguladoras.....	33
9. Regulación de la proliferación de las Treg en función del ambiente o del metabolismo.....	37
10. Regulación de la transcripción en células T convencionales y en T reguladoras....	38
11. Regulación de la función de las células T reguladoras.....	39
12. Imagen del sistema MagNA Pure Compact System (Roche).....	53
13. Regiones del gen <i>FOXP3</i> amplificadas. Se señalan los exones (en rojo), los oligonucleótidos (en morado), la región UTR (en verde) y el polimorfismo rs6609859 (en azul).....	54
14. Ejemplo de gel de agarosa en el que se visualiza en el primer carril el marcador de peso molecular, seguido de cuatro muestras de ADN amplificado (M1 y M2: fragmentos de 608 pb correspondientes a la región de los exones 6 y 7; M3 y M4: fragmentos de 992 pb correspondientes a la región UTR). En el último carril se colocó el control negativo correspondiente a una amplificación en la que no se incluyó ADN molde (C-).....	57
15. Representación esquemática de la purificación de los fragmentos de ADN con ExoSap.....	58
16. Visión parcial de la pantalla que muestra los resultados de la búsqueda del gen <i>FOXP3</i> en la página web del OMIM. Muestra la localización cromosómica, el fenotipo y parte de la descripción del gen. Se subraya en rojo el enlace para obtener la secuencia del gen.....	62

17. A la izquierda, visión parcial de la pantalla que muestra los enlaces para obtener la secuencia de cada exón, de la región codificante (CDS), etc. del gen <i>FOXP3</i> . En el panel de la derecha se muestra la secuencia nucleotídica (obtenida del enlace señalado en rojo) y se marca (en marrón) el primer exón codificante.....	63
18. Pantalla general del VectorNTI. En ésta se visualiza la representación del gen (arriba), así como la secuencia del mismo (abajo). Permite el diseño de oligonucleótidos para la región del DNA seleccionada.....	64
19. Visión de la ventana que permite la selección de las características de los oligonucleótidos.....	65
20. Visión parcial de la pantalla del Beacon Designer que ofrece las características físico-químicas de los oligonucleótidos analizados. En la parte inferior de la imagen se representa gráficamente uno de los dímeros que se formarían con estos oligonucleótidos.....	66
21. Visión parcial de la pantalla del Netprimer que ofrece las características físico-químicas de los oligonucleótidos analizados. En la parte inferior de la imagen se representa gráficamente uno de los dímeros que se formarían con estos oligonucleótidos.....	67
22. Ejemplo de análisis de Secuenciación con el programa Chromas 2.3, en el que se observa un cromatograma con un polimorfismo en heterocigosis en la posición 533 (señalado con una flecha roja).....	68
23. Visión de un alineamiento de varias secuencias de pacientes con la secuencia genómica (última secuencia). Se observa un polimorfismo en posición 8478 en homocigosis (T) o heterocigosis (Y) en algunos pacientes (C en secuencia de referencia).....	69
24. Visión parcial del resultado de la búsqueda en el NCBI de los polimorfismos del gen <i>FOXP3</i> en humanos.....	70
25. 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 la que se introducen los resultados de la secuenciación de los grupos de controles y pacientes (<i>case</i>).....	71
26. Visión parcial de la pantalla del ExPASy que muestra los péptidos/proteínas que se obtendrían (en rosa) según los posibles marcos de lectura en sentido 5'-3'. La primera secuencia de aminoácidos correspondería a la proteína codificada por la secuencia de referencia de <i>FOXP3</i>	72
27. Visión parcial de la pantalla del ExPASy que muestra la secuencia proteica, señalando la que forma el dominio de Forkhead (arriba), y la representación gráfica de este motivo funcional (abajo).....	73
28. Distribución de los pacientes en el estudio.....	75

29. Distribución de los pacientes con enfermedad autoinmune.....	76
30. Antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes en los pacientes con enfermedad autoinmune.....	77
31. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con patología	77
32. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con patología autoinmune.....	78
33. Sensibilización en los pacientes con atopía.....	79
34. Clínica alérgica de los pacientes con atopía.....	79
35. Antecedentes familiares de atopía en pacientes con atopía (expresado en porcentajes).....	80
36. Antecedentes familiares de asma en pacientes con atopía (expresado en porcentajes).....	80
37. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con atopía.....	81
38. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con atopía..	82
39. Distribución de los pacientes con enfermedad autoinmune y atopía.....	82
40. Sensibilización en los pacientes con atopía y autoinmunidad.....	83
41. Clínica alérgica de los pacientes con atopía y autoinmunidad.....	83
42. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con atopía y autoinmunidad.....	84
43. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con atopía y autoinmunidad.....	85
44. Tipo de lactancia (en porcentajes) según la edad gestacional en el grupo global de pacientes.....	89
45. Tipo de lactancia (en porcentajes) según la presencia de distrés respiratorio en el grupo global de pacientes.....	89
46. Distribución por sexo (en porcentajes) en los grupos de pacientes.....	90
47. Distribución por edad (en porcentajes) de los grupos de pacientes.....	91
48. Comparación de la media de los logaritmos de la IgE entre el grupo control y los grupos con atopía.....	91
49. Distribución de la edad gestacional (en porcentajes) en los grupos de pacientes.....	92

50. Asistencia a guardería (en porcentajes) en relación con la edad gestacional en pacientes con enfermedad autoinmune.....	94
51. Representación gráfica de las medidas de discriminación en el plano 1-2.....	100
52. Representación gráfica de las medidas de discriminación en el plano 2-3.....	101
53. Plano factorial 1-2 en el que los pacientes aparecen señalados en relación a la variable “asma”.....	101
54. Plano factorial 1-2 en el que los pacientes aparecen identificados según presenten atopía, autoinmunidad o ambas.....	102
55. Plano factorial 1-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presenten atopía, autoinmunidad o ambas.....	102
56. Plano factorial 2-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presenten atopía, autoinmunidad o ambas.....	103
57. Plano factorial 2-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presenten distintas patologías.....	104
58. Representación de los pacientes en el tercer plano factorial obtenido, identificados por un color relativo al grupo de conglomerado determinado por el procedimiento K medias realizado.....	105
59. Representación de los pacientes en el tercer plano factorial, con las posibles interpretaciones de las agrupaciones encontradas.....	106
60. Características clínicas de los individuos con mutación (expresado en porcentajes) y la relación alélica del SNP.....	107
61. Predicción proteica para el haplotipo H0. Se señala los aminoácidos que corresponden a las posiciones de los polimorfismos en región exónica (se marca el SNP3 en amarillo, el SNP8 en verde y el SNP9 en azul).....	117
62. Sitios funcionales de la proteína FOXP3: motivos Forkhead (A), motivos en dedo de zinc (B) y motivos de fosforilación, glicosilación y miristilación (C).....	118

ÍNDICE D TABLAS

1. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus.....	9
2. Variantes génicas en regiones codificantes del gen <i>FOXP3</i>	30
3. Batería de aeroalérgenos empleados.....	47
4. Autoanticuerpos de las enfermedades autoinmunes incluidas en el estudio.....	51
5. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y características de los fragmentos amplificados.....	55
6. Temperatura de anillamiento fijada para cada fragmento amplificado.....	56
7. Características demográficas de los pacientes con enfermedad autoinmune.....	76
8. Variables activas en el ACM.....	96
9. Varianza explicada por cada dimensión y la total del modelo.....	98
10. Medidas de discriminación. Se han significado las mayores contribuciones de las variables a cada dimensión, y se han atenuado los valores menores de 0,2 (poco importantes).....	99
11. Número de casos en cada conglomerado.....	104
12. Características de los polimorfismos del gen <i>FOXP3</i> encontrados.....	108
13. Frecuencias alélicas de los polimorfismos descritos anteriormente del gen <i>FOXP3</i> en los varones (al ser hemigóticos para los genes del cromosoma X las frecuencias genotípicas serían las mismas).....	110
14. Frecuencias alélicas de los polimorfismos no descritos anteriormente del gen <i>FOXP3</i> en los varones (al ser hemigóticos para los genes del cromosoma X las frecuencias genotípicas serían las mismas).....	111
15. Frecuencias genotípicas y alélicas en los polimorfismos descritos anteriormente del gen <i>FOXP3</i> en las mujeres.....	112
16. Frecuencias genotípicas y alélicas en los polimorfismos no descritos anteriormente del gen <i>FOXP3</i> en las mujeres.....	113
17. Frecuencias haplotípicas en los varones. Se expresa la frecuencia (en %) de cada haplotipo en los distintos grupos, así como la p de Fisher para las distribuciones de cada haplotipo frente al resto y finalmente el p valor de la distribución haplotípica general. Los haplotipos con frecuencia inferior al 1% no se han incluido.....	114

18. Frecuencias haplotípicas en las mujeres. Se expresa la frecuencia (en %) de cada haplotipo en los distintos grupos, así como la p de Fisher para las distribuciones de cada haplotipo frente al resto y finalmente el p valor de la distribución haplotípica general. Los haplotipos con frecuencia inferior al 1% no se han incluido.....	115
19. Frecuencia alélica reportada para los polimorfismos encontrados descritos anteriormente. Se describe también la observada en los controles de nuestra población.....	116
20. Cambio de codón, aminoácido codificado y motivo en el que se localiza el polimorfismo.....	118

1. iNTRoDvCCIóN

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas son definidas por la Organización Mundial de la Salud como enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta. Teóricamente no existe curación y, si existe, no se puede prever cuándo sería. Según la encuesta “National Health Interview Survey NHIS” realizada en Estados Unidos en el 2004, el 7% de los menores de 18 años padece una enfermedad crónica. La patogenia de estas enfermedades es muy variable, pero existe un grupo en el que subyace un sustrato inmunológico, entre las que destacan las enfermedades alérgicas y las enfermedades autoinmunitarias.

Las enfermedades alérgicas se caracterizan por una respuesta inmunológica anormal, expresada como una proliferación rápida de los linfocitos T cooperadores del tipo 2 (Th2) tras la exposición a un antígeno (alérgeno). Se consideran enfermedades complejas en las que están implicados tanto factores genéticos como ambientales. Existen distintas formas de expresión clínica, entre las que destacan, por su elevada frecuencia, la rinoconjuntivitis, la dermatitis atópica y el asma.

Las enfermedades autoinmunitarias están causadas por una respuesta inmunológica de predominio Th1 frente a antígenos propios del organismo que son reconocidos como extraños. Es un proceso resultante de la interacción de factores genéticos y ambientales, en la mayoría de los casos no bien conocidos. Dentro de este tipo de enfermedades destacan por su frecuencia la diabetes mellitus tipo 1, la patología tiroidea autoinmune y la celiaquía.

Estas enfermedades crónicas tienen un gran impacto en el Sistema de Salud. Pero más importante aún es que causan un elevado grado de dependencia, así como, una morbilidad

(incluyendo trastornos del desarrollo, del aprendizaje o del comportamiento) y una mortalidad prematura nada despreciables (1). Aún en aquellos pacientes con mejor control de su patología o con una enfermedad de evolución más “benigna”, como la celiacía, puede existir un deterioro de la calidad de vida y una alteración de su entorno familiar y social.

1.1. ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

1.1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por una destrucción de las células β del páncreas, secundaria a una reacción autoinmunitaria. Es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en la infancia. Aunque puede aparecer a cualquier edad, incluso en adultos, existe un primer pico de incidencia a los 3-6 años y otro durante la adolescencia. Esto determina que varíe la prevalencia en función de la edad, siendo de 1 por cada 1500 niños a los 5 años, y de 1 por cada 400 adolescentes. Si se analiza la incidencia mundial de la enfermedad hay que tener en cuenta la población estudiada, pues difiere ampliamente, desde 50 casos/100000 por año en Finlandia, a 0,1/100000 en Venezuela, Perú y algunas regiones de China. En España se describe una incidencia alta, en torno a 15-20 casos/100000, similar en ambos sexos (2-5). No obstante, la incidencia está aumentando en determinadas regiones. Se cifra este incremento en un 3-4% anual en Europa (6). Además, la edad de presentación es cada vez más temprana, con una tasa de aumento de 6,35% en los primeros 4 años de vida, observándose cada vez más casos en los 2 primeros años (2-5).

La diabetes mellitus tipo 1 es un trastorno heterogéneo, con una patogenia no bien conocida, en el que, según la hipótesis de Eisenbarth, existe una predisposición genética sobre la que influyen distintos factores ambientales desencadenantes, que acaban produciendo una reacción autoinmune que conlleva la destrucción celular (7).

Esta predisposición genética es fundamental en el desarrollo de la diabetes tipo 1 como han mostrado los estudios de agrupación familiar, en los que la tasa de concordancia en gemelos idénticos es superior al 40%, y en el caso de gemelos dicigóticos o hermanos no gemelares, el riesgo global es del 6%. El riesgo para la descendencia de un padre o madre diabéticos es del 2-5%, aunque resulta superior, aproximadamente el doble, si el afectado es el padre. Cuando ambos progenitores padecen la enfermedad, el riesgo asciende al 30%. Además se ha observado que hasta el 15% de los pacientes tienen un familiar de primer grado afectado.

No se trata de una enfermedad con una herencia mendeliana clásica, sino de carácter poligénico, en la que existen genes que proporcionan susceptibilidad y otros que confieren protección. Los genes más importantes pertenecen a la región HLA (antígeno leucocitario humano) de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizados en el cromosoma 6p21. Esta región también se denomina IDDM1 (*insulin-dependent diabetes mellitus 1*) y es la responsable del 60% de la susceptibilidad genética, aunque su contribución específica a la patogénesis sigue sin conocerse. La predisposición para la diabetes tipo 1 se asocia principalmente a las distintas variantes en los genes DR y DQ. Más del 90% de la población diabética presentan los alelos DR3 o DR4, frente al 40% de la población general. En individuos caucásicos, el mayor riesgo lo presentan los sujetos heterocigotos DR3/DR4, seguidos por los individuos homocigotos para cualquiera de ellos. Así, el genotipo que confiere un riesgo mayor es DR3/DR4 (DQB1*0201/DQB1*0302), presente en el 30-50% de los niños

que desarrollan la enfermedad frente al 2% de la población general. Además existe una región de susceptibilidad en el gen DQB1, que confiere un riesgo de hasta 100 veces superior de desarrollar la enfermedad, en el caso de que la secuencia codificante del aminoácido aspartato en la posición 57 esté alterada en ambos alelos y codifique otro aminoácido (2-5, 8-13).

Se cree que deben existir otros loci implicados, ya que menos del 1% de la población con genotipos HLA de predisposición desarrolla la enfermedad, y los hermanos de pacientes con diabetes que no comparten ningún haplotipo HLA tienen un riesgo seis veces superior de desarrollar diabetes. Se han identificado al menos veinte loci no HLA que confieren susceptibilidad, de los que destacan dos. El locus *IDDM2* (*insulin-dependent diabetes mellitus 2*) es el más importante después de los genes HLA. Se localiza en la región del cromosoma 11p5.5 con un número variable de repeticiones minisatélites en tándem (VNTR), con alelos cortos que predisponen a la enfermedad y alelos largos que confieren protección. El segundo gen en importancia es el *IDDM12* (*insulin-dependent diabetes mellitus 12*), localizado en la posición 2q33 junto a dos marcadores de células T implicados en la activación celular, *CTLA4*, que codifica la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos y el *CD28* (2-5). Otros loci relacionados son el *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 22*), que codifica una tirosina fosfatasa de los linfocitos e inhibe el receptor de las células T; el gen *IL2RA* (que codifica la cadena alfa del receptor de IL-2) y el gen codificante del receptor de la vitamina D, entre otros (2-5, 14-18).

Aunque existe esta predisposición genética, está claro que no es el único factor que influye, pues se ha observado, por ejemplo, que el riesgo varía en función de la edad de presentación de la enfermedad en el primer gemelo; de forma que, si la diabetes se presenta antes de los 5 años, el riesgo para el segundo gemelo supera el 50%, mientras que, si lo hace después de los 25

años, el riesgo desciende a menos del 10%. Otro dato indicativo del origen multifactorial de esta patología es que en los sujetos afroamericanos, en los que los genes asociados a la diabetes mellitus son los mismos que para los de raza blanca, éstos confieren la mitad o dos tercios menos de riesgo. Además se ha observado que en poblaciones emigrantes la tasa de incidencia se asemeja progresivamente a la población autóctona. Se ha postulado que podrían estar influyendo factores ambientales, como agentes infecciosos, y/o factores dietéticos.

A favor de que las infecciones tengan relevancia en la patogenia de la diabetes mellitus tipo 1 se encuentra la asociación con la rubéola congénita, que confiere un riesgo de hasta un 10-20%. Sin embargo, no se ha podido demostrar una relación con la infección postnatal ni con su vacunación (2-5); así como, tampoco la asociación con otras infecciones, como por el virus Coxsackie B (15, 16, 19), u otras inmunizaciones. Las hipótesis que se postulan sobre el mecanismo de acción de la infección por rubéola para desarrollar la enfermedad son, o bien que el virus destruya directamente las células β pancreáticas, o bien, que induzca una respuesta inmune contra ciertos componentes estructurales de las células por similitud con los antígenos víricos (2-5).

Otro de los factores que se plantea como posible responsable de esta patología es la dieta. En aquellos lactantes alimentados con fórmulas artificiales se ha relacionado la exposición temprana a la leche de vaca con la diabetes tipo 1, posiblemente por un mecanismo de mimetismo entre un péptido de la albúmina plasmática bovina de 17 aminoácidos y el antígeno 69 del islote pancreático (2-5). También se ha asociado con la introducción del gluten antes de los 3 meses o después de los 7 meses (2, 16); así como, con los residuos N-nitrosos derivados de ciertos vegetales o de la carne. En cambio, se ha observado un papel protector al ingerir suplementos de ácidos grasos omega-3 durante el embarazo. Sin embargo, los datos obtenidos

son en algunos casos contradictorios, por lo que no se ha modificado la alimentación en la infancia con el fin de disminuir la incidencia (2-5). Asimismo, se ha descrito una posible asociación con el déficit de vitamina D (15, 18).

Sean unos u otros los factores implicados, en un individuo genéticamente predispuesto se produce una lesión autoinmunitaria contra el páncreas que se inicia por la producción de IFN- α por las células β y la expresión en éstas de MHCI. Esto conlleva un ataque de estas células por células T CD8 autorreactivas con especificidad contra antígenos en el páncreas. Los antígenos de células β liberados son recogidos por células dendríticas que actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) y transferidos a nódulos linfáticos de drenaje. La presentación de los antígenos, con la ayuda de células T CD4, produce la conversión de células B en células plasmáticas, que sintetizan autoanticuerpos contra los islotes. Además, las células T CD8 autorreactivas son estimuladas para proliferar, migrar al páncreas y producir perforinas, IFN- γ y TNF- α , que destruyen las células β . También contribuyen a esta destrucción los macrófagos, mediante la síntesis de TNF, IL-1 β y óxido nítrico; y las células *Natural Killer* (NK), con la liberación de perforinas, IFN- γ y granzimas. Este daño celular puede ser frenado por las células T reguladoras, con la liberación deIDO (Indoleamine-2,3-dioxigenasa), IL-10 y TGF- β , que inhiben la función de las CPA. No obstante, el ambiente proinflamatorio generado por el desencadenante ambiental no favorece la función de las células T reguladoras. La destrucción de las células de los islotes pancreáticos conlleva el cese de la producción de insulina y una nueva liberación de antígenos, con inicio del ciclo de destrucción celular (figura 1) (16, 20).

Además de esta reacción inmune celular se produce una respuesta humoral al activarse células plasmáticas, que sintetizan inmunoglobulinas específicas contra antígenos de los islotes, denominados autoanticuerpos ICA (**I**slet **C**ell **A**ntibodies). Éstos no intervienen en la

destrucción de las células del páncreas, pero sí, son marcadores de la lesión que se está produciendo. Son inmunoglobulinas IgG que actúan contra alguna molécula detectada como antígeno del islote celular, como la insulina (IAA), la deshidrogenasa del ácido glutámico (GAD65), el homólogo de la tirosina fosfatasa (ICA512/IA-2) y el transportador de Zinc 8 (ZnT8).

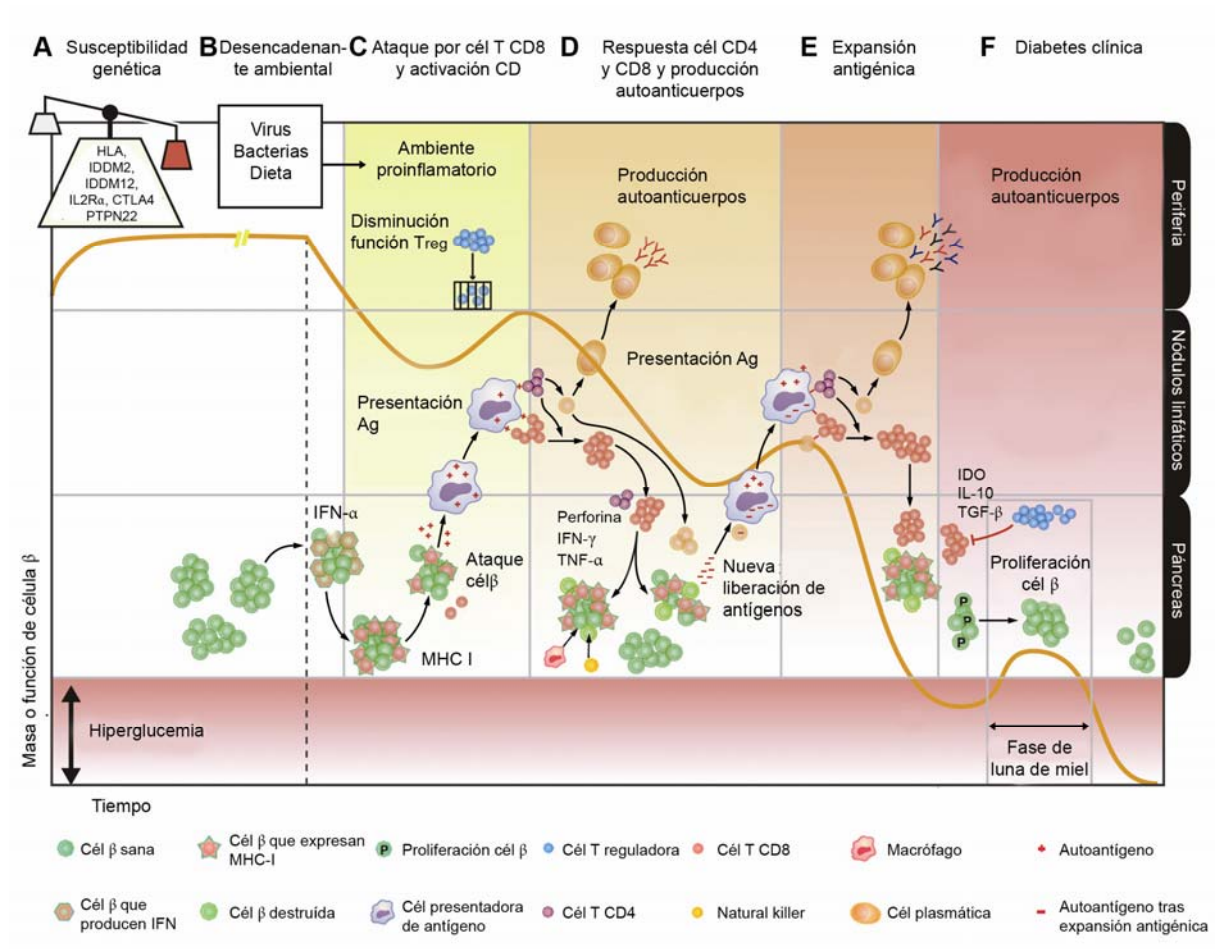


Figura 1. Etiopatogénesis de la diabetes mellitus tipo 1. Versión modificada de (16).

Para establecer el diagnóstico de diabetes se ha de cumplir al menos uno de los criterios establecidos por la OMS y la ADA (American Diabetes Association) (tabla 1).

La clínica no aparece hasta que la lesión está muy avanzada y se ha producido la destrucción del 80-90% de la masa celular de los islotes pancreáticos. La sintomatología que manifiestan los pacientes es derivada de la hiperglucemia consecuencia de la no secreción de insulina por el páncreas. Estos síntomas son poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Si no se detecta la enfermedad en esta fase, pueden acabar debutando con una cetoacidosis.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de diabetes mellitus.

- Glucemia plasmática al azar ≥ 200 mg/dL + síntomas
- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL
- Glucemia plasmática a las 2 horas de una prueba de tolerancia a la glucosa ≥ 200 mg/dL

Estos pacientes pueden tener complicaciones agudas o crónicas propias de la enfermedad. Dentro de las primeras, con frecuencia se encuentran la hipoglucemia y la hiperglucemia. Sin embargo, las complicaciones crónicas son raras, sobre todo en la infancia, si el control de la enfermedad es adecuado. Entre ellas, las más importantes son las derivadas de la afectación microvascular, como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía diabética.

El tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 se basa en tres pilares básicos: alimentación, ejercicio e insulino terapia. Estos pacientes deben someterse a varios controles glucémicos diarios, en función de los cuales adaptarán su ingesta y el ejercicio que tienen que realizar, así como la insulina que han de administrarse. Todo esto conlleva una importante alteración del estilo de vida del paciente (3-5, 21).

Las nuevas terapias en fase de investigación (fases I-III) siguen la línea de inducir la inmunotolerancia, ya sea con fármacos inmunosupresores como globulina anti-linfocito T

(ATG), anti-CD3 y anti-CD20, entre otros; con tratamientos antiinflamatorios, como Anakinra (antagonista de IL-1) o Etanercept (antagonista de TNF- α); con estrategias específicas contra los antígenos de las células β o mediante terapia celular (20, 22, 23). Dentro de este último tipo, se está estudiando la posibilidad de suprimir la expresión de moléculas coestimuladoras en las células dendríticas para producir la anergia de las células T y la expansión de las células T reguladoras (24). También se está investigando sobre la generación in vitro de células T reguladoras y su transferencia posterior al organismo (25, 26).

1.1.2. TIROIDITIS AUTOINMUNITARIA O DE HASHIMOTO

La tiroiditis autoinmunitaria, también llamada tiroiditis de Hashimoto o tiroiditis linfocitaria crónica, es la causa más frecuente de enfermedad tiroidea en niños y adolescentes, con una prevalencia de 1,3% de los niños en edad escolar, y es la forma más frecuente de hipotiroidismo adquirido. Es de 4 a 7 veces más frecuente en el sexo femenino, y aunque se puede presentar durante los primeros años de vida, lo habitual es después de los 6 años de edad, con una incidencia máxima durante la adolescencia. En el 25% de los casos existen antecedentes familiares.

En su patogenia, al igual que en la diabetes mellitus, están involucrados factores ambientales, genéticos y autoinmunes. Entre los factores ambientales se han visto implicados fármacos, como la Amiodarona y las sales de litio, la ingesta de yodo y selenio y las infecciones como la rubéola congénita. Los genes involucrados parecen ser, nuevamente, los del HLA de clase II, concretamente el HLADR3 y DR5, aunque su asociación es más débil que en la patología anterior. También parece estar relacionado con *CTLA4*. Los autoanticuerpos implicados son los

antiperoxidasa tiroidea (AcTPO), anteriormente llamados antimicrosomales, que están presentes en el 90% de los pacientes, y producen la inhibición enzimática, impidiendo la organificación tiroidea del yoduro, además de estimular la citotoxicidad de las células NK. También se sintetizan, aunque en menor frecuencia, anticuerpos antitiroglobulina (AcTG) y anticuerpos bloqueantes del receptor de tirotropina (AcTRB). Estos últimos contribuyen al desarrollo de hipotiroidismo.

El inicio del proceso autoinmune parece ponerse en marcha, por un lado, por activación de las células T mediante la liberación de citocinas, como $\text{INF-}\alpha$, IL-2, $\text{TGF-}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$, induciendo la expresión de antígenos HLA de clase II en las células foliculares tiroideas, y, por otro lado, por una respuesta humoral mediada por linfocitos B, con la producción de anticuerpos antiperoxidasa, antitiroglobulina y antirreceptor TSH. Las subpoblaciones linfocitarias que infiltran el tiroides durante el proceso inflamatorio son en un 60% células T, tanto células colaboradoras (CD4+) como citotóxicas (CD8+), y aproximadamente el 30% expresan marcadores de células B.

La mayoría de pacientes son eutiroideos, pero pueden acabar desarrollando un hipotiroidismo. Otros presentan hipotiroidismo desde el inicio, pero hasta un 50% de estos pueden volverse eutiroideos. Es raro que desarrollen un hipertiroidismo. Independientemente del estado hormonal que presenten, es muy frecuente que presenten bocio, lo que ocurre hasta en el 85% de los casos, y retraso de crecimiento, raramente, anemia o hipercolesterolemia.

El diagnóstico en estos pacientes se basa en datos clínicos, analíticos y de imagen. En la analítica sanguínea se detectará una cifra de TSH elevada, con una cifra de T4 libre normal (en eutiroideos), baja (en hipotiroideos) o elevada (en hipertiroideos) y anticuerpos antitiroideos

positivos. La ecografía cervical para valorar la existencia de un aumento del tamaño del tiroides, muestra además zonas de diferente ecogenicidad.

Sólo los pacientes hipotiroideos precisarán tratamiento hormonal sustitutivo con levo-tiroxina. No obstante, tanto éstos como el resto de pacientes han de seguir revisiones periódicas para valorar los cambios clínicos y analíticos que puedan presentar, la necesidad de iniciar o modificar la terapia hormonal, y sobre todo, para el diagnóstico precoz de cáncer de tiroides que pueden presentar aquellos pacientes con nódulos prominentes que persisten en la ecografía tras tratamiento (27-30).

1.1.3. ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celiaca o celiacía, también denominada enteropatía sensible al gluten o esprúe celíaco, es una enfermedad crónica caracterizada por la intolerancia permanente al gluten. Ocasiona una lesión en la mucosa del intestino delgado proximal, produciendo clínica de malabsorción.

Esta enfermedad presenta una expresión clínica muy variable, pudiéndose diagnosticar a cualquier edad, aunque el promedio se encuentra por debajo de los 24 meses. Se estima una prevalencia mundial en población infantil de 1:266 individuos, siendo más frecuente en raza blanca. En España se ha encontrado una prevalencia de 1:400 individuos.

Está producida por la interacción de factores ambientales y genéticos. El factor ambiental más importante es el gluten, un compuesto proteico contenido en el trigo, el centeno y la cebada, formado por cuatro tipos de proteínas, las albúminas, las globulinas, las gluteninas y las

prolaminas. Esta última fracción recibe diferentes denominaciones en función del cereal que la contiene; llamándose gliadina en el trigo, secalina en el centeno y hordeína en la cebada. A su vez, las prolaminas se subdividen en cuatro grupos: alfa, beta, gamma y omega. Se han encontrado unos 10 epítomos antigénicos en gliadinas alfa y gamma, así como en gluteninas (31-34). Uno de estos epítomos denominado 33-mero, fue descrito en el 2002 por Shan y cols. Es un péptido de 33 aminoácidos que forma parte de la fracción alfa-2-gliadina y que no puede ser digerido por las enzimas digestivas, por lo que se cree que puede ser el iniciador de la respuesta inflamatoria (35, 36). El interés en conocer cuál es la región más antigénica de esta proteína radica en el hecho de que la composición de cada cereal, y de las diferentes clases de éste, difiere de uno a otro, siendo posiblemente un tipo más tóxico que otro.

Otros factores ambientales que podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad son la alteración de la microbiota intestinal, como factor de riesgo para desarrollar la enfermedad (37), y diferentes infecciones virales, como el virus Ebstein-Barr, el citomegalovirus o la rubeola, que parecen tener un papel protector (38).

Se sugiere una predisposición genética como factor importante en la patogenia, pues se ha encontrado una concordancia entre gemelos monocigóticos superior al 75%, y una prevalencia alta (8-18%) entre familiares de primer grado. Al igual que en la diabetes mellitus tipo 1, los genes del HLA son los principales responsables de esta susceptibilidad. Se ha asociado con el heterodímero DQ2 (DQA1*0501 y DQB1*0201), que se ha encontrado en el 90% de la población celíaca europea, y con el haplotipo DR4-DQ8 (DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302), presente en el 10% restante. La ausencia de ambos haplotipos descarta el diagnóstico de enfermedad celíaca. No obstante, se ha observado un 30-50% de hermanos con HLA de predisposición que no presentan la enfermedad, hecho que sugiere la existencia de

otros genes implicados. Se ha relacionado con la región 2q33 en la que se localiza el gen *CTLA4*, la región 19p13 que codifica el gen *MYO9B*, y la región codificadora de factores que intervienen en el control de la respuesta inmunitaria como las citocinas IL-2 e IL-21, entre otros (31-34).

El mecanismo por el cual el gluten acaba produciendo una lesión en el intestino de algunos pacientes no se conoce con exactitud, pero se sabe que éste no se digiere totalmente en la luz intestinal, debido a su alto contenido en prolina, y que activa la sobreexpresión de IL-15 por las células epiteliales. Esta citocina produce la liberación de zonulina, que abre las uniones intercelulares (*tight junctions*). De esta forma, los péptidos residuales de la digestión atraviesan la barrera epitelial hacia la lámina propia, donde la transglutaminasa tisular convierte la glutamina en ácido glutámico, introduciendo así las cargas negativas necesarias para aumentar la afinidad por las moléculas HLA-DQ2 o DQ8 que expresan las CPA. Este tipo celular presenta los residuos a células T CD4, que activarán a las células T citotóxicas, NK y macrófagos, que producirán la destrucción del epitelio; así como a las células B, que sintetizarán anticuerpos anti-gliadina, anti-endomisio y anti-transglutaminasa (figura 2) (35, 39-42).

La lesión intestinal de la enfermedad celiaca se caracteriza por atrofia vellositaria, hiperplasia de las criptas y afectación del epitelio superficial del intestino delgado. La afectación se produce en el intestino delgado proximal, pero se puede extender distalmente a una distancia variable. Esto condiciona la gran variedad de presentaciones clínicas: desde los individuos que no presentan ninguna manifestación, a los que presentan una sintomatología clásica.

Las manifestaciones típicas de una enfermedad avanzada son diarrea crónica (heces blandas, fétidas y voluminosas), distensión abdominal, anorexia, vómitos, irritabilidad, fallo de medro, retraso del crecimiento, palidez e hipotrofia muscular. Pero existe un gran número de personas que presentan formas atípicas u oligosintomáticas, que pueden pasar desapercibidas, donde predominan los síntomas extraintestinales (31-34).

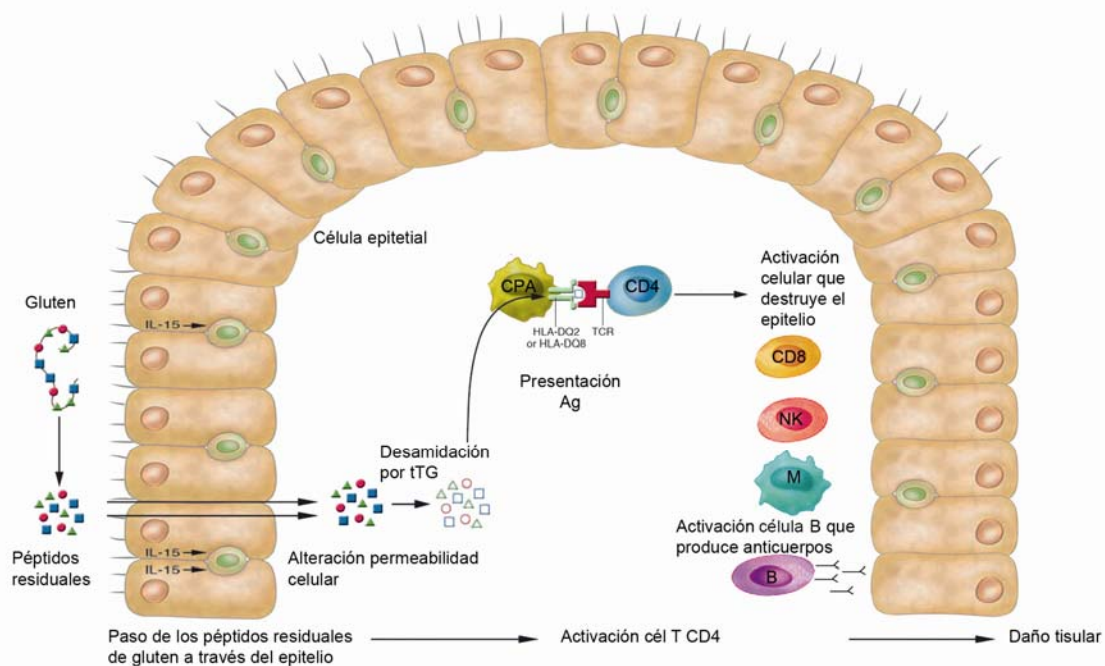


Figura 2. Etiopatogenia de la enfermedad celiaca. Versión modificada de (40).

El diagnóstico se realiza según los criterios de la Sociedad Europea Pediátrica de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición o ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*), actualizados en el 2011. Según éstos, se establece el diagnóstico de enfermedad celiaca, ante toda sospecha clínica, cuando presenta una cifra de IgA antitransglutaminasa 10 veces mayor al valor normal, unos anticuerpos antiendomiso positivos y un HLA DQ8/DQ2. Si alguno de estos criterios no está presente, será

necesario el diagnóstico de confirmación mediante una biopsia intestinal, en la que se objetive los hallazgos anatomopatológicos propios de la enfermedad (43).

El tratamiento es muy sencillo, pues consiste en una dieta exenta de gluten de por vida, aunque no es fácil llevarla a cabo en una sociedad en que muchos de los alimentos básicos de nuestra dieta contienen gluten. El seguimiento del cumplimiento de la dieta se puede realizar con los marcadores serológicos o mediante detección de metabolitos de gliadina en heces (44). Se observará una normalización de la antitransglutaminasa tisular, como del resto de anticuerpos, si el paciente sigue estrictamente la dieta; pero se elevarán si realiza transgresiones. El riesgo de no cumplir la dieta no es sólo el presentar la clínica nuevamente, sino que se ha relacionado con el desarrollo de neoplasias digestivas, en cualquier tramo, no sólo de intestino delgado; así como, con linfomas de células T (31-34).

1.1.4. TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA

La trombocitopenia inmune primaria (PTI), anteriormente denominada púrpura trombocitopénica idiopática, se caracteriza por una disminución de la cifra de plaquetas por debajo de $100000/\mu\text{L}$, en ausencia de una causa desencadenante de este descenso. Es la causa de trombocitopenia más frecuente en la infancia.

Se produce por un desequilibrio de la respuesta inmune, en el que, por mecanismos no bien conocidos, hay una producción de anticuerpos antiplaquetarios. Tras la unión de éstos a la membrana plaquetaria son reconocidos por los receptores de la fracción constante de las

inmunoglobulinas que presentan los macrófagos y se produce la destrucción de las plaquetas, fundamentalmente en el bazo.

La mayoría de pacientes están asintomáticos o tienen petequias, hematomas o equimosis aislados en la piel o mucosas. Sin embargo, algunos pueden sufrir hemorragias más graves a nivel cutáneo, mucoso o gastrointestinal, o incluso intracraneal (0,1-0,5%). En general, suele existir el antecedente de una infección viral ocurrida de una a cuatro semanas antes.

El diagnóstico es de exclusión, para lo que es necesario una historia clínica detallada y una exploración física completa que permitan descartar otras enfermedades hematológicas o situaciones que de forma secundaria puedan producir trombocitopenia. Se realizarán además una serie de pruebas complementarias, como hemograma y recuento de reticulocitos, morfología en sangre periférica, estudio de hemostasia, grupo sanguíneo, Rh y Coombs directo, inmunoglobulinas, estudio serológico de algunas infecciones víricas que pueden producir trombopenia y control de hematuria, entre otras.

El objetivo del tratamiento es prevenir las hemorragias, si bien, el protocolo que se debe seguir es controvertido. Muchos expertos opinan que no se debería tratar a los pacientes sin sangrado, sin embargo, otros sí lo consideran necesario en función de la cifra de plaquetas. En cambio, en el caso de sangrado activo existe un consenso sobre la necesidad de administrar un tratamiento con inmunoglobulina y/o corticoterapia, para producir un rápido ascenso de los recuentos de plaquetas.

La PTI en la infancia suele presentar un buen pronóstico, con una resolución espontánea en dos tercios de los pacientes en los primeros 6 meses. No obstante, en el 10-20% de los casos

persiste la trombopenia después del año del diagnóstico, considerándose entonces como PTI crónica (45-47).

1.2. ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Las enfermedades alérgicas son trastornos producidos por una hiperrespuesta inmunológica, con una proliferación de linfocitos Th2, debida a la exposición de un sujeto sensibilizado a un antígeno específico (alérgeno) por inhalación, ingestión, contacto o inyección. Se manifiestan con sintomatología ocular, cutánea, digestiva, del tracto respiratorio superior y/o inferior. En este grupo de patologías se engloban el asma, la alergia a alimentos, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica, entre otras. Son enfermedades muy frecuentes en pediatría. Se calcula una prevalencia en España del 15-20% para la dermatitis atópica, del 7-15% para el asma y del 15-20% para la rinitis (48).

Presentan una etiología multifactorial, con una base tanto genética como ambiental. Se sospecha una implicación genética debido a la prevalencia elevada dentro de una misma familia, pues el 60% de los niños alérgicos tienen algún antecedente familiar, y en el caso en que ambos progenitores sean alérgicos, el riesgo de tener un hijo con alergia es del 80%. La atopia (del griego *atopos*, que significa “fuera de lugar”) se define como la predisposición a padecer una enfermedad alérgica. Esta predisposición es poligénica y se ha descrito la implicación entre otros, de genes localizados en el cromosoma 6 que codifican el HLA-I y HLA-II, la región q23-35 del cromosoma 5 con genes que codifican citocinas implicadas en las

reacciones alérgicas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y GM-CSF), y la región 11q13 donde se ubican genes del receptor de alta afinidad para la IgE.

La respuesta inmunológica se inicia por la penetración del alérgeno en el organismo y el contacto posterior de éste con una célula presentadora de antígenos (CPA), bien una célula dendrítica o bien una célula de Langerhans. Estas células captan y procesan el antígeno y migran a los ganglios linfáticos donde se localizan los linfocitos T en reposo. Es aquí donde las CPA liberan IL-12, que desencadenará la diferenciación de linfocito T en Th1 o Th2, en función de la subclase de IL-12, CD1 o CD2, respectivamente. Para que se produzca la presentación del antígeno son necesarias las moléculas del MHC, y se ve facilitada por anticuerpos IgE específicos del alérgeno que tienen las CPA en su superficie. Así, se activarán los linfocitos Th2 que sintetizarán distintas interleucinas. La IL-4, IL-9 e IL-13 estimularán los linfocitos B, los cuales producirán IgE específica. La IL-4, IL-5, IL-9 y GM-CSF producirán la activación de los eosinófilos, los cuales liberarán proteínas inflamatorias en el órgano diana (proteína catiónica eosinófila, proteína básica mayor y proteína X). La IL-3, IL-4 e IL-9 estimularán los mastocitos que tienen en su superficie moléculas de IgE específica, y así, en una segunda llegada del alérgeno, se liberarán sus mediadores inflamatorios (histamina y triptasa) (figura 3).

El diagnóstico de una enfermedad alérgica se establece gracias a una anamnesis detallada, que incluye antecedentes familiares y exposiciones ambientales, y una exploración física exhaustiva, en busca de signos de la patología sospechada, así como, de estigmas de atopia, como ojeras del alérgico, pliegues de Dennie-Morgan, saludo alérgico, entre otras. Se realizarán pruebas complementarias para apoyar el diagnóstico y para demostrar la sensibilidad

a los alérgenos implicados. Con esta finalidad se disponen de métodos de laboratorio *in vitro* e *in vivo*, como las pruebas cutáneas y las de provocación.

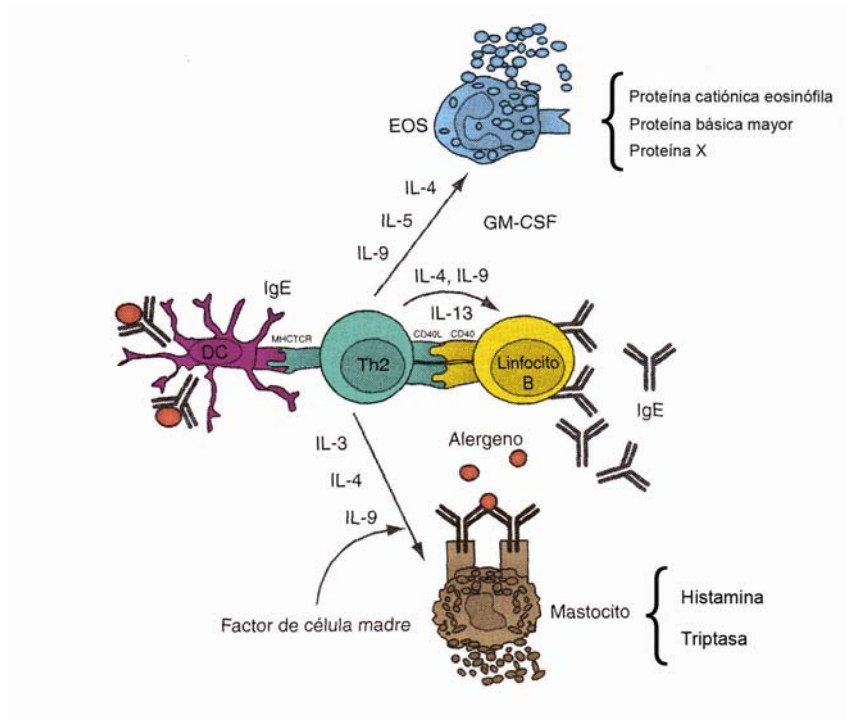


Figura 3. Participación de las citocinas Th2 en la cascada de la alergia. Versión modificada de (49).

Las pruebas cutáneas valoran la reacción de la piel al depositar en ella un extracto del alérgeno mediante punción (prick test), inyección intradérmica (intradermorreacción), o por contacto (pruebas de contacto). Se utiliza la primera para los neumoaérgenos y alimentos, la segunda para las técnicas de inmunidad celular con antígenos bacterianos y fúngicos, y la tercera para metales, colorantes y productos químicos. El prick test es una técnica que consiste en colocar una pequeña gota del alérgeno sobre la piel e introducir una cantidad mínima en la epidermis haciendo una presión ligera a través de la gota con una pequeña aguja. Se realiza en la cara ventral del antebrazo por su comodidad. La lectura de la reacción inmediata se realiza, habitualmente, a los 15-20 minutos, coincidiendo con el punto de máxima reacción de los extractos. En general, se considera una prueba positiva si tiene un diámetro de pápula mayor o

igual a 3 mm respecto el control negativo (que es suero fisiológico). Se hará siempre un control positivo con histamina. Las pruebas de provocación consisten en la exposición del paciente al alérgeno para reproducir la clínica. Existen pruebas de provocación respiratoria nasal o bronquial, cutánea o prueba del parche, mucosa de la conjuntiva ocular y digestiva. Entre las pruebas in vitro se encuentran la determinación de IgE total y específica del alérgeno, la cuantificación de eosinófilos en sangre periférica, determinaciones de mediadores inflamatorios (triptasa, leucotrienos, prostaglandinas, IL-4, proteína catiónica eosinófila, proteína básica mayor y proteína X), y la detección del alérgeno con la determinación de anticuerpos específicos IgE por radioinmunoensayo (RAST, y su variante CAPsystem), enzimoimmunoensayo (ELISA) o fluorimetría (FAST) (49-52).

1.2.1. ASMA

El asma se define como una enfermedad que cursa con inflamación crónica de las vías respiratorias e hiperreactividad bronquial, que provoca episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, asociándose con un menor o mayor grado de obstrucción al flujo aéreo, la mayoría de las veces reversible de forma espontánea o con tratamiento.

Es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia y afecta a todas las etnias. Además, su prevalencia está en aumento, aunque se desconocen las causas. No obstante, esta prevalencia varía enormemente entre unos países y otros, e incluso dentro del mismo país. De forma general, es menor en los países en vías de desarrollo (India, China, etc). En los países occidentales, se cifra entre el 5,4% y el 7,6%. En España, según el estudio ISAAC (Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood), es de entre un 7,1 y un 15,3%,

según la región. De estos pacientes, el 80% presentan síntomas antes de los 5 años. Predomina en los varones en edad escolar (relación 2:1 en nuestro medio), pero esta diferencia desaparece en la adolescencia e, incluso se invierte en la edad adulta.

Se desconoce la causa responsable de esta enfermedad, pero se cree que intervienen factores genéticos y ambientales. Se ha relacionado con factores genéticos al observar que en el 70% de los casos existen antecedentes familiares. Apoya también esta relación el hecho de que en los gemelos monocigóticos, cuando uno de los gemelos padece asma, el otro también desarrolla la enfermedad en el 75% de los casos. En esta predisposición se ha identificado la implicación de varios genes en diversas regiones cromosómicas, entre las que destacan la región 5q31-q33, relacionada con la producción de IL-4 y que influye en la reactividad bronquial, la región 17q21, asociada con el inicio del asma en el niño, la 12q14-q24.23 y la 6p21.1-p23 entre otras.

Entre los factores ambientales asociados, que predisponen o desencadenan una exacerbación, cabe destacar las infecciones víricas del tracto aéreo superior, entre las cuales la más importante es la producida por el virus respiratorio sincitial. Otros factores relacionados son los alérgenos inhalados (ácaros, epitelios de animales, pólenes, hongos, y otros); los irritantes inhalados (humo de tabaco, otros humos y otros contaminantes ambientales); y el estrés emocional. También se han implicado fármacos, como el Paracetamol o algunos antibióticos, si bien la relación de causalidad es incierta. Sí está clara la implicación de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como factor precipitante de una crisis de asma. También se ha relacionado el asma con alérgenos alimentarios, en aquellos pacientes sensibilizados. Clásicamente se ha pensado que la lactancia materna protegía frente a las enfermedades alérgicas, incluyendo asma, pero no se ha confirmado. Igualmente está en entredicho la

influencia de factores endocrinos, como hormonas sexuales, obesidad o hipertiroidismo, o del reflujo gastroesofágico sobre la patogenia del asma.

Las exacerbaciones de la enfermedad se producen cuando los factores exógenos inespecíficos actúan sobre los receptores colinérgicos traqueobronquiales junto a los factores exógenos específicos que se comportan como alérgenos, desencadenando una reacción antígeno-anticuerpo en las vías inferiores del árbol bronquial. Allí dan lugar a la liberación de mediadores bioquímicos, como histamina y triptasa, que provocan en una primera fase el espasmo de la musculatura bronquial, la tumefacción de la mucosa y la hipersecreción de moco, produciendo una obstrucción de la vía aérea. En una segunda fase, intervienen los leucotrienos, procedentes del metabolismo del ácido araquidónico de la membrana del mastocito, que mantienen el broncoespasmo. Estas fases iniciales (primeros 15-30 minutos) se pueden evitar o tratar con un tratamiento con β -agonista inhalado. Finalmente, se produce la infiltración celular, primero eosinofílica y después por neutrófilos y plaquetas. Esta fase tardía (4-12 horas) no se puede resolver con β -agonistas, y hay que emplear fármacos antiinflamatorios, como glucocorticoides.

Como es una enfermedad que cursa por brotes, entre éstos el paciente puede estar asintomático. Durante el brote o crisis asmática, presentará tos, disnea, sibilancias y/u opresión torácica. Su presentación clínica es muy variable, aunque la forma clínica más frecuente es una combinación de estos síntomas y signos, con distinta intensidad. Sin embargo, ninguno de éstos es patognomónico de asma. Existen además formas atípicas de la enfermedad, como la variante tusígena del asma, tos atópica y bronquitis eosinofílica sin asma. La forma más grave de la crisis de asma es el “status asmático”, que se diagnostica por la coincidencia de al menos tres de los siguientes criterios: prolongación de las crisis más de 24 horas, fallo respiratorio con

acidosis, hipercapnia e hipoxia, y resistencia a las medidas terapéuticas. Si no se instaure un tratamiento de manera rápida, el cuadro puede acabar en la muerte del paciente.

La combinación de síntomas y signos junto a la demostración de la obstrucción reversible de las vías respiratorias inferiores y la existencia de la inflamación bronquial será lo que nos llevará al diagnóstico de asma. Se debe realizar un diagnóstico etiopatogénico sobre la existencia de una predisposición alérgica, así como un diagnóstico funcional, fundamentalmente mediante una espirometría forzada.

La frecuencia de aparición de los distintos síntomas y signos, junto a los datos de función pulmonar, son los parámetros utilizados en las actuales guías internacionales para clasificar el asma en niveles de gravedad, y dar pautas de tratamiento. Estas pautas incluyen mediciones objetivas de la función pulmonar, tratamiento farmacológico y control ambiental de alérgenos e irritantes.

El tratamiento farmacológico está compuesto por un tratamiento de rescate, que se emplea en el momento de la exacerbación, y un tratamiento de fondo, que se utiliza de manera prolongada para mantener la enfermedad bajo control. El tratamiento de rescate incluye agonistas de los receptores β -2 de acción corta (principalmente Salbutamol y Terbutalina), al que se puede añadir en caso necesario anticolinérgicos (como el Bromuro de ipratropio), y, si precisa, también se emplean glucocorticoides orales. En el tratamiento de fondo se pueden utilizar glucocorticoides inhalados, agonistas de los receptores β -2 de acción prolongada asociados a los anteriores, antileucotrienos, como Montelukast, cromonas (Nedocromil sódico o Cromoglicato disódico), cada vez menos empleadas en pediatría, y si es preciso, glucocorticoides orales. La única terapia dirigida a la etiología de la enfermedad es la

inmunoterapia, aunque sólo se puede indicar en aquellos pacientes en los que haya una clara relación entre la exposición al alérgeno y la crisis de asma (53-60).

1.3. SÍNDROME IPEX

El síndrome IPEX (*Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), también llamado XLAAD (*X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*) fue descrito en 1982 al observar a 19 varones afectados en cinco generaciones de una misma familia. Es un síndrome raro, cuya incidencia no se conoce y que está producido por alteraciones en el gen *FOXP3*. Presenta una herencia recesiva ligada al X, con afectación de los varones (61, 62).

La clínica ya está presente desde la época perinatal, y deriva de la alteración grave del sistema inmune, que produce alteraciones autoinmunitarias, infecciones de repetición, alergias y enfermedad linfoproliferativa masiva. Dentro de las manifestaciones autoinmunitarias se encontrarían alteraciones digestivas (diarrea secretora o enfermedad inflamatoria intestinal), manifestaciones endocrinas (diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmune, hipotiroidismo autoinmune), afectación dermatológica (eczema, dermatitis atópica, lesiones psoriasiformes, penfigoide nodular y alopecia areata), hematológica (anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune) y nefropatía membranosa, entre otras. En referencia a las manifestaciones alérgicas, se ha relacionado la enfermedad tanto con la sensibilización a aeroalérgenos, como a trofoalérgenos. Las infecciones que presentan son infecciones graves, entre las que predominan la sepsis, la meningitis, la neumonía y la osteomielitis, producidas

por gérmenes como *Enterococcus*, *Staphylococcus*, Citomegalovirus y Cándida. No se conoce si la susceptibilidad a padecer una infección grave es consecuencia de la alteración genética, que produciría una alteración de la función de barrera de la piel y del tracto gastrointestinal, o bien, debido a los inmunosupresores administrados como tratamiento. Dada la gravedad del cuadro general se produce la muerte de los pacientes en edad pediátrica debido a sepsis, alteraciones metabólicas, fallo de medro, u otras causas (63-71).

El diagnóstico de sospecha es clínico. Las pruebas complementarias no se suelen realizar, por su escaso valor diagnóstico. Dentro de estas se podrían realizar detección de autoanticuerpos séricos contra hematies, tiroides y/o páncreas, así como estudio histopatológico del intestino, páncreas, piel y/o riñón, para objetivar un infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia. No se realizarán pruebas de laboratorio porque no se modifica el número de células T, granulocitos, complemento ni inmunoglobulinas. El diagnóstico de confirmación se realiza mediante análisis genético del ADN, para detectar las mutaciones en el gen *FOXP3*. En raras ocasiones no se detecta ninguna alteración en el gen, por lo que estos pacientes son diagnosticados de IPEX-like.

Se realiza un tratamiento de soporte en los casos necesarios, que puede incluir nutrición parenteral, transfusiones de sangre y control de la glucemia. Se ha probado con fármacos inmunosupresores, como esteroides a altas dosis, Ciclosporina A, Tacrolimus, Metotrexato, Infliximab, Rituximab, Sirolimus, Azatioprina. No obstante, el resultado no es óptimo, pues no se controla la enfermedad y presentan numerosos efectos secundarios debido a la toxicidad de estos medicamentos y al riesgo incrementado de infecciones secundarias. Existen pocos ensayos clínicos sobre la efectividad de estos tratamientos debido a la baja incidencia de la enfermedad.

El único tratamiento curativo en la actualidad es la realización de un trasplante de médula ósea alogénico, para el que se precisa poca cantidad de leucocitos del donante. Con esta terapia se consigue una disminución tanto de los autoanticuerpos contra el páncreas como de los síntomas de enteropatía, eczema o diabetes, entre otros. No obstante, es un tratamiento muy agresivo, con numerosas complicaciones, como infecciones, enfermedad injerto contra huésped, síndrome linfoproliferativo secundario o síndrome hemofagocítico, que pueden conllevar la muerte del paciente. Acerca de esta alternativa terapéutica también existen pocos estudios por la baja casuística. Se confía en un futuro tratamiento que consista en la reconstitución con células autólogas $CD4^+CD25^+$ transfectadas con el gen *FOXP3*, pero el objetivo no está cerca de conseguirse (63-70).

1.4. GEN *FOXP3*

FOXP3 o Forkhead box P3 es un gen que controla el desarrollo y la función de las células T reguladoras, y es el principal marcador molecular de esta subpoblación celular. Es conocido también como gen *JM2*, *AIID*, *DIETER*, *IPEX*, *MGC141961*, *MGC141963*, *PIDX* o *XPID*.

1.4.1. RESEÑA HISTÓRICA

La primera aproximación del gen la realizan Russell y cols. en 1959 cuando describen en ratones una mutación espontánea ligada al cromosoma X. Observan que los machos afectados presentan descamación cutánea, pérdida de peso, diarrea, malabsorción, linfadenopatías,

hepatoesplenomegalia e infiltrado de linfocitos en diferentes órganos, que conducen a la muerte de éstos en la tercera o cuarta semana de vida. Estos ratones se denominaron “*scurfy*”. En 1991, Godfrey y cols. sugirieron que los ratones “*scurfy*” podrían ser el resultado de un tipo de disregulación autoinmune y no de una inmunodeficiencia como las reconocidas hasta entonces (62, 72).

Se observó que en humanos se producía un síndrome similar al de los ratones “*scurfy*”, el síndrome IPEX, y en el año 2000, Chatila y cols. publicaron la identificación de un gen que parece ser el objeto de las mutaciones en esta grave enfermedad (73).

No fue hasta el 2001 cuando se completó la caracterización molecular del gen, por Brunkow y cols. Estos investigadores descubrieron una mutación por inserción de 2 pares de bases en el genoma de los ratones “*scurfy*” que producía una alteración del marco de lectura del gen. En consecuencia, se generaba una proteína anómala, a la que denominaron proteína escurfina, funcionalmente inactiva al carecer del dominio de unión al ADN. Posteriormente, identificaron el gen por mapeo físico, análisis de la secuencia, y lo denominaron *FOXP3* (62).

1.4.2. ESTRUCTURA DE *FOXP3*

FOXP3 está localizado en el cromosoma X (Xp11.23), en sentido 3'-5', consta de 15391 pares de bases y está formado por 11 exones codificantes y otros 3 exones no codificantes (figuras 4, 5 y 6).

Los 2 exones no codificantes del extremo 5' (-2a y -2b) están separados por 640 pares de bases y éstos están separados de la estructura codificante por el exón -1 (62, 72).

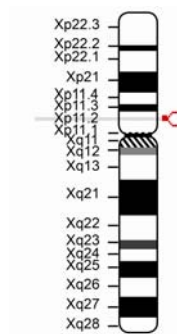


Figura 4. Localización cromosómica Xp11.2 del gen *FOXP3* (extraído de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>)

El análisis de las secuencias conservadas no codificantes del extremo proximal ha revelado diversos elementos intrónicos que desempeñan un papel importante en el control de la expresión de *FOXP3*, como son CNS1, CNS2 y CNS3 (74).

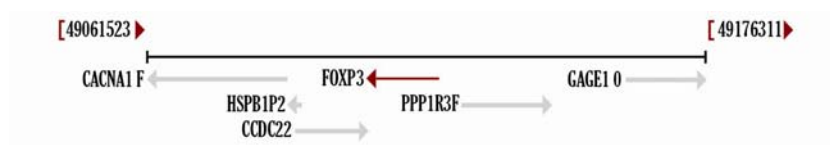


Figura 5. Fragmento cromosómico donde se localiza *FOXP3* (extraído de NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>).

Se han reportado más de 20 mutaciones en regiones codificantes del gen, el 70% de las cuales son mutaciones que producen un cambio de aminoácido (tabla 2) (62, 72).

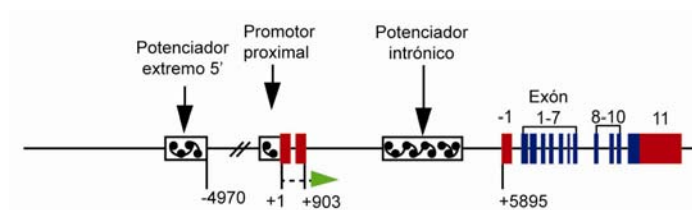


Figura 6. Representación gráfica del gen *FOXP3* (62).

Tabla 2. Variantes génicas en regiones codificantes del gen *FOXP3* (extraído de <http://www.genecards.org>).

rs	Posición en cromosoma	Exón	Secuencia	Efecto en la proteína
rs122467174	49114960	2	CCGATG/ACCCAA	Met → Ile
rs142994383	49114933	2	GGGGCC/TGAGGG	Ser → Ser
rs17847095	49114808	2	TCGAGG/TCGGGG	Gly → Val
rs138970962	49114201	3	TGCCAC/ACATGA	Val → Leu
rs111856931	49114014	4	TCCACC/TGTTGA	Thr → Thr
rs143632471	49114002	4	CGGGCG/ATGGGC	His → His
rs56409830	49113975	4	AGGGGG/ATGCAC	His → His
rs138019743	49113469	5	TGATCC/TCTGTG	Gly → Glu
rs2232367	49113312	6	CCCAGC/TACCCT	Ser → Ser
rs140222626	49113304	6	CAGCCG/AAAAGG	Ser → Leu
rs148215677	49113231	6	TCTTCG/AAAGAC	Phe → Phe
rs143048239	49113230	6	CTCTTC/TGAAGA	Glu → Lys
rs140794570	49113221	6	GTCCTC/GTGGCT	Glu → Gln
rs2232369	49112252	7	CCAGGC/TGGACC	Ala → Val
rs122467171	49111954	8	GAGAAGGA/-GAAGC	Glu → -
rs74162067	49110471	9	CTGTTCG/ATCCCA	Val → Ile
rs146878361	49110417	9	GTGCCT/CCCGGA	Arg → Gly
rs143869281	49110382	9	CCTGGG/TAATGT	Phe → Leu
rs122467173	49109661	10	CAGAGT/CTCCTC	Phe → Leu
rs122467170	49107941	11	AGAACG/ACCATC	Ala → Thr
rs28935477	49107902	11	TTGTGC/TGGGTG	Arg → Trp
rs141362642	49107900	11	TCCACC/TCGCAC	Arg → Arg
rs145368924	49107842	11	GCTCCG/ATTTCT	Arg → Trp
rs55711326	49114832	11	GGAAGG/CTTCCC	Thr → Ser
rs122467175	49108172	11	ACTGGT/CTCACA	Phe → Leu
rs122467169	49108159	11	CATGTT/GTGCCT	Phe → Cys

1.4.3. EXPRESIÓN DE *FOXP3*

El gen *FOXP3* se expresa principalmente en tejidos linfoides como timo, bazo y ganglios linfáticos, en las células $CD4^+CD25^+$ (Treg) y en menor proporción en células $CD4^+CD25^-$, células $CD4^+CD8^+$, células $CD8^+$ y timocitos $CD4^-CD8^- TCR\alpha\beta^+$.

Se han descrito 2 isoformas principales en humanos: *FOXP3* y *FOXP3A2*, que carece del exón 2 y no procesa el intrón 4. Además se recoge otra variante en la que tampoco se procesa el intrón 4. Para evaluar el papel de las dos isoformas principales, Allan y cols. emplearon un modelo de sobreexpresión de ambas isoformas basado en la transfección de vectores retrovirales. Observaron que la transfección de células T $CD4^+CD25^-$ con una de las dos isoformas induce un estado de hiporrespuesta y disminución de la producción de IL-2. Sin embargo, sólo se induce el fenotipo y la función reguladora cuando son transferidas las dos isoformas. Lo que sugiere que ambas isoformas actúan de forma conjunta para la transcripción de genes asociados a las células reguladoras $CD4^+CD25^+$ (62, 72).

1.5. PROTEÍNA FOXP3

El gen *FOXP3* codifica una proteína de 431 aminoácidos, con un peso de 48 KD. Esta proteína forma parte de un complejo proteico mayor de las células T, formando dímeros y tetrámeros.

FOXP3 pertenece a la familia FOX, integrada por un conjunto de factores de transcripción con dominio “*forkhead*” o FKH, que les permite la unión al ADN. Dentro de la familia FOX,

forma parte de la subfamilia FOXP, que incluye además a FOXP1, FOXP2 y FOXP4. Aunque todas las proteínas FOX se unen al ADN, algunas ejercen efectos transactivadores y otras, efectos inhibidores de la transcripción, como es el caso de FOXP3.

Está formada por un dominio “*forkhead*” de unión al ADN, en el extremo carboxi-terminal; un dominio represor, rico en prolina, en el extremo amino-terminal; un dominio Dedo de Zinc y un dominio de dimerización o cremallera de leucina (figura 7).

El dominio “*forkhead*” es una secuencia de 80-100 aminoácidos, que interviene en el transporte intranuclear y en la unión con el ADN, regulando así la expresión de genes involucrados en el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. La mayoría de mutaciones descritas en el gen van a producir una alteración de este dominio. Una mutación en el dominio represor va a provocar la no inhibición de la transcripción general, así como la no represión de la transcripción mediada por NFAT. Finalmente, una mutación en la cremallera de leucina va a producir la no homodimerización de FOXP3 ni la heterodimerización de FOXP3 con FOXP1, por lo que la proteína no va ejercer su acción reguladora. Para que se produzca la dimerización es suficiente con la integridad de la cremallera de leucina (62, 75, 76).



Figura 7. Estructura de la proteína FOXP3 (62).

1.5.1. FUNCIÓN DE FOXP3

Se han identificado varias vías de transmisión de señales que inducen la expresión de FOXP3, aunque los mecanismos precisos no se conocen. Se sabe que la expresión es dependiente de la transmisión de señales a través del receptor de células T (TCR), de CD28 y de receptores de citocinas que comparten la cadena gamma común (γ c), como interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y IL-21, y el receptor del factor estimulante de crecimiento β (TGF- β R). Estos procesos desencadenan la activación de factores de transcripción, como CREB, ATF, SP1, NFAT, AP1, TIEG1, SMAD3 y STAT5, que activarán la expresión de *FOXP3* (figura 8) (62, 77).

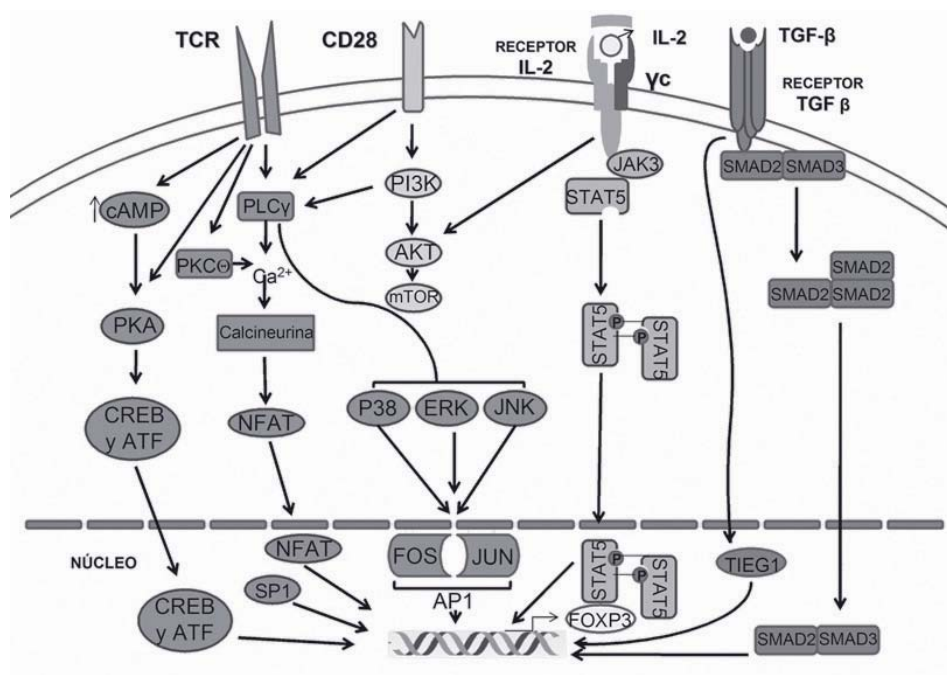


Figura 8. Expresión de *FOXP3* en las células T reguladoras (62).

FOXP3 a su vez controla la expresión de diversos genes asociados a las células Treg, como *CD25*, *CTLA-4* y *GITR* (78).

La regulación epigenética es muy importante para controlar la expresión de *FOXP3*. En ratones y humanos, se han encontrado patrones de metilación en el gen y en su promotor, así como acetilaciones en histonas, que difieren entre las células T reguladoras y las células T convencionales (72).

1.6. *FOXP3* Y CÉLVLAS T REGULADORAS

Las células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (Treg) fueron descritas por Shimon Sakaguchi en 1995 y constituyen el 5-10% de las células T $CD4^+$. Son las responsables del control de las células T autorreactivas que han escapado a la selección negativa del timo, manteniendo así la tolerancia inmunológica (78, 79).

Se caracterizan por la expresión de la cadena α del receptor de IL-2, conocido como CD25, el CTLA-4 y el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR). El marcador más específico, no obstante, de este subtipo celular es la proteína FOXP3 (65).

Walker y cols. demostraron que la expresión de *FOXP3* es inducible mediante la estimulación a través del TCR en células que no tenían actividad reguladora previa. Esta nueva generación de células T reguladoras adquieren la función reguladora y son capaces de disminuir la proliferación de las células respondedoras $CD4^+CD25^-$, de forma similar a las células reguladoras naturales (62). Así, hoy en día se conoce que existen dos principales poblaciones de células T reguladoras: las células T reguladoras naturales y las células T reguladoras adaptativas o inducidas. Las primeras se desarrollan en el timo, están implicadas en la

tolerancia central y realizan su acción moduladora a través del contacto directo intercelular o mediante la secreción de citocinas. Se caracterizan porque son el único tipo celular que presentan el gen *FOXP3* desmetilado. Son activadas mediante el receptor de las células T tras el contacto con un antígeno específico e inhiben la proliferación de otras células T sin la necesidad de la unión de éstas con un antígeno. Las células T adaptativas se desarrollan en la periferia tras el contacto del antígeno que es presentado por la célula presentadora de antígenos, están implicadas en la tolerancia periférica a nivel intestinal y su primer mecanismo de acción es a través de la IL-10 y el TGF- α . Otra diferencia con las células Treg naturales es la metilación del gen *FOXP3* (71, 80, 81).

En el desarrollo en el timo, el crecimiento en la periferia y la supervivencia de las células Treg naturales están implicados factores que tienen un efecto sobre la expresión de *FOXP3*. Entre estos factores se encuentran el CD28, el TGF- β , las células dendríticas, citocinas que comparten la cadena gamma común (γc) (IL-2, IL-4, IL-7 y IL-15), STAT5, entre otros. Cabe destacar la acción de la IL-2 en la generación en el timo y el mantenimiento en la periferia de las células Treg naturales. La principal fuente de esta citoquina parece ser el resto de células T, en un estado fisiológico. De esta manera, habría un control mutuo entre ambos tipos celulares, pues las células T efectoras secretarían IL-2 que activarían las Treg, y éstas a su vez inhibirían la secreción de esta interleucina al suprimir las funciones de las células T. Existe cierta controversia en relación con las señales específicas que se requieren para que las células Treg adaptativas se desarrollen, aunque se cree que hay un solapamiento con las señales de las células Treg naturales (68, 78, 80).

FOXP3 es necesario para el desarrollo y función de las células T reguladoras en ratones. Este hecho se ha comprobado al objetivar la ausencia de este tipo celular en ratones “*scurfy*”, a los

que se había provocado una disrupción del gen. Además se ha probado la recuperación del fenotipo normal en aquellos ratones en los que se transfectó *FOXP3* transgénico (por transfección retroviral) o se realizó un trasplante de médula ósea. Sin embargo, esto no parece observarse en humanos, y la contribución específica de *FOXP3* sobre la diferenciación y función de las células T reguladoras sigue sin conocerse. Bachetta y cols. sí observan células T reguladoras en pacientes en los que no se detecta proteína FOXP3, describiendo distintas alteraciones funcionales según la localización de la mutación en el gen. Así, una mutación en el dominio FKH es crítica para la función de las Treg, pero no para su desarrollo; mientras que una alteración en la cremallera de leucina, está asociada con un defecto parcial de la actividad supresora de las Treg, por lo que algunos individuos con mutaciones localizadas en esta región no padecerán la enfermedad (76, 78, 82, 83).

Las Treg modulan la actividad de una gran variedad de células implicadas tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. La disminución de la función de las células Treg se ha visto implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades autoinmunes y de enfermedades inflamatorias, como diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico. Además esta estirpe celular puede regular la inmunidad relacionada con las infecciones víricas, bacterianas o parasitarias, así como intervenir en la respuesta inmunológica anti-tumoral (68, 84). Recientemente, se ha visto en estudios realizados en ratones una interrelación entre la inmunidad dependiente de las células Treg y el metabolismo. Así en enfermedades como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico, se han reportado alteraciones en esta estirpe celular. Se ha observado que en condiciones fisiológicas, diversos estímulos nutricionales o la leptina producen la activación de forma oscilante de la vía mTOR (*mammalian target of Rapamycin*, es decir, diana de la Rapamicina en mamíferos), con la consiguiente proliferación de las Treg. Sin embargo, en condiciones en

las que esta vía está inhibida de forma crónica (como en la privación nutricional o el tratamiento crónico con Rapamicina) o que está sobreexpresada (como en la obesidad o el síndrome metabólico) provocan una alteración de la expansión de las células Treg, y en consecuencia, una disregulación inmune (figura 9) (77, 85).

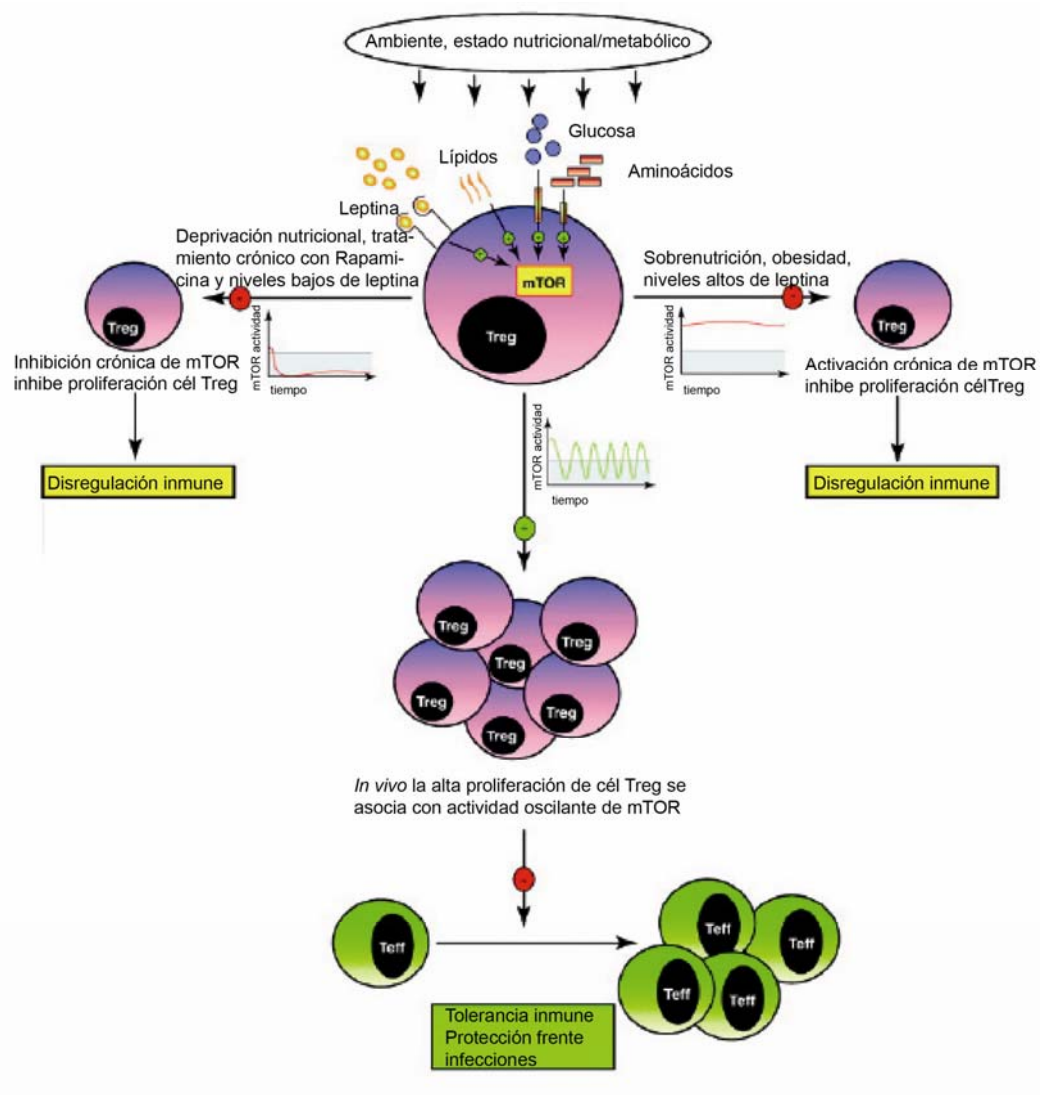


Figura 9. Regulación de la proliferación de las Treg en función del ambiente o del metabolismo. Versión modificada de (77).

De forma resumida, la regulación de la transcripción en las células T convencionales se inicia por la estimulación del receptor de células T (TCR) junto a la coestimulación por el CD28. Así

se producirá la unión de NFAT a AP1 (*activator protein 1*), que activarán la transcripción de genes relacionados con la activación de las células T.

De la misma manera, la regulación de la transcripción en las células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ (Treg) se inicia con la estimulación del TCR y la coestimulación de CD28, pero posteriormente NFAT se une a *FOXP3*, en lugar de a AP1, y se produce la transcripción de genes relacionados con la supresión de las células T (figura 10).

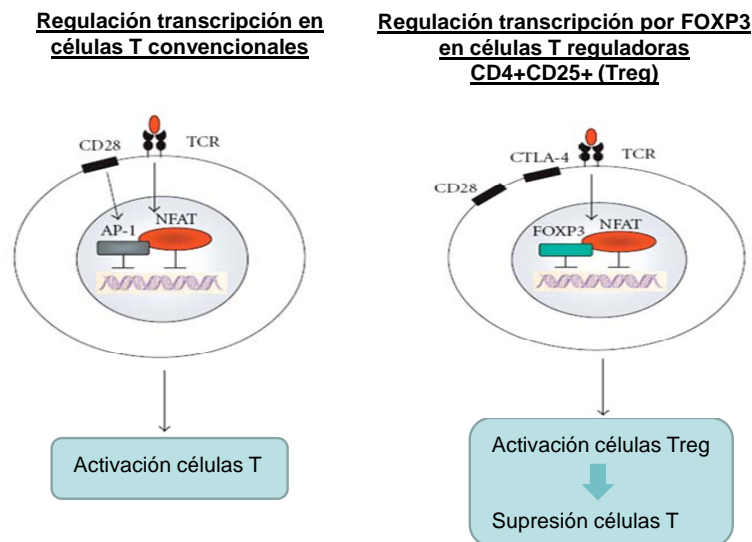


Figura 10. Regulación de la transcripción en células T convencionales y en T reguladoras (65).

Los mecanismos de regulación de la función de las células T efectoras por las células $CD4^+CD25^+$ se inician por la activación de la célula dendrítica al unirse un antígeno. Esta célula activará a su vez a la célula T reguladora, que ejercerá su efecto supresor de la respuesta inmune por cuatro posibles vías: la primera mediante el consumo de la IL-2 por las Treg en lugar de por las células T efectoras; la segunda por la inducción de la apoptosis de la célula T vía CD30/CD30L, o mediante perforinas o granzimas; la tercera a través de la producción de citocinas supresoras por las Treg, como IL-10 y/o TGF- β , y la cuarta y última vía mediante la

producción de metabolitos inmunosupresores del triptófano como resultado de la regulación positiva de Indoleamine-2,3-dioxigenasa (IDO) en la célula dendrítica (figura 11) (65).

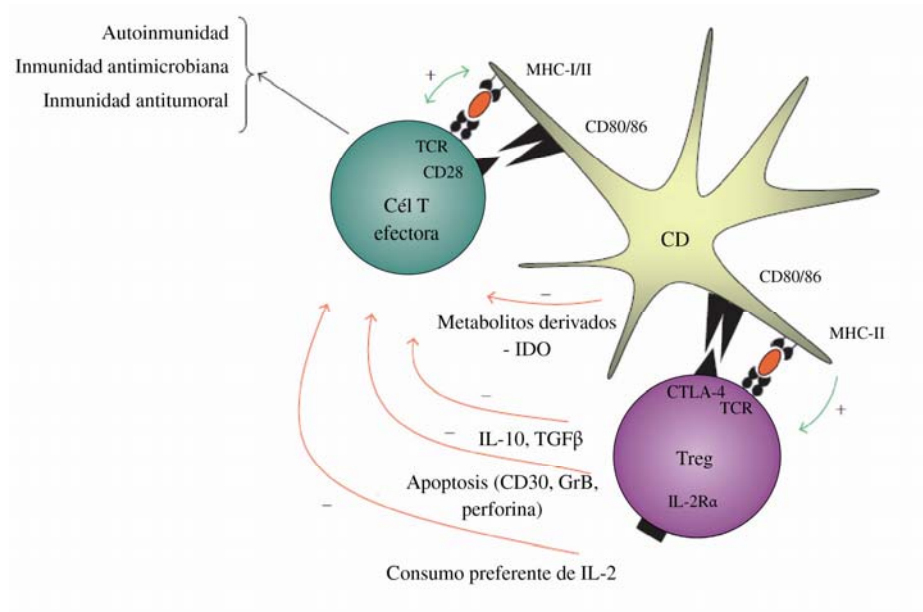


Figura 11. Regulación de la función de las células T reguladoras. Versión modificada de (65).

En condiciones proinflamatorias las células Treg pierden la expresión de *FOXP3* y se convierten en células T efectoras potencialmente patogénicas. Se ha observado que la expresión de *FOXP3* disminuye al exponerse las células Treg a citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1, siendo neutralizada su actividad supresora (74). Este hecho explicaría en parte por qué las células Treg no ejercen su acción para impedir las enfermedades autoinmunes.

La investigación actual en modelos animales se basa en la modulación de las respuestas mediadas por linfocitos Treg a través de la manipulación de la expresión de *FOXP3*, pues se ha observado que se pueden inducir células Treg a partir de células T $CD4^+CD25^-$ usando vectores retrovirales que expresan *FOXP3*. De esta manera, se podría conseguir en un futuro la inducción de tolerancia a aloinjertos y el control de la autoinmunidad en humanos (65, 68).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

FOXP3 es un gen que codifica una proteína implicada en el desarrollo de la respuesta inmune. Dicha proteína actúa como un factor de transcripción que ejerce un papel esencial en el desarrollo y función de las células Treg implicadas en el control de la respuesta inmunitaria.

Se desconoce el mecanismo preciso pero se piensa que *FOXP3* puede ejercer su control durante la transcripción, a través de la interacción con la región promotora del ADN de importantes genes de regulación de la función de la célula T.

FOXP3, como marcador específico de las células Treg, resulta esencial en la tolerancia inmunológica, en especial autotolerancia, lo que ha llevado a desarrollar diversos estudios de asociación génica entre este gen y algunas enfermedades inmunológicas cuyos resultados no han sido concluyentes.

Basados en estos datos, nuestra hipótesis de trabajo es que la presencia de mutaciones en el gen *FOXP3* podrían dar lugar a modificaciones en la proteína, alterando su capacidad de unión a la región promotora de los genes diana y afectando a los mecanismos transcripcionales de expresión génica, lo que podría explicar algunas de las alteraciones fisiopatológicas que subyacen en enfermedades de carácter inmunológico en las que se encuentran alterados los mecanismos de tolerancia.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

En este estudio se plantean los siguientes objetivos:

- Analizar las variables clínico-biológicas de los grupos poblacionales de enfermedades inmunológicas utilizando como modelos la enfermedad alérgica y las enfermedades autoinmunitarias más frecuentes en la infancia.
- Identificar posibles polimorfismos localizados en el gen *FOXP3* y determinar las frecuencias alélicas y genotípicas así como las combinaciones haplotípicas de los polimorfismos detectados en los distintos grupos poblacionales.
- Valorar la relación de los polimorfismos individualmente considerados con los parámetros clínico-biológicos analizados en el primer objetivo.
- Analizar las posibles asociaciones de los Haplotipos con las diferentes enfermedades autoinmunes y con la enfermedad alérgica.
- Interpretar los posibles mecanismos mediante los cuales las variantes génicas identificadas podrían contribuir a la etiopatogenia de los fenotipos asociados.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este trabajo está diseñado como un estudio observacional, transversal, de casos y controles. Se ha desarrollado en el Servicio de Inmunoalergia (Unidad de Alergia Infantil) y en el Servicio de Pediatría (Unidad de Endocrinología Infantil y Unidad de Gastroenterología Infantil) del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el presente estudio se incluyeron 255 individuos, de los cuales 95 eran controles y 160 pacientes (159 con enfermedades alérgicas y/o autoinmunitarias y 1 paciente diagnosticado de IPEX-like).

El estudio se ha sometido a la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. A todos los individuos incluidos en el estudio, o responsables de éstos, se les solicitó un consentimiento informado.

4.2.1. PACIENTES

El primer grupo de pacientes lo constituyeron 159 individuos que se recogieron de forma consecutiva, no seleccionada, entre los pacientes que habían acudido a la consulta de

Endocrinología Infantil, Gastroenterología Infantil y/o Inmunoalergia Infantil del Hospital Universitario de Salamanca, y que cumplieran los siguientes criterios de inclusión.

4.2.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Todos los pacientes incluidos tenían que cumplir el criterio de edad inferior a 18 años y además uno de los dos siguientes criterios:

- Individuos diagnosticados previamente de una, o más, de las siguientes enfermedades autoinmunes:
 - Diabetes mellitus tipo 1:
 - Se estableció el diagnóstico según los criterios establecidos por la OMS y la ADA (tabla 1).
 - Tiroiditis autoinmunitaria:
 - Se realizó el diagnóstico ante la presencia de una elevación de la TSH (>10 $\mu\text{U/mL}$) junto a la positividad de los anticuerpos antitiroideos (anticuerpos antiperoxidasa tiroidea, anticuerpos antitiroglobulina y/o anticuerpos bloqueantes del receptor de tirotropina) (27, 28, 30).
 - Enfermedad celiaca:
 - Se siguieron los criterios de la ESPGHAN para su diagnóstico (43).
- Individuos diagnosticados de enfermedad alérgica:

Individuos que presentaban pruebas cutáneas positivas frente a una batería estándar de aquellos aeroalérgenos más frecuentes en nuestro entorno (ácaros, pólenes, hongos y epitelios) (ALK-Abelló, Madrid-España, Bial-Aristegui, Bilbao-España y Laboratorios Leti, Barcelona-España) (tabla 3).

 - Podían o no estar diagnosticados de asma

Se siguieron los siguientes criterios para el diagnóstico de asma:

- Al menos dos síntomas consistentes con asma (tos, disnea, sibilancias, opresión torácica).
- Ausencia de otras enfermedades pulmonares.
- Alteraciones en la función pulmonar. Se realizó una espirometría basal según las normas de la *American Thoracic Society* (ATS) (86). A todos los pacientes con $FEV1/FVC < 0,7$ se les realizó una prueba de broncodilatación; si ésta fue negativa, se procedió a realizar una prueba de hiperreactividad bronquial con metacolina (87). Se exigió una prueba broncodilatadora positiva (mejoría del $FEV1 > 12\%$ y más de 200 ml) o una $PC20$ metacolina < 16 mg/ml, considerándose su positividad característica de asma.

Además se incluyó un paciente con diagnóstico de IPEX-like procedente del Servicio de Pediatría del Hospital El Bierzo de Ponferrada.

Tabla 3. Batería de aeroalérgenos empleados.

ÁCAROS	<i>Dermatophagoides pteronissynuss</i> , <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Lepidoglyphus destructor</i> , <i>Tirophagus putrescentiae</i> , <i>Euroglyphus maynei</i> , <i>Acarus siro</i> , <i>Glycyphagus domesticus</i> .
PÓLENES	Mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, <i>Parietaria judaica</i> , <i>Chenopodium album</i> , <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Plantago lanceolata</i> , <i>Olea europea</i> , <i>Cupressus arizonica</i> , <i>Platanus acerifolia</i> .
HONGOS	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> .
EPITELIOS	Perro, gato, hámster, caballo y mezcla de plumas.
OTROS	Mezcla de cucaracha

4.2.2. CONTROLES

Se seleccionaron 95 individuos evaluados en la consulta de Inmunología del Hospital Universitario de Salamanca que cumplían los siguientes criterios.

4.2.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes adultos. Se eligió una población adulta ya que con la inclusión, como controles, de una población infantil existía mayor posibilidad de que algunos de ellos, genéticamente predispuestos, desarrollasen las enfermedades de estudio en un futuro.
- Sin síntomas o antecedentes de enfermedades autoinmunes.
- Sin síntomas o antecedentes de asma u otras enfermedades alérgicas.
- Sin síntomas o antecedentes de enfermedades dermatológicas crónicas.
- Sin antecedentes familiares de ninguna de las enfermedades respiratorias.
- Con pruebas cutáneas negativas frente a una batería estándar de aquellos aeroalérgenos más frecuentes en nuestro entorno (ácaros, pólenes, hongos y epitelios) (ALK-Abelló, Madrid-España, Bial-Aristegui, Bilbao-España y Laboratorios Leti, Barcelona-España) (tabla 3).

4.3. PROTOCOLO Y VARIABLES DE ESTUDIO

En el estudio se recogieron las siguientes variables.

4.3.1. DATOS BÁSICOS Y SOCIODEMOGRÁFICOS

4.3.1.1. Datos identificativos: nombre y número de historia clínica.

4.3.1.2. Edad y sexo

4.3.1.3. Raza

4.3.1.4. Existencia de parentesco con algún otro individuo del estudio.

4.3.2. VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

4.3.2.1. Presencia de enfermedades autoinmunes, como diabetes mellitus tipo 1, patología tiroidea autoinmune y/o celiaquía.

Se recogió la edad del paciente al diagnóstico.

4.3.2.2. Presencia de enfermedades alérgicas, como rinitis, conjuntivitis y/o asma.

Se registró la edad del paciente al diagnóstico.

4.3.2.3. Presencia de dermatitis atópica.

4.3.2.4. Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata frente a una batería de aeroalérgenos comunes de la zona de residencia (en aquellos individuos con sospecha de enfermedad alérgica).

4.3.2.5. Niveles de inmunoglobulina E (IgE) total (en aquellos individuos con sospecha de enfermedad alérgica).

4.3.2.6. Presencia de autoanticuerpos propios de la enfermedad autoinmune diagnosticada (tabla 4).

4.3.3. ANTECEDENTES FAMILIARES

4.3.3.1. Antecedentes familiares de primer grado de alguna enfermedad autoinmune.

4.3.3.2. Antecedentes familiares de primer grado de atopia o asma.

4.3.4. ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS Y PERINATALES DE LOS CASOS

4.3.4.1. Incidencias en el curso del embarazo.

Se consideró que no hubo un curso normal del embarazo cuando se presentó amenaza de aborto o de parto prematuro, rotura prematura de membranas, oligoamnios o polihidramnios, crecimiento intrauterino retrasado o algún tipo de patología materna, como por ejemplo, hiperemesis gravídica o diabetes gestacional, u otras enfermedades por la que precisara tratamiento o ingreso durante la gestación.

4.3.4.2. Edad gestacional.

Un nacimiento fue a término cuando se produjo entre la semana 37 y la 42 de edad gestacional, pretérmino cuando sucedió antes de las 37 semanas, y postérmino en el caso que naciera después de la semana 42.

4.3.4.3. Tipo de parto.

Se consideró que el parto había sido eutócico cuando se había producido vía vaginal sin ayuda instrumental, y distócico a aquellos partos instrumentados (ventosa o fórceps) y las cesáreas por cualquier motivo.

4.3.4.4. Apgar al minuto de vida: superior o inferior a 7.

4.3.4.5. Distrés respiratorio al nacimiento que requiriera ingreso.

4.3.4.6. Ventilación mecánica y modalidad.

Se anotó si precisaron ventilación mecánica por problema respiratorio o por otro motivo, como por ejemplo, patología cardíaca, sepsis, etc. Además se recogió el tipo de modalidad, es decir, invasiva o no invasiva (CPAP o BIPAP).

4.3.5. OTROS ANTECEDENTES PERSONALES Y DE RIESGO AMBIENTAL

4.3.5.1. Tipo de lactancia.

Se consideró que habían tomado lactancia materna si habían estado más de un mes con este tipo de alimentación. Además se recogió la duración de cada tipo de alimentación, y se clasificó la lactancia materna en función de ésta en menos o más de 3 meses.

4.3.5.2. Asistencia a guardería

4.3.5.3. Hábito tabáquico en los padres y durante la gestación.

4.3.6. VARIABLES GÉNICAS EN EL GEN *FOXP3*

Se recogieron las variables relacionadas con el análisis genético de *FOXP3* incluyendo los datos de genotipado, frecuencias alélicas, genotípicas y datos de haplotipos.

Tabla 4. Autoanticuerpos de las enfermedades autoinmunes incluídas en el estudio.

<i>ENFERMEDAD AUTOINMUNE</i>	<i>AUTOANTICUERPOS</i>
<i>Diabetes mellitus tipo 1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos frente a células de los islotes pancreáticos (ICA) • Anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico (GAD) • Anticuerpos antitirosin-fosfatasa de los islotes pancreáticos (ICA2) • Anticuerpos antiinsulina (IAA)
<i>Tiroiditis linfocitaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos antiperoxidasa tiroidea (AcTPO) • Anticuerpos antitiroglobulina (AcTG) • Anticuerpos bloqueantes del receptor de tirotropina (AcTRB)
<i>Enfermedad celiaca</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos antitransglutaminasa • Anticuerpos antiendomisio • Anticuerpos antireticulina

4.4. ANÁLISIS MOLECULAR

El análisis de polimorfismos del gen *FOXP3* se realizó en todos los individuos incluidos en el estudio.

4.4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

Inicialmente se realizó la extracción de sangre periférica mediante venopunción en la región antecubital. Todas las muestras de sangre periférica para estudio del ADN fueron recogidas en tubos con EDTA. La conservación de las mismas se realizó a una temperatura de 4°C hasta que se realizó la extracción del ADN genómico, generalmente en el mismo día de la extracción.

La obtención del ADN a partir de las muestras de sangre periférica se llevó a cabo utilizando el sistema MagNA Pure Compact System (Roche, Barcelona, España) (figura 12). Es un procedimiento automatizado, en el que se obtiene un eluido de ADN genómico a partir de una muestra de 1 ml de sangre total. La extracción del ADN se basa en la tecnología *Magnetic Glass Particle*, que consiste, en un primer paso, en la lisis de la muestra e incubación con Proteinasa K y un buffer de lisis especial que contiene sales caotrópicas. Posteriormente, se añaden Partículas Magnéticas de Cristal (MGPs) y los ácidos nucleicos son inmovilizados en la superficie de las MGPs. Las sustancias libres, como proteínas, desechos celulares e inhibidores de la PCR, son eliminados mediante sucesivos pasos de lavado. Por último, los ácidos nucleicos purificados son eluidos y separados de las MGPs.

La cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído se determinó mediante espectrometría en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA.). El eluido de ADN obtenido se conservó posteriormente a -20°C hasta el momento de su utilización.



Figura 12. Imagen del sistema MagNA Pure Compact System (Roche).

4.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para el estudio de la región génica de interés, en nuestro caso la secuencia nucleotídica correspondiente a la región codificante del gen *FOXP3*, se procedió a la amplificación de dicha zona a partir de las muestras de ADN genómico y mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para llevar a cabo dicha técnica se utilizó el kit comercial PCR-Máster Mix (Promega, Wisconsin, EE.UU.). Cada reacción fue preparada añadiendo $7,5\ \mu\text{L}$ de Máster Mix (22 mM Tris-HCl pH 8,4, 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl_2 , 220 mM dNTPs y 22U de Taq

ADN polimerasa), 2,5 μL de agua destilada libre de nucleasas, 3 μL de ADN genómico y 1 μL de cada oligonucleótido a una concentración de 20 μM . El volumen final de la reacción fue en todos los casos de 15 μL y siempre se preparó una reacción sin ADN como control negativo para monitorizar las posibles contaminaciones experimentales. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador de MWG-BIOTECH. (Ebersberg, Alemania).

La región codificante analizada comprende los exones del 1 al 11. El exón descrito como -1 se corresponde con una secuencia transcrita pero no traducida por lo que no se analizó en el presente estudio. Además de los exones codificantes se amplificó para su posterior análisis una secuencia reguladora localizada inmediatamente después de la secuencia de finalización del gen (región UTR tras el exón 11) y una secuencia reguladora localizada aguas arriba del ATG (figura 13).

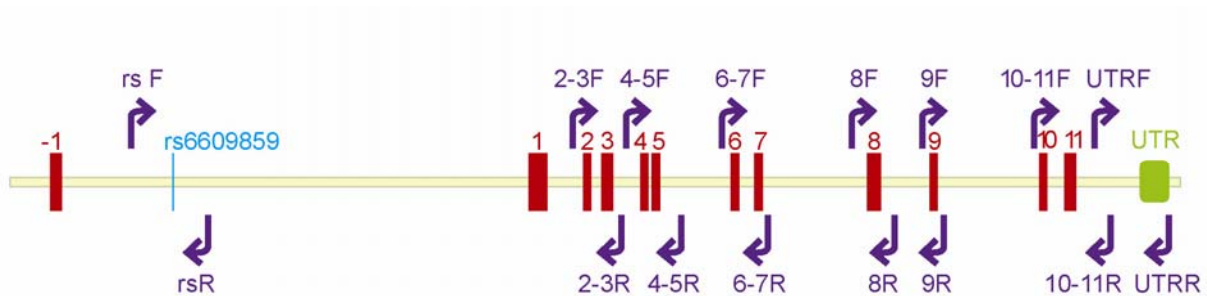


Figura 13. Regiones del gen *FOXP3* amplificadas. Se señalan los exones (en rojo), los oligonucleótidos (en morado), la región UTR (en verde) y el polimorfismo rs6609859 (en azul).

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés de la región codificante de *FOXP3* se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y características de los fragmentos amplificados.

NOMBRE	SECUENCIA	Tm (°C)	Región amplificada	Localización respecto ATG (pb)
Exón 2-3 F	ATCTCCATGAGCCTCAGTTTC	62,7	Exón 2 y exón 3	594
Exón 2-3 R	CGTTTTTTGGAGGGTGGGA	64,6		1231
Exón 4-5 F	AGTCAAAATGTCAGCACCTG	61,8	Exón 4 y exón 5	1296
Exón 4-5 R	ATGGGGGTAAATAACAGCAC	62		2003
Exón 6-7 F	AGAGGGGAGACTGAGGTAGAGAG	61,4	Exón 6 y exón 7	2558
Exón 6-7 R	TGAATGTGAGGTTAGGTTCC	59,8		3165
Exón 8 F	AGGCTGAGGCAGAAGACTTG	64,1	Exón 8	4249
Exón 8 R	CCAAGGGAGTCAGGGCTA	64,1		4822
Exón 9 F	CTGGACACGGGTGTTGACGG	72,1	Exón 9	5181
Exón 9 R	GGCACTCAGAGGGAGACAGG	67,5		5465
Exón 10-11 F	ATGTCAGATGGCTCGGGGTAG	68,3	Exón 10 y exón 11	6652
Exón 10-11 R	TCAGGGCTGTGCTTGTGTG	67,6		7649
UTR F	GCCAAACAGAGCCTTCACAAC	67,7	Región UTR	7438
UTR R	GTGATGGGGGCTGGTGAG	67,5		8429
RS 9859 F	TCGATTCTGCAGGCTTAGCA	66,3	SNP rs6609859	-5227
RS 9859 R	GGAAATGGAGGTATGGAGAGGT	66,5		-4212

El programa de amplificación utilizado se detalla a continuación:

95°C, 5 min. (x 1 ciclo)

94°C, 30 seg. } (x 35 ciclos)

T°C*, 1 min. }

72°C, 1 min. }

72°C, 5 min. (x 1 ciclo)

8°C, ∞

* La temperatura (T°C) fijada en cada reacción de PCR está determinada por la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos empleados en la misma, por lo que fue diferente para los distintos fragmentos amplificados.

Tabla 6. Temperatura de anillamiento fijada para cada fragmento amplificado.

NOMBRE	TEMPERATURA PCR (°C)
Exón 2-3	61
Exón 4-5	60
Exón 6-7	60
Exón 8	63
Exón 9	65
Exón 10-11	67'5
UTR	67'5
RS 9859r	64

4.4.3. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GEL DE AGAROSA

Los amplicones obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa de alta resolución a una concentración de 1%, que es el porcentaje adecuado al tamaño de nuestros fragmentos, en solución TAE al 0,5%. Los productos de PCR fueron visualizados con Redsafe (iNtRON Biotechnology Inc., Corea) y con Gelred (Biotium, EEUU). Como marcador de

tamaño se utilizó *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche, Alemania), que permite determinar el peso de fragmentos de ADN de entre 19 y 1114 pares de bases (figura 14).

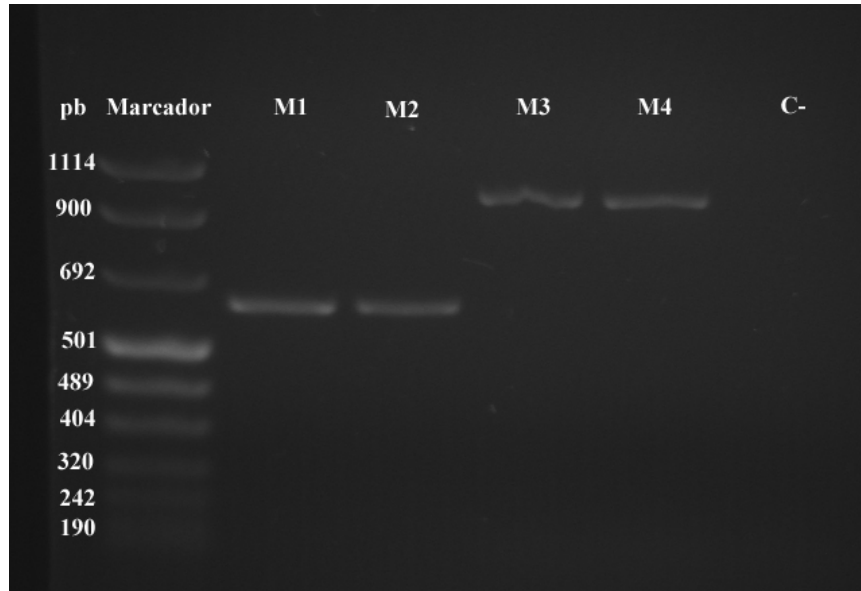


Figura 14. Ejemplo de gel de agarosa en el que se visualiza en el primer carril el marcador de peso molecular, seguido de cuatro amplicones (M1 y M2: fragmentos de 608 pb correspondientes a la región de los exones 6 y 7; M3 y M4: fragmentos de 992 pb correspondientes a la región UTR). En el último carril se colocó el control negativo correspondiente a una amplificación en la que no se incluyó ADN molde (C-).

4.4.4. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS

Los productos de PCR se purificaron utilizando el enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, Barcelona, España) o Illustra ExoSTAR 1-step o 2-steps (VWR International Eurolab, Barcelona, España) para evitar que los restos de la reacción de amplificación pudieran interferir en el posterior análisis de secuenciación.

El procedimiento se basa en la degradación enzimática del exceso de oligonucleótidos y de nucleótidos que no se han incorporado a los amplicones durante la PCR. Para ello, es necesario

añadir 1 μl del preparado comercial que contiene dos enzimas, una fosfatasa alcalina y una exonucleasa, a 5 μl de la muestra de PCR e incubarlo a 37°C durante 15 minutos, para facilitar la acción enzimática, y posteriormente a 80°C durante otros 15 minutos, para inactivar las enzimas (figura 15).

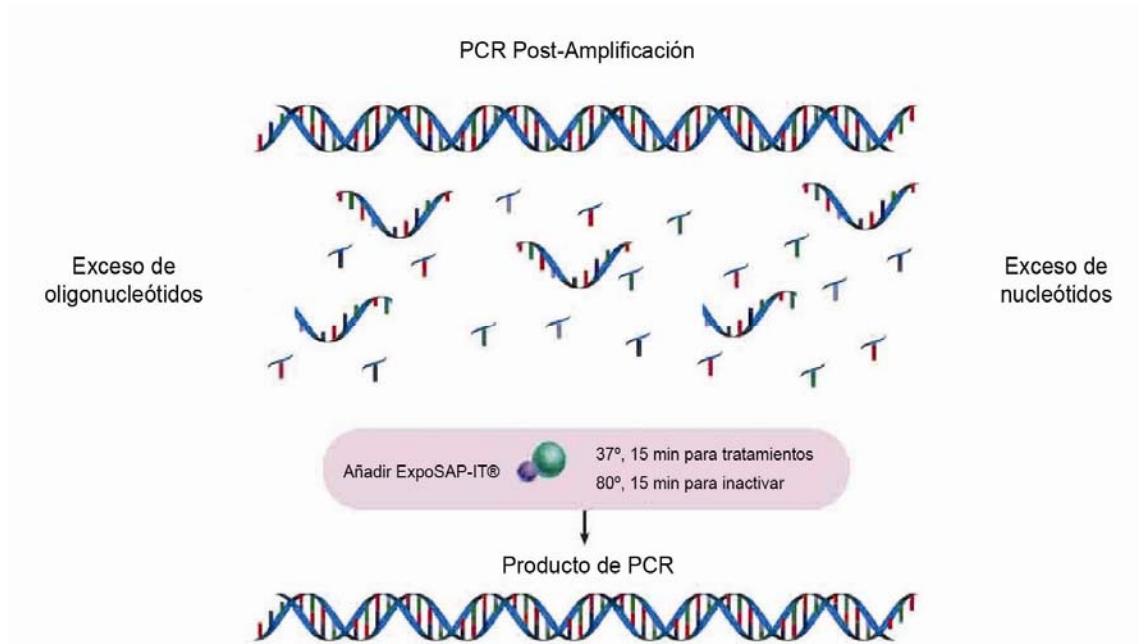


Figura 15. Representación esquemática de la purificación de los fragmentos de ADN con ExoSap (extraída de la página on-line del producto: <http://www.affymetrix.com/estore>. Versión modificada).

4.4.5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN

Finalmente se procedió al estudio de los alelos mediante secuenciación automática en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, C.A, USA). Las reacciones de secuenciación se prepararon con 4 μL del producto de la PCR purificada que contenía la secuencia de interés y con 3 μL del cebador a una concentración de 1 μM , todo ello en un volumen final de 7 μL .

4.4.6. CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO

Todos los procedimientos de laboratorio se realizaron siguiendo las recomendaciones de calidad de la European Molecular Genetics Quality Network.

Las normas de control de calidad llevadas a cabo durante la realización de este trabajo comenzaron 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 peso molecular apropiados. Las muestras procedentes de sujetos control y de pacientes se trataron conjuntamente desconociendo el grupo al que correspondían durante su tratamiento en el laboratorio para evitar posibles sesgos.

4.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS

4.5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Se realizó el análisis descriptivo de todas las variables estudiadas para la caracterización de la muestra seleccionada. Para este análisis se emplearon porcentajes para las variables cualitativas, y, para las variables cuantitativas, medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). Se utilizó para ello el programa informático SPSS versión 18.0. (Chicago, Illinois, EE.UU.).

4.5.2. ANÁLISIS BIVARIANTE

Inicialmente se analizó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar la distribución de las variables cualitativas se emplearon las pruebas de χ^2 y OR (odds ratio, razón de posibilidades) con los correspondientes intervalos de confianza, así como las pruebas exactas de Fisher, Pearson y Monte Carlo.

El análisis de variables cualitativas frente a cuantitativas se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). En todos los casos se analizó la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene también empleando el programa SPSS.

4.5.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE CORRESPONDENCIAS

Se realizó un análisis Multivariante, denominado Análisis de Correspondencias Múltiple o HOMALS (“*HOMogeneity analysis by means of Alternate Least Squares*”), con la finalidad de obtener información de las variables que puedan caracterizar los pacientes incluidos en nuestro estudio y si fuera posible, establecer una tipología de las variables en estas enfermedades en la población general.

El análisis de correspondencias múltiple (ACM) es una metodología eminentemente descriptiva que cuantifica los datos nominales o categóricos, mediante la asignación de valores numéricos a las categorías de cada variable. Dicha metodología se puede utilizar para representar gráficamente la relación entre las variables, de manera que si las variables clasifican objetos de las mismas categorías en los mismos subgrupos se consideran

homogéneas. En ese caso los individuos de la misma categoría (“*objetos* de la misma categoría” en la terminología de GIFI, 1990) aparezcan próximos entre sí y los individuos de categorías diferentes estén alejados los unos de los otros. Ello permite establecer una tipología de los individuos u objetos, puesto que las categorías dividen los individuos u objetos en subgrupos homogéneos (de ahí el nombre de Análisis de Homogeneidad u HOMALS) (88-95).

Para el ACM se utilizó la matriz de datos generada a partir de respuestas, observaciones y datos experimentales obtenidos de los pacientes que constituían nuestra muestra. En dicha matriz, las filas se correspondía con los individuos y las columnas se correspondía con las variables consideradas.

Dicho análisis se llevó a cabo mediante el módulo programado por el grupo de investigación DTSS (Data Theory Scaling System group) perteneciente a la Universidad holandesa de Leiden y que se encuentra implementado en el programa SPSS.

4.5.4. CONTROL DE CALIDAD DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El control de los estudios estadísticos se realizó analizando la potencia estadística y el análisis del error tipo I mediante los cálculos de probabilidad de emitir resultados falsos positivos en el estudio. Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

4.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

4.6.1. ESTUDIO DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE REFERENCIA DE *FOXP3*

Para llevar a cabo el estudio de *FOXP3* 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 *FOXP3*, de su correspondiente transcrito y de la región codificante de la proteína FOXP3 se llevó a cabo empleando distintos programas informáticos, entre los que se encuentra la plataforma OMIM[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

*300292
 FORKHEAD BOX P3; FOXP3

Alternative titles: symbols
 SCURFIN
 JM2

HGNC Approved Gene Symbol: *FOXP3*

Cytogenetic location: *Xp11.23* Genomic coordinates (GRCh37): *X:49,106,896 - 49,121,287* (from NCBI)

Location	Phenotype	Phenotype MIM number
Xp11.23	Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-linked [Diabetes mellitus, type I, susceptibility to]	304790 222100

TEXT

Description

FOXP3, a member of the fork-winged helix family of transcription factors, plays an important role in the development and function of naturally occurring CD4 (186940)-positive/CD25 (IL2RA; 147730)-positive T regulatory cells (Tregs). Tregs are involved in active suppression of inappropriate immune responses (summary by Ricciardelli et al., 2008).

Table of Contents - *300292

External Links:

- Genome
- DNA
- Ensembl
- NCBI RefSeq
- UCSC Genome Browser
- Protein
- Gene Info
- Clinical Resources
- Variation
- Animal Models
- Cellular Pathways

Figura 16. Visión parcial de la pantalla que muestra los resultados de la búsqueda del gen *FOXP3* en la página web del OMIM. Muestra la localización cromosómica, el fenotipo y parte de la descripción del gen. Se subraya en rojo el enlace para obtener la secuencia del gen.

El OMIM[®] (Online Mendelian Inheritance in Man[®]) es un portal que ofrece información actualizada sobre más de 12000 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 (figuras 16 y 17).

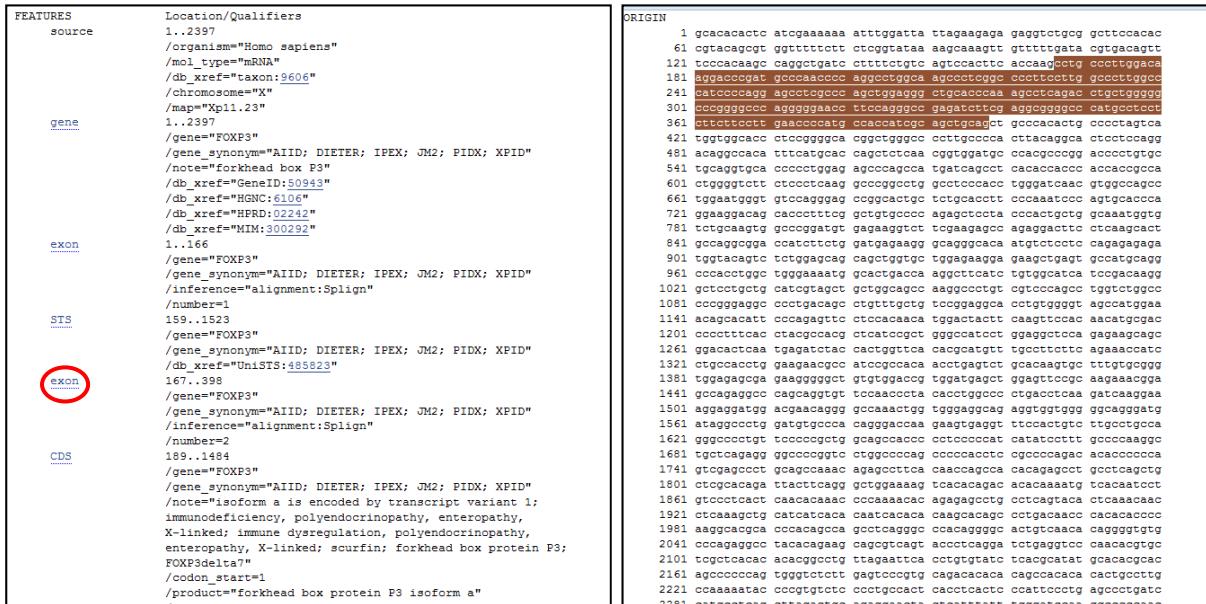


Figura 17. A la izquierda, visión parcial de la pantalla que muestra los enlaces para obtener la secuencia de cada exón, de la región codificante (CDS), etc. del gen *FOXP3*. En el panel de la derecha se muestra la secuencia nucleotídica (obtenida del enlace señalado en rojo) y se marca (en marrón) el primer exón codificante.

Como ya se indicó en el correspondiente apartado de la introducción, la secuencia génica de referencia del gen *FOXP3* comprende 14 exones, los tres primeros de los cuales (exón -1, -2a y -2b) se transcriben pero no se traducen, por lo que la región codificante (CDS) de la proteína FOXP3 corresponde a los exones del 1 al 11 englobando una secuencia de 1296 nucleótidos que codifica una proteína de 431 aminoácidos. Paralelamente, se describen en las bases de datos dos posibles variantes con un procesamiento alternativo de la misma secuencia genómica. La variante 1 es similar a la secuencia descrita con la diferencia de que no se procesa el intrón 4. Por la tando, la región codificante es más larga pero cuenta con un exón menos (10 exones), englobando una secuencia de 1365 nucleótidos que codifica una proteína de 454 aminoácidos.

Finalmente, la variante 2 es similar a la variante 1 a excepción del exón 2 que está ausente en la variante 2, con lo que la región codificante comprende 1191 nucleótidos y la proteína resultante tiene 396 aminoácidos.

4.6.2. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se diseñaron utilizando el programa comercial VectorNTI 10.3.0© 2006 Invitrogén Corporation (Carlsbad, California, EE.UU.). Éste es un programa que permite la creación de una base de datos de secuencias y el análisis de las mismas. Permite la representación gráfica de la secuencia, el alineamiento de secuencias, diseño de oligonucleótidos, simulación de geles y selección de vectores de clonación, entre otras opciones.

The screenshot shows the VectorNTI software interface. The main window displays a DNA sequence with various annotations, including a primer design tool overlay. The sequence is shown in a grid format, with the primer design tool overlaying the sequence. The primer design tool includes a menu with options like 'Find PCR Primers...', 'Amplify Selection...', 'Amplify Features...', 'PCR using Existing Oligos...', 'Long PCR...', 'Multiplex PCR List', 'Alignment PCR List', 'Sequencing Primers...', and 'Hybridization Probes...'. The sequence is shown in a grid format, with the primer design tool overlaying the sequence. The sequence is shown in a grid format, with the primer design tool overlaying the sequence.

7101	TTACTGTGGC	ACTGGGCGGG	AGGGGGGCTG	CTGGGGGCAC	AGGAGTGGT	TTCTGGGTCC	CAGGCAAGTC	TGTGACTTAT	GCAGATGTTG	CAGGGCCAAAG
7201	AAATATCCCA	CTGCGCAGGC	CTCAGAGATT	GSAGGCTCTC	CCCGACCTCC	CAATCCCTGT	CTCAGGAGAG	GAGGAGGGCC	TATTGTAGTC	CCATGAGCAT
7301	AGCTATGTGT	CCCATATCCC	ATGTGACAGG	ASAGAGAGGC	TGGGGCCAAAG	TAGTGTAGGT	GACAGGGGCTG	AGGCCAGCTC	TGCACCTTAT	TAGCTGTTTG
7401	ATCTTTAAAA	AGTTACTCGA	TCTCCATGAG	CTTCAGTTTC	CATACGTTGA	AAAGGGGGAT	GAICATAGCA	TCTACCATGT	GGGCTTTCAG	TGCAGAGTAT
7501	TGAAATTTT	TCAATGAGCT	AGAGGTACTC	GSASTCAAGG	GTATGACAT	TTTCCCCCTA	CTAGTATCGT	AGATGGTACA	CCCGAAGGTC	AGTGTCTATA
7601	GGGACAGGCT	GGGCCCTTGG	CCCACTTAC	AGCACTCTCT	CTAGGACAGG	CCACATTTCA	TGCACCAAGT	ATGACAGGTC	AATGGCCAGG	GAGGAGGAGG
7701	CAGTGGGAG	AACTGTGGG	AGGGGGCCCG	ASTCAGGGCTG	AACCCAGGCC	CACATGTGCC	CCCCACCTCT	CACGGGTGG	TGCCCAAGCC	CGAACCCTTG
7801	TGCTGAGGT	GCACCCCTTG	GAGAGCCGAG	CCATGATCAG	CTTCACACCA	CCACACAGG	CCACTGAGGT	CTTCTCCCTC	AAGGCCCGGC	CTGGCTCTCC
7901	ACCTGTATAC	ACCTCAGGCC	GTACCCCATG	GCCTTCACAG	ACCCCAAGT	CCCGAGATCC	TGGGTGTGA	GCAGTGTAGG	CTATTCTGAA	TTCCAGTACT
8001	CTGGGGGTCA	AAAGTGTGAG	GTCTCAGAGG	CTTGGAAACT	CCACCTCCCA	AAAAACGTCA	GGTGCAGACG	CTTAAAGATG	CAGATTTCTCA	AAATACAAA

Figura 18. Pantalla general del VectorNTI. En ésta se visualiza la representación del gen (arriba), así como la secuencia del mismo (abajo). Permite el diseño de oligonucleótidos para la región del ADN seleccionada.

La opción “*Find PCR primers*”, localizada dentro de “*Primer design*”, que a su vez está en la opción “*Analyses*” de la barra de herramientas, redirecciona a otra ventana en la que se pueden establecer las propiedades físico-químicas que deberían tener los oligonucleótidos (figura 18 y 19). Las características principales que tuvimos en cuenta en el diseño de los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron:

- Tamaño: el oligonucleótido debía ser entre 18 y 22 pares de bases, que es la longitud óptima para unirse al ADN.
- Temperatura de anillamiento (T_m): ambos oligonucleótidos *forward* (F) y *reverse* (R) tenían que tener una temperatura similar a la hora de unirse al ADN, siendo ésta la que se fijaría en el programa de PCR.
- Porcentaje de guaninas (G) y citosinas (C): en torno a 50%.
- Tipo de base en extremo 3': lo óptimo es que fuera una citosina o una guanina, pues el enlace que establece con el ADN es más fuerte, al ser un triple enlace, y así la unión a éste es más estable.

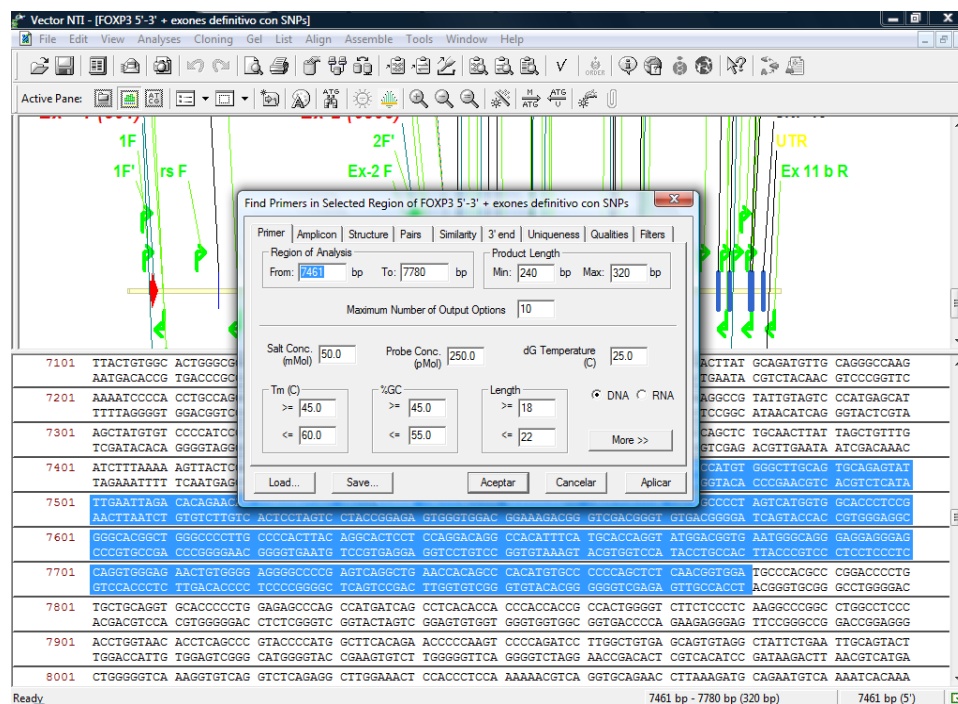


Figura 19. Visión de la ventana que permite la selección de las características de los oligonucleótidos.

Una vez que el programa determina los posibles oligonucleótidos para amplificar una región de ADN, es necesario conocer sus propiedades físico-químicas, y para esto se empleó el programa bioinformático Beacon Designer (www.premierbiosoft.com/qpcr/index.html) (figura 20). Esta herramienta on-line permite conocer las características de los oligonucleótidos diseñados gracias a complejos algoritmos, para así elegir los más adecuados para nuestro ensayo. Además permite conocer la formación de estructuras secundarias como dímeros y horquillas (*hairpins*), y la homología con otras regiones del ADN que restarán especificidad y eficiencia a la amplificación de la región deseada. Los dímeros se forman por unión de un oligonucleótido con otro, ya sea del mismo tipo o el del sentido contrario; mientras que las horquillas se generan al formarse un bucle en su secuencia para unirse consigo mismo. Para un correcto rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa es recomendable evitar la formación de ambas estructuras, ya que restan especificidad a la unión de los oligonucleótidos con el ADN molde.

The screenshot shows the Beacon Designer software interface. At the top, there is a navigation bar with the logo 'Beacon Designer Free Edition' and 'PREMIER Biosoft International'. Below the navigation bar, the 'Name' field is set to 'January 16, 2013' and the 'Description' field is 'Assay Type: SYBR® Green'. The 'Reaction Conditions' section contains a table with the following data:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09

The 'Sense Primer' section shows the sequence 'ATCTCCATGAGCCTCAGTTTC' and a table with the following data:

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
21	54.65	47.62	1	-4.3	-2.4	-1.0

The 'Anti-sense Primer' section shows the sequence 'CGTTTTTGGAGGTGGA' and a table with the following data:

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
18	51.43	50	1	-4.3	0.0	0.0

The 'Secondary Structures for Sense Primer' section shows a 'Dimer' structure with the following sequence:

```

5' ATCTCCATGAGCCTCAGTTTC 3'
      |||| ||||
3' CTTTGACTCCGAGTACTCTA 5'
  
```

At the bottom right of the dimer structure, there is a value '-2.4'.

Figura 20. Visión parcial de la pantalla del Beacon Designer que ofrece las características físico-químicas de los oligonucleótidos analizados. En la parte inferior de la imagen se representa gráficamente uno de los dímeros que se formarían con estos oligonucleótidos.

Cuando fue necesario confirmar la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados se empleó conjuntamente el programa Netprimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html) que igualmente ofrece un análisis de las características físico-químicas de cada oligonucleótido, así como las posibles estructuras secundarias que pueden interferir en la eficiencia de la PCR (figura 21).

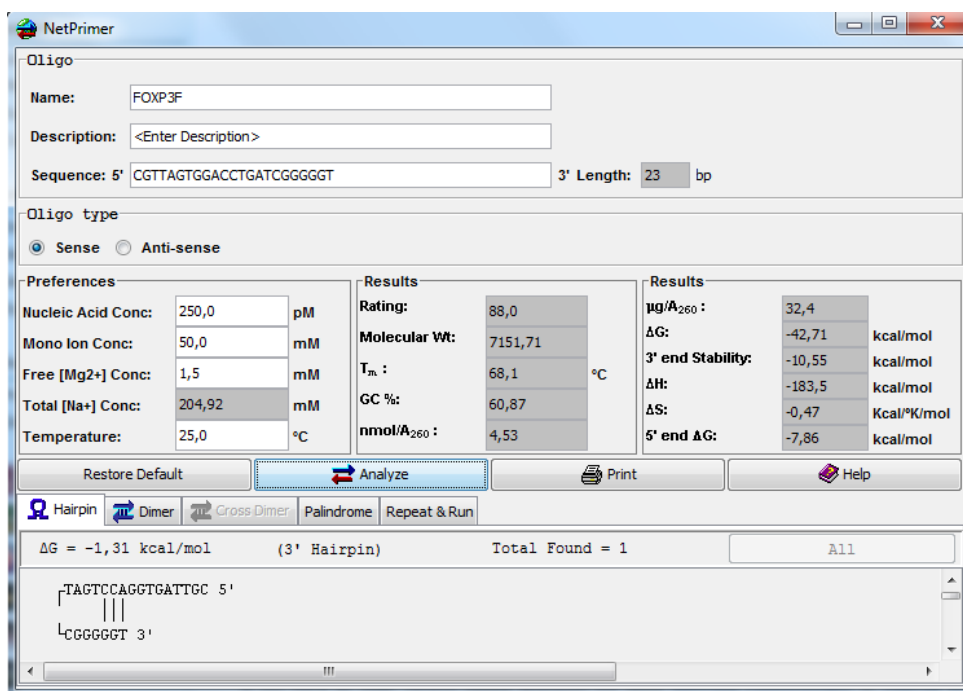


Figura 21. Visión parcial de la pantalla del Netprimer que ofrece las características físico-químicas de los oligonucleótidos analizados. En la parte inferior de la imagen se representa gráficamente uno de los dímeros que se formarían con estos oligonucleótidos.

4.6.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación automática de los productos de PCR purificados se analizaron con el programa Chromas 2.3 (Technelysium. Pty. Ltd. 1998-2004, South Brisbane, Australia). Esta aplicación permite visualizar la secuencia del fragmento de

ADN amplificado y el cromatograma correspondiente (figura 22). 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 codifica por dicha secuencia.

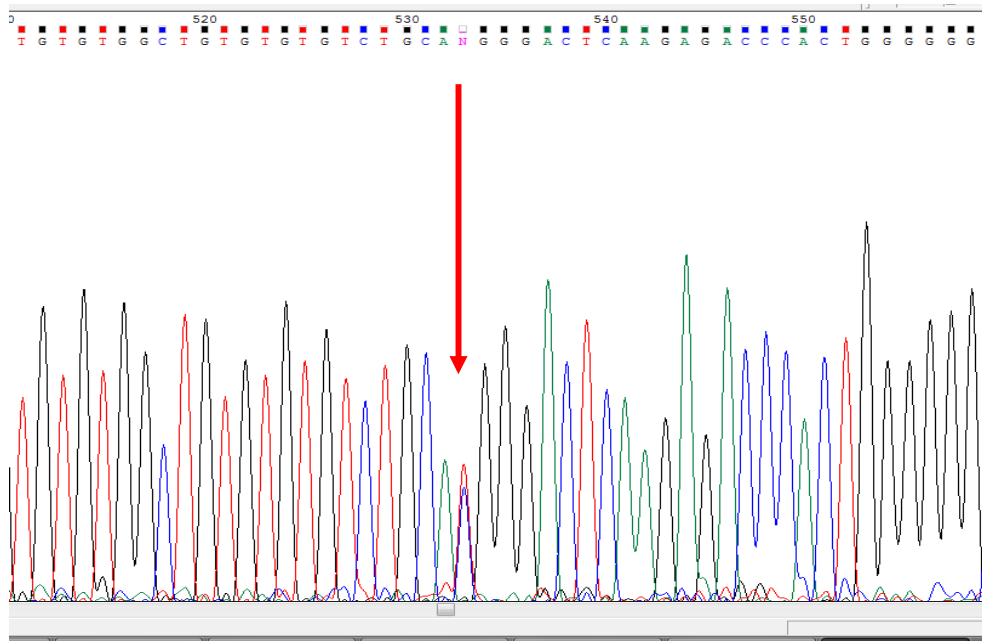


Figura 22. Ejemplo de análisis de Secuenciación con el programa Chromas 2.3, en el que se observa un cromatograma con un polimorfismo en heterocigosis en la posición 533 (señalado con una flecha roja).

Una vez analizadas las secuencias, se introdujeron en el programa VectorNTI 10.3.0© 2006 Invitrogén Corporation (Carlsbad, California, EE.UU.), para poder compararlas, o alinearlas, con la secuencia genómica de referencia depositada en la base de datos del OMIM para el gen *FOXP3*, y así poder determinar la existencia de posibles variantes génicas (figura 23).

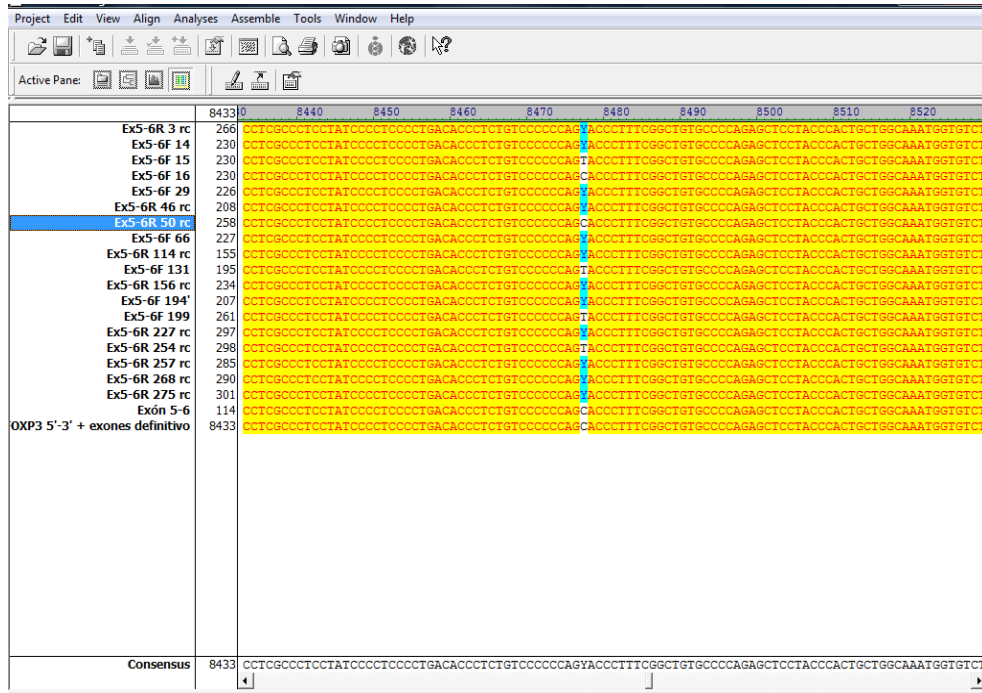


Figura 23. Visión de un alineamiento de varias secuencias de pacientes con la secuencia genómica (última secuencia). Se observa un polimorfismo en posición 8478 en homocigosis (T) o heterocigosis (Y) en algunos pacientes (C en secuencia de referencia).

4.6.4. BÚSQUEDA DE LOS POLIMORFISMOS

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

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 (“single nucleotide polymorphisms” o SNP) y de múltiples variaciones que incluyen inserciones/delecciones, microsátelites y variantes no polimórficas.

Al buscar información sobre los SNP descritos en el gen *FOXP3*, nos muestra una página en la que se nombran todos ellos (figura 24), y desde la cual se puede acceder a información concreta de cada polimorfismo, como la localización cromosómica, la frecuencia alélica, la relevancia clínica, entre otras.

The screenshot displays the NCBI dbSNP search results for the query 'foxp3'. The search is filtered for 'Human (active) (201)'. The results list three SNPs:

- rs201928852 [Homo sapiens]**: Sequence AACCACATCCCGTCTCCCAAT [A/G] TGCCATGAGCCAGACCCAGGCT. HGVS Names include NC_000023.10:g:49168326>A and NM_001143777.1:c:1041+80C>T.
- rs201723322 [Homo sapiens]**: Sequence CCACGGTCCACACAGCCCCCTTCTC [A/G] CTCCTCCACCCGACAAAGCACTTGT. HGVS Names include NC_000023.10:g:49107091G>A and NM_001143777.1:c:1095C>T.
- rs201474125 [Homo sapiens]**: Sequence GTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAGA [A/G] AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA.

The interface also shows a 'Filter your results' section with 'All (226)' selected, and a 'Search details' section showing the query: 'foxp3[All Fields] AND "Homo sapiens"[Organism]'.

Figura 24. Visión parcial del resultado de la búsqueda en el NCBI de los polimorfismos del gen *FOXP3* en humanos.

4.6.5. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS

Se procedió a la determinación de las frecuencias alélicas de los polimorfismos encontrados y a su comparación con las descritas para esos polimorfismos en otras poblaciones empleando las bases disponibles (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) y la plataforma estadística on-line SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) (96, 97).

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 (figura 25).

The screenshot shows the SHEsis web interface with the following configuration:

- Choose the analysis you need: Single site analysis, Pair-loci D'/r2 value, Haplotype analysis
- Number of sites: 13
- Selected sites for haplotype analysis: 11111111
- Calculate linkage disequilibrium in: Both case and control
- Lowest frequency threshold (LFT) for haplotype analysis: 0.01
- Marker names (please use space to split variation names):

Input data of control:

1.	A	A	G	G	C	C	G	G
2.	A	A	G	G	C	C	G	G
3.	A	A	G	G	C	C	G	G
4.	A	A	G	G	C	C	G	G
5.	A	A	G	G	C	C	G	G
6.	A	A	G	G	C	C	G	G
7.	A	A	G	G	C	C	G	G
8.	A	A	G	G	C	C	G	G
9.	A	A	G	G	C	C	G	G
10.	A	A	G	G	C	T	G	G
11.	A	A	G	G	C	C	G	G
12.	A	A	G	G	C	C	G	G
13.	A	A	G	G	C	C	G	G
14.	A	A	G	G	C	C	G	G
15.	A	A	G	G	C	C	G	G

Caution: The format of input data should be --
 ID1 G A 1 1 a b ...
 ID2 A G 1 2 b b ...
 ID3 G G 1 1 c c ...

 Here, the first column refers to the sample ID; the second & third

Input data of case:

1.	A	A	G	G	C	C	G	G
2.	A	A	G	G	C	C	G	G
3.	A	A	G	G	C	C	G	G
4.	A	A	G	G	C	C	G	G
5.	A	A	G	G	C	C	G	G
6.	A	A	G	G	C	C	G	G
7.	A	A	G	G	C	C	G	G
8.	A	A	G	G	C	C	G	G
9.	A	A	G	G	C	C	G	G
10.	A	A	G	G	C	C	G	G
11.	A	A	G	G	C	C	G	G
12.	A	A	G	G	C	C	G	G
13.	A	A	G	G	C	C	G	G
14.	A	A	G	G	C	C	G	G
15.	A	A	G	G	C	T	G	G

Figura 25. 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 la que se introducen los resultados de la secuenciación de los grupos de controles y pacientes (*case*).

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.

Para el estudio de Haplotipos se empleó los algoritmos Clark's, EM y Pseudo Gibbs, en los cálculos probabilísticos de combinaciones Haplotípicas. Se analizaron las frecuencias de las distintas variantes génicas en los grupos fenotípicos y se aplicaron las pruebas estadísticas χ^2 ,

prueba exacta de Fisher, prueba de Monte Carlo con 10^4 simulaciones y OR con intervalo de confianza al 95%.

4.6.6. PREDICCIÓN PROTEICA

Se realizó una predicción proteica mediante la plataforma ExpASy.

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.

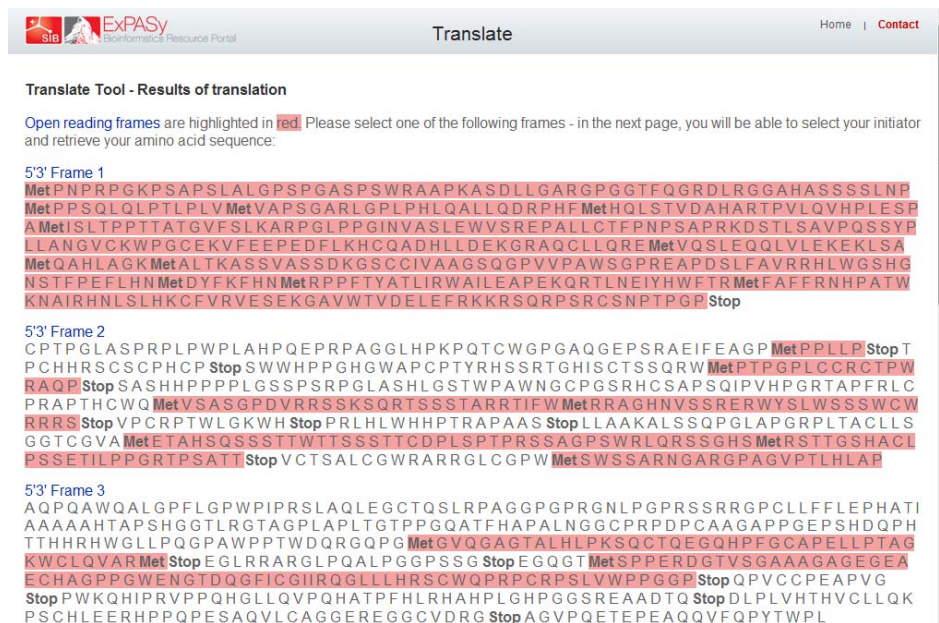


Figura 26. Visión parcial de la pantalla del ExpASy que muestra los péptidos/proteínas que se obtendrían (en rosa) según los posibles marcos de lectura en sentido 5'-3'. La primera secuencia de aminoácidos correspondería a la proteína codificada por la secuencia de referencia de *FOXP3*.

Entre todos los recursos que proporciona, existe la opción de determinar, a partir de una secuencia de ADN codificante, la secuencia de aminoácidos de una proteína. Así, pudimos conocer la secuencia de nuestra proteína silvestre y hacer una predicción de la proteína que se obtendría al modificar la secuencia base con cada uno de los polimorfismos en región exónica encontrados (figura 26 y 27). Además, ofrece información sobre los motivos funcionales a partir de la secuencia de la proteína.

ExPASy
Bioinformatics Resource Portal

PROSITE Home | Contact

Home ScanProsite ProRule Documents Downloads Links Funding

prosite ScanProsite Results Viewer

This view shows ScanProsite results together with ProRule-based predicted intra-domain features ([help](#)).

[show hits of frequently occurring signatures](#)

Hits for all PROSITE (release 20.89) motifs on sequence USERSEQ1 :

found: 25 hits in 1 sequence

USERSEQ1 (431 aa)

```

MENFRFGKPSAPSLALGFPSPGASPSWRAAFKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSLNFMFP
SQLQLPTLELVMVAPSGARLGLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLT
PPTATGVSFLKARGLPEGINVASLEWVSREFALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGV
CKWFGCEKVFEEFELKRCQADHLLDEKGRACQLLQREMVQSLQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKM
ALTKASVVASSDKSCCIVANGSQGFVFAWSGFREAFPSLFAVRRRLWGSNGSTFPFLRWMDI
FKFHMRFPTATLIRNRITLSEPEKQSLMEIYDWFETMFAFFRHHFATRWDAIRMLSLKCFV
RVESEKGVWTVDELEFRKRSQRPSKCSNPTPGF
  
```

ruler: 1 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000

hits by profiles: [1 hit (by 1 profile) on 1 sequence]

Hits by PS50039 FORK_HEAD_3 Fork head domain profile :

USERSEQ1 (431 aa)

Figura 27. Visión parcial de la pantalla del ExPASy que muestra la secuencia proteica, señalando la que forma el dominio Forkhead (arriba), y la representación gráfica de este motivo funcional (abajo).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. ESTVDIO DESCRIPTIVO

En el estudio se incluyeron 255 individuos, 95 eran controles y 160 pacientes. El grupo control estaba constituido por 95 individuos de raza caucásica en el que se observaba un 43,2% de varones y un 56,8% de mujeres, de edades comprendidas entre 25 y 86 años, con una media de edad de 53,7 años y desviación típica de 16,9 años. El grupo de pacientes estaba formado por 89 varones (55,6%) y 71 mujeres (44,4%). La distribución por edades fue de 0,6% lactantes (definido como menor de 2 años), 22,5% preescolares (de 2 a 6 años), 53,1% escolares (de 6 a 12 años) y 23,8% adolescentes (de 12 a 18 años). La edad media era de 8,6 años, con una desviación típica de 3,9 años.

Este grupo se encontraba constituido por 76 niños con atopia (47,5%), 72 con enfermedades autoinmunes (45%) y 12 que presentaban ambas condiciones (7,5%), en el que se incluía un paciente con IPEX-like (figura 28).

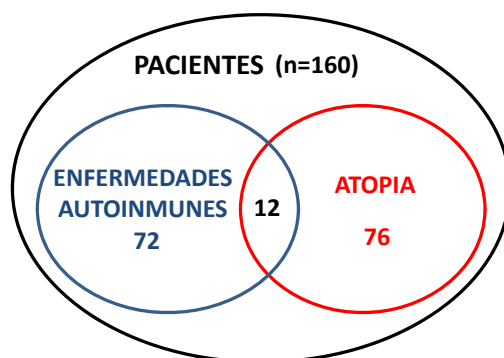


Figura 28. Distribución de los pacientes en el estudio.

5.1.1. PACIENTES CON ENFERMEDAD AUTOINMUNE

Este subgrupo de pacientes estaba constituido por 72 niños que presentaban enfermedad autoinmune, con una edad media de 8,7 años y una desviación típica de 4 años, de los cuales un 34,7 % eran varones (figura 29 y tabla 7).

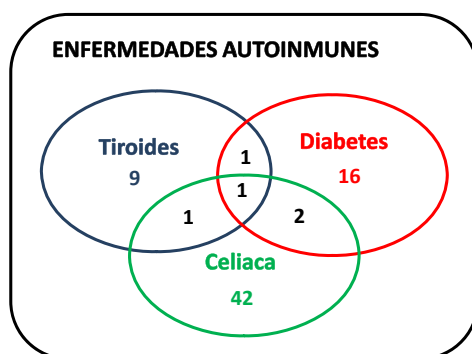


Figura 29. Distribución de los pacientes con enfermedad autoinmune.

Tabla 7. Características demográficas de los pacientes con enfermedad autoinmune.

	Nº total de pacientes	Varones/ mujeres (%)	Edad media +/- desviación típica (años)	Edad media +/- desviación típica al diagnóstico (años)
Diabetes mellitus	20	35 / 65	9,6 +/- 3,7	7,2 +/- 3,4
Patología tiroidea	12	8,3 / 91,7	12,2 +/- 3	9,7 +/- 2,8
Enfermedad celiaca	46	41,3 / 58,7	7,7 +/- 3,8	3,1 +/- 3

Se recogieron además otros datos de interés como son los antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes y de enfermedades alérgicas. En cuanto a los antecedentes de patología autoinmune en los familiares de primer grado (padres, hermanos y/o hijos) cabe destacar que el 31,9% de los pacientes tenía un familiar afectado. Los datos se detallan en la figura 30.

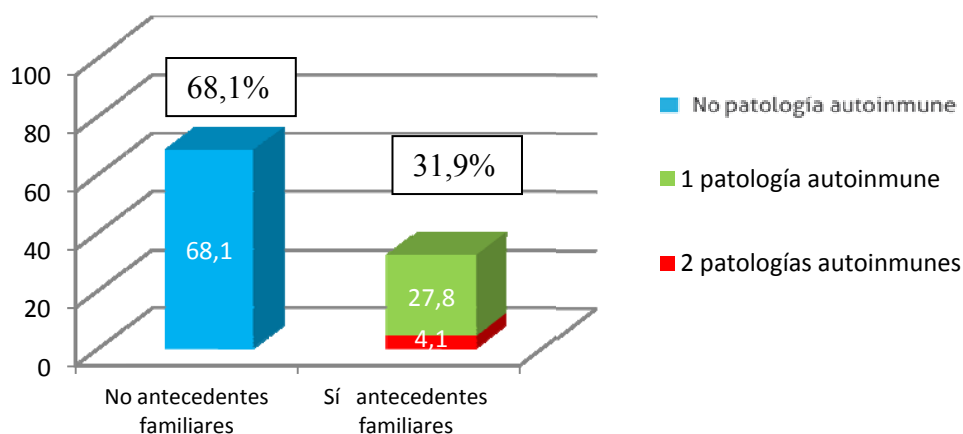


Figura 30. Antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes en los pacientes con enfermedad autoinmune.

En relación con los antecedentes obstétricos, la mayoría de los pacientes presentó un embarazo normal (82,9%) con una edad gestacional a término en el 85,5% de ellos. El parto fue eutócico hasta en el 70,6% de los casos. La mayoría presentó un Apgar superior a 7 al minuto de vida. Sólo presentó distrés respiratorio el 2,9%, aunque ningún paciente precisó ventilación mecánica. Los antecedentes obstétricos y perinatales de estos pacientes se representan en la figura 31.

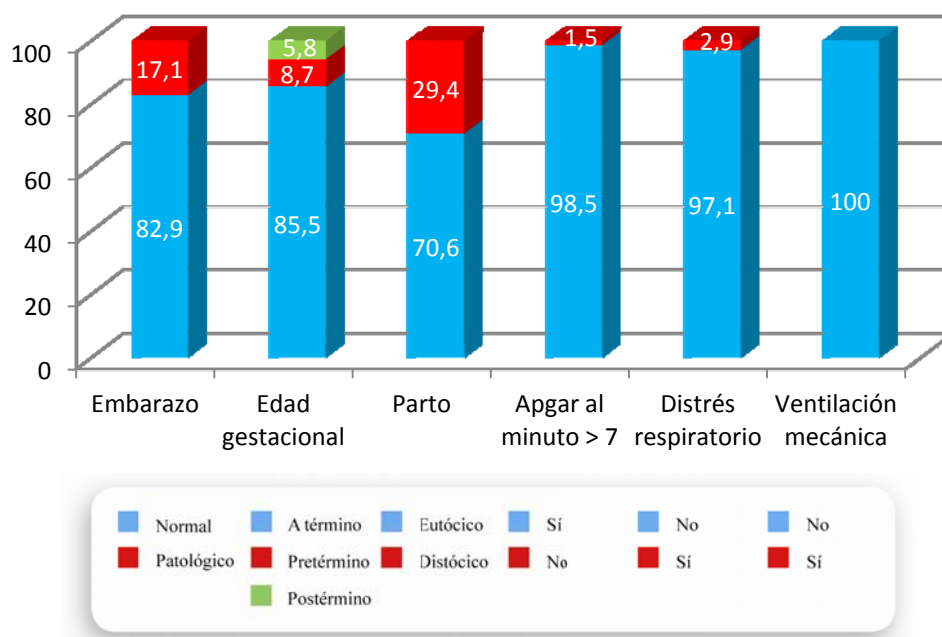


Figura 31. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con patología autoinmune.

Se recogió información sobre otros aspectos de interés, como el tipo de lactancia que habían recibido, la asistencia a guardería y el hábito tabáquico de los padres. Los resultados se detallan en la figura 32.

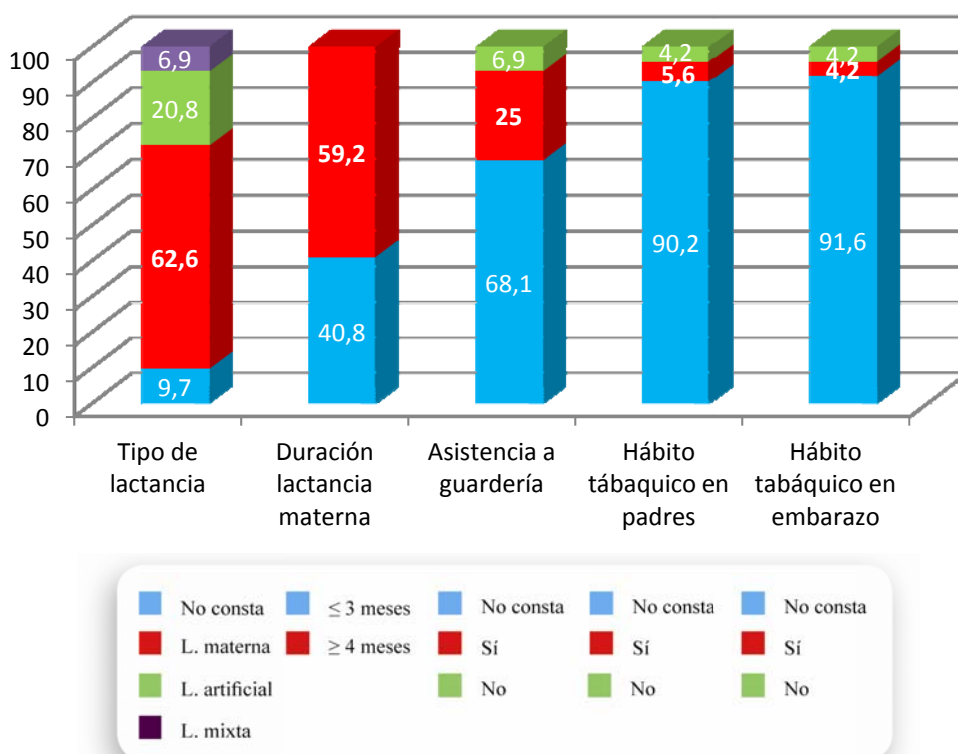


Figura 32. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con patología autoinmune.

5.1.2. PACIENTES CON ATOPIA

En el grupo de pacientes con atopia se incluyeron un total de 76 individuos, con una edad media de 8,2 años y una desviación estándar de 3,6 años, de los cuales el 76,3% eran varones.

El estudio alergológico mostró que la mayoría estaban sensibilizados a pólenes y epitelios (93,4% y 67,1%, respectivamente), recogiendo en la figura 33 todas las sensibilizaciones de estos pacientes.

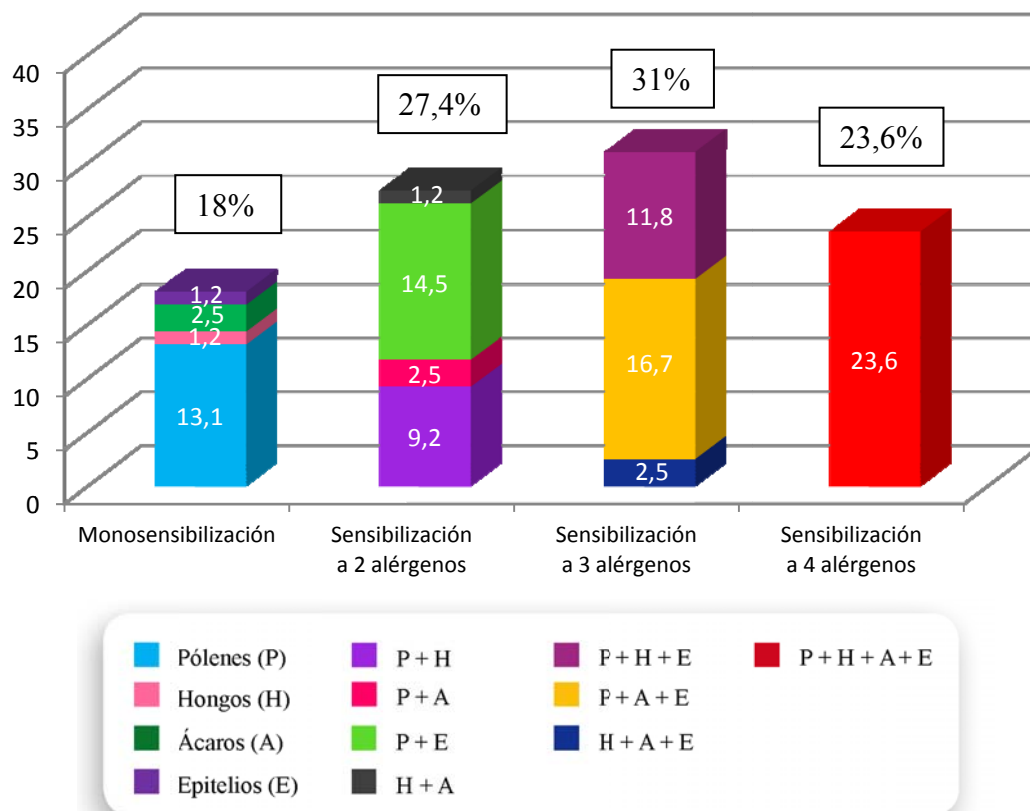


Figura 33. Sensibilización en los pacientes con atopia.

En cuanto a la clínica respiratoria, se observó que el 96,1% sufría asma y el 88,2% padecía rinitis. Además, el 89,5% presentaba dermatitis atópica. La combinación de estas patologías se representa en la figura 34.

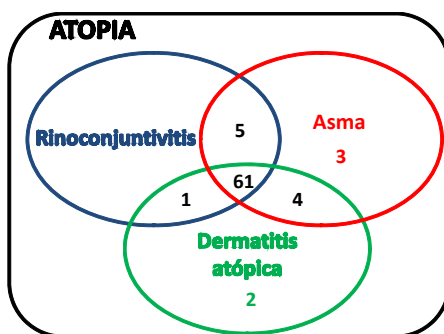


Figura 34. Clínica alérgica de los pacientes con atopia.

En relación a los niveles de IgE total, los pacientes presentaban una media del \log_{10} IgE de 2,08, con una desviación típica de 0,71. El grupo control presentaba una media del logaritmo en base 10 de la IgE total (\log_{10} IgE) de 1,57, con una desviación típica de 0,56.

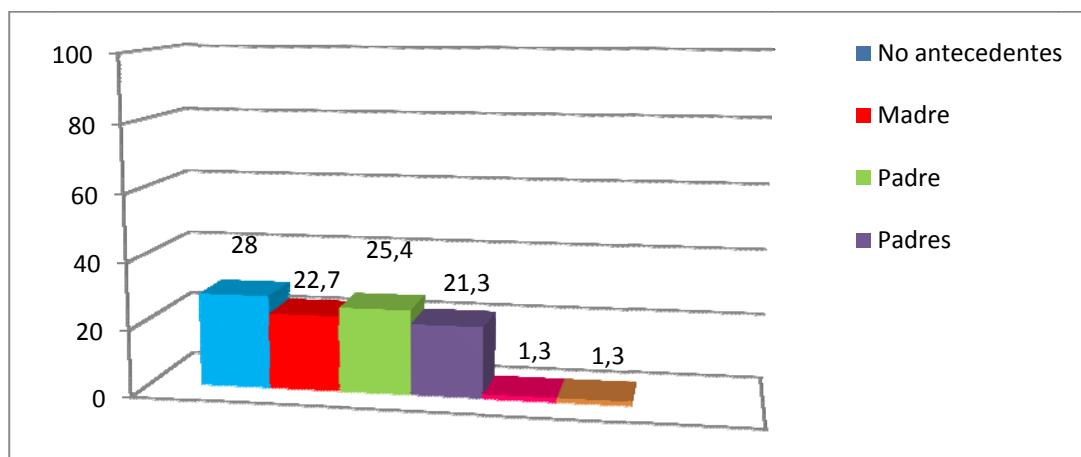


Figura 35. Antecedentes familiares de atopia en pacientes con atopia (expresado en porcentajes).

En cuanto a los antecedentes familiares de atopia, el 72% de los pacientes tenía algún familiar de primer grado que presentaba atopia. Sin embargo, cabe destacar que aunque un gran porcentaje de pacientes tenía antecedentes familiares de atopia, sólo el 17,3% presentaba antecedentes de asma. En cuanto al familiar que presentaba la predisposición, en las figuras 35 y 36 se muestra la distribución.

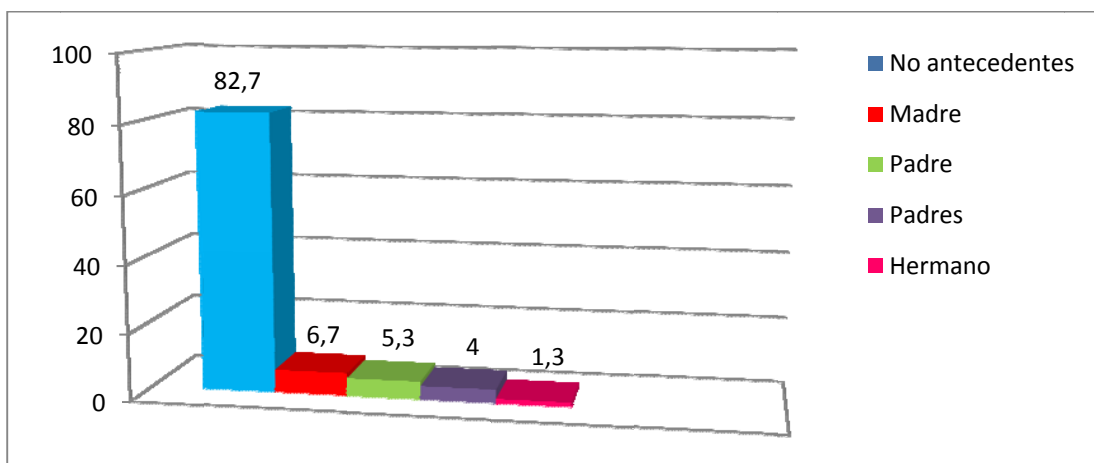


Figura 36. Antecedentes familiares de asma en pacientes con atopia (expresado en porcentajes).

En relación con los antecedentes obstétricos y perinatales, el 76,3% de los pacientes presentó un curso del embarazo normal, fue a término en el 92,1% de los casos, y con un parto eutócico en el 64,5%. El 94,7% mostró un Apgar superior a 7 al minuto y presentó distrés respiratorio el 5,3%. Únicamente el 2,6% precisó ventilación mecánica. Estos antecedentes se representan en la figura 37.

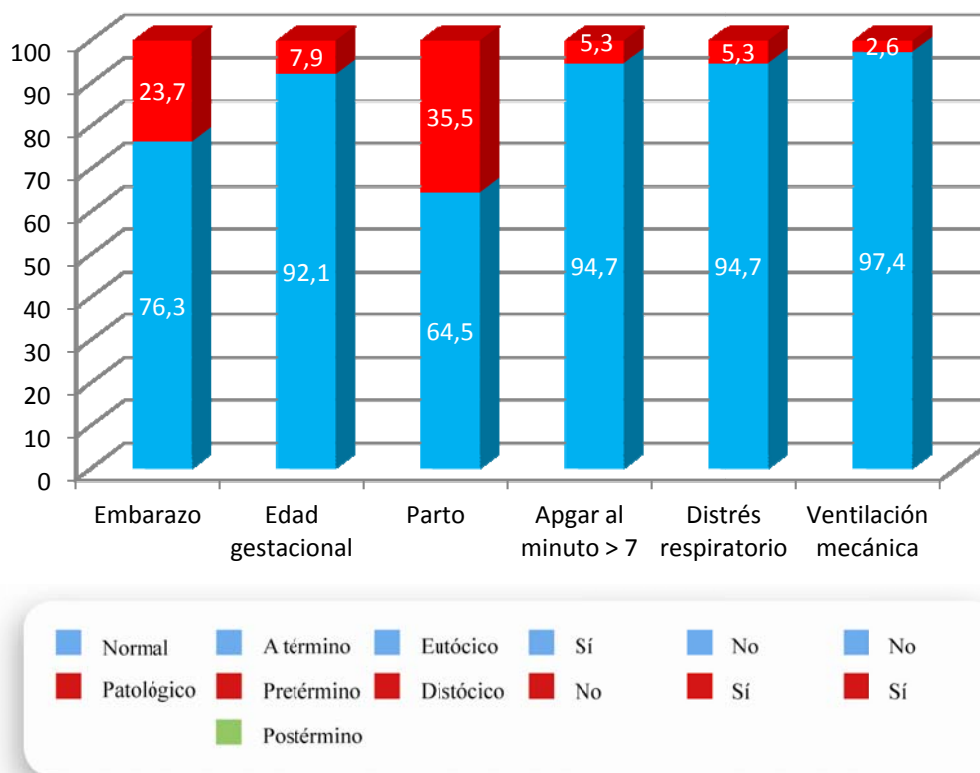


Figura 37. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con atopia.

Se anotaron también otros antecedentes personales relacionados con los primeros meses de vida y el ambiente tabáquico de estos pacientes, que quedan reflejados en la figura 38.

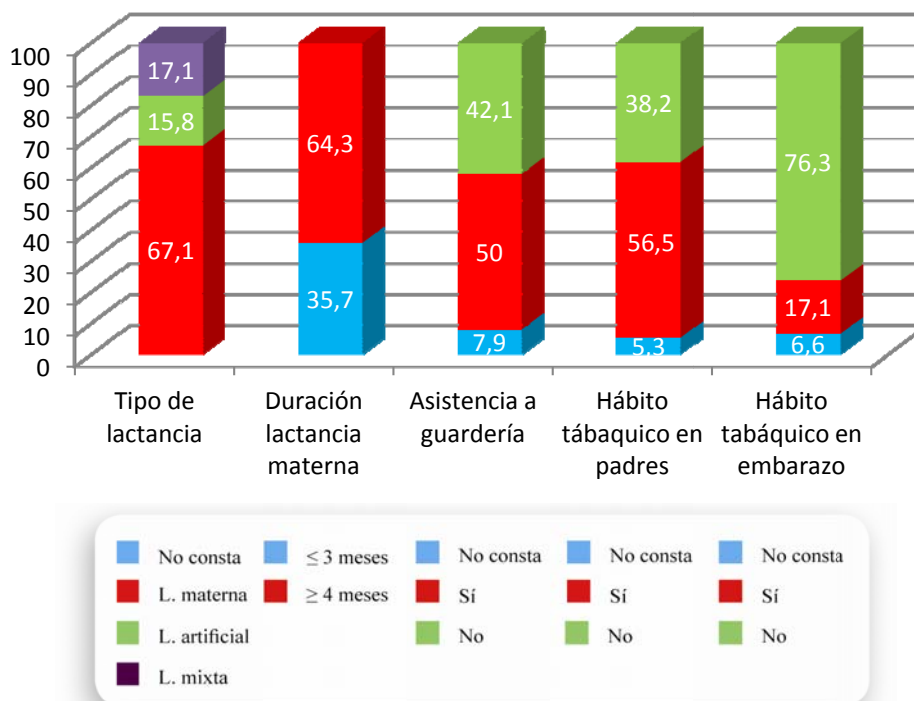
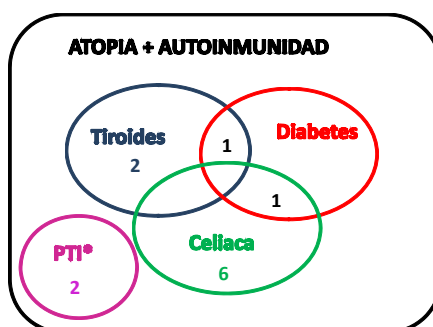


Figura 38. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con atopia.

5.1.3. PACIENTES CON ATOPIA Y AUTOINMUNIDAD

Este subgrupo estaba formado por 12 pacientes que presentaban enfermedad autoinmune y además pruebas cutáneas positivas (figura 39). Se observó igual número de varones que de mujeres. La edad media fue de 10 años, con una desviación típica de 4,3 años.



*Trombocitopenia inmune primaria

Figura 39. Distribución de los pacientes con enfermedad autoinmune y atopia.

El tipo de enfermedad autoinmune que presentaba cada paciente se muestra en la figura 39.

Según la sensibilización, la mayoría de los pacientes estaban sensibilizados a pólenes (90,9%) seguido de epitelios (54,5%). La combinación de aeroalérgenos se distribuyó como se muestra en la figura 40.

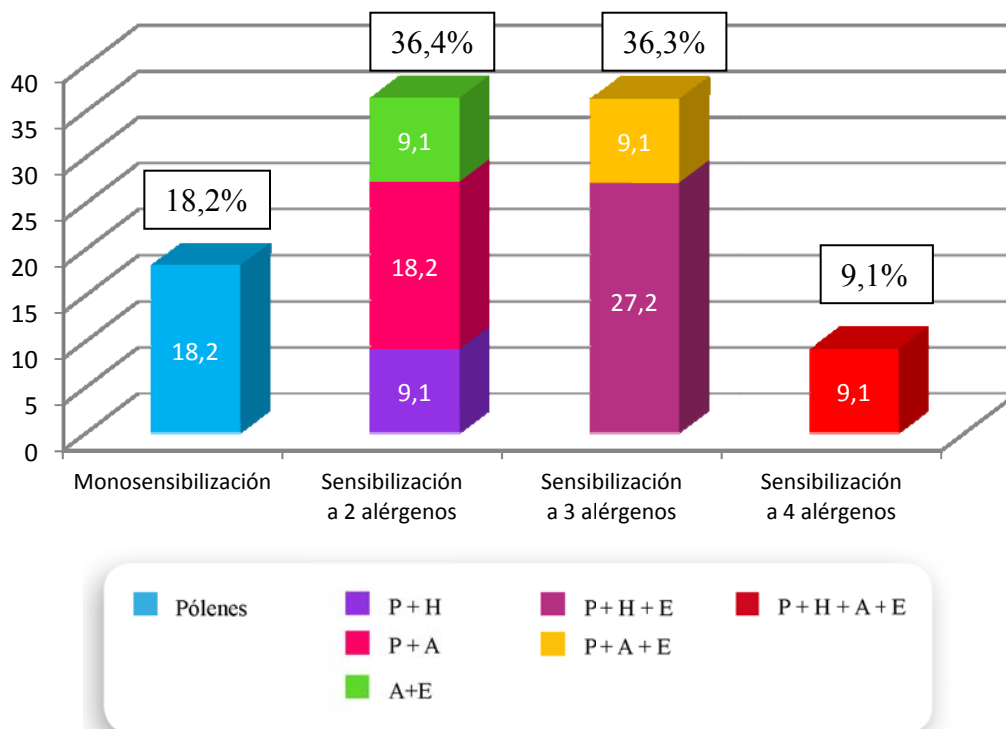


Figura 40. Sensibilización en los pacientes con atopia y autoinmunidad.

En cuanto a la clínica respiratoria, se muestra la distribución en la figura 41.

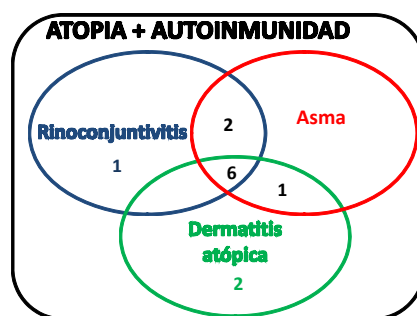


Figura 41. Clínica alérgica de los pacientes con atopia y autoinmunidad.

Se determinó el nivel de IgE total en el 75% de los pacientes, y presentaban una media del \log_{10} IgE de 2,49, con una desviación típica de 0,63.

De los pacientes que se recogió los antecedentes familiares, el 41,7% de los pacientes tenía antecedentes familiares de primer grado de una o más enfermedades autoinmunes (diabetes mellitus, tiroiditis autoinmune, celiaquía, lupus eritematoso sistémico o síndrome de sjögren) y el 75%, antecedentes de atopia, aunque solamente el 25% tenía algún familiar afecto de asma.

En referencia a los antecedentes obstétricos y perinatales, el 90,9% tuvo un embarazo normal, y a término y con parto eutócito el 63,6%. Todos tuvieron un Apgar mayor de 7 al minuto de vida y ninguno presentó distrés respiratorio, aunque el 9,1% precisó ventilación mecánica. El 50% recibió lactancia materna durante más de 3 meses (figuras 42 y 43).

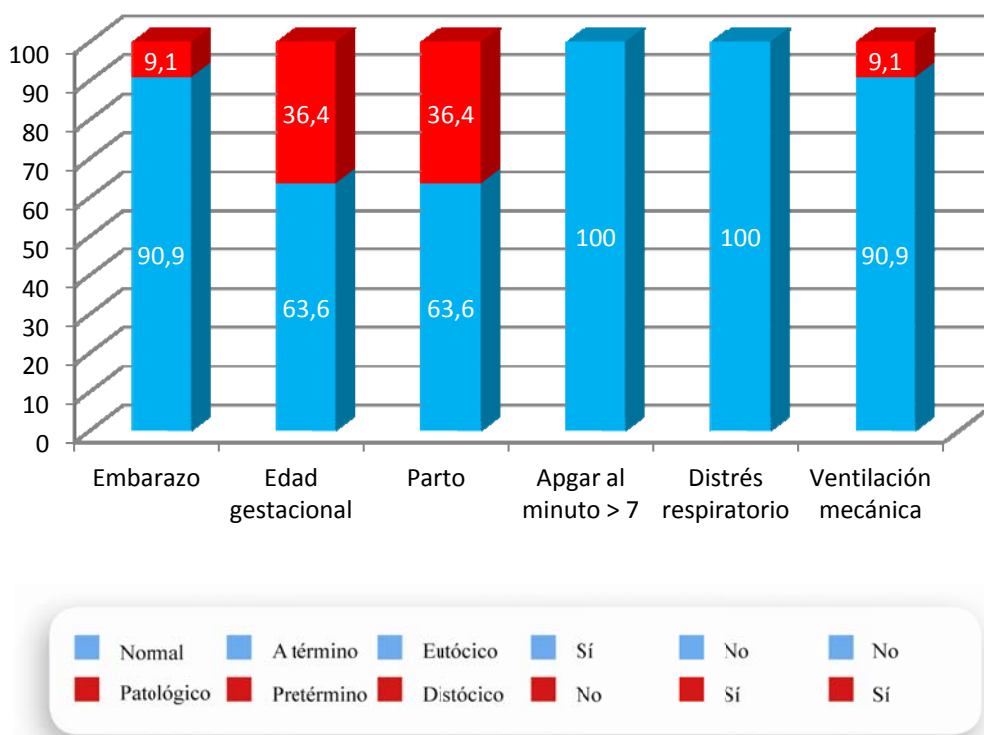


Figura 42. Antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con atopia y autoinmunidad.

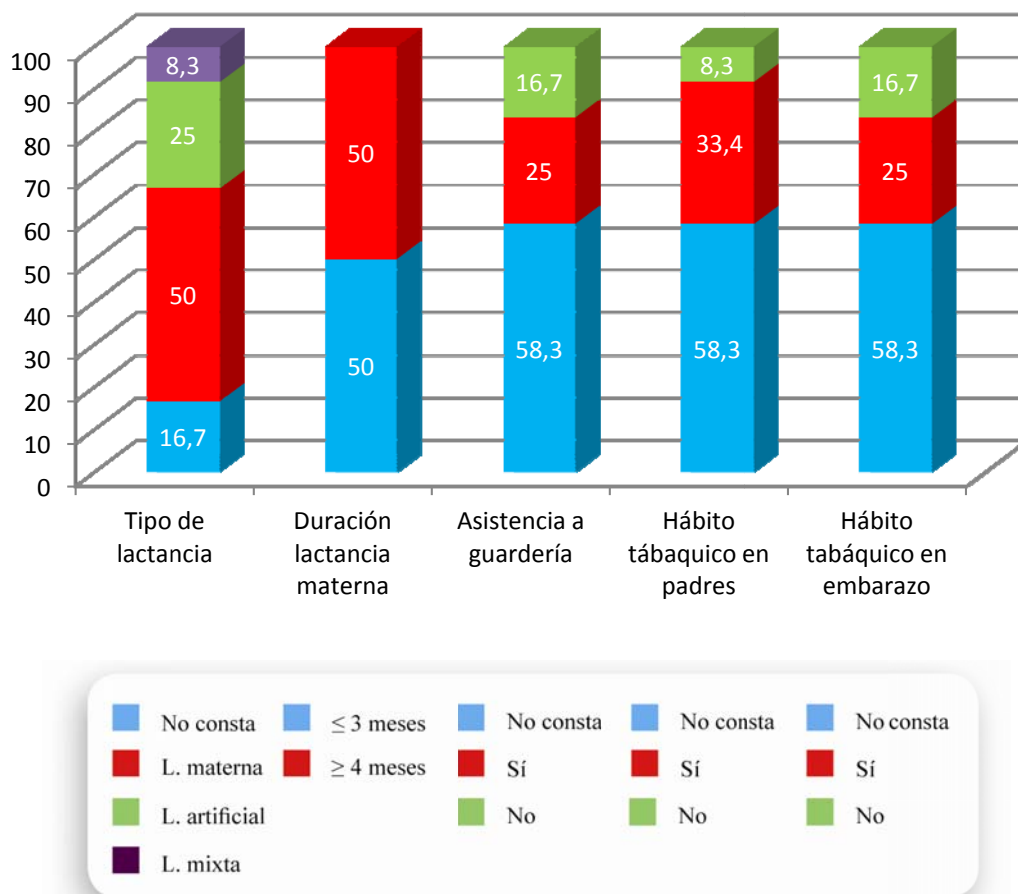


Figura 43. Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental de los pacientes con atopia y autoinmunidad.

5.1.4. IPEX-LIKE

En este estudio se incluyó un varón de 7 años caucásico que presentaba IPEX-like.

Con relación a los antecedentes personales se constató que el embarazo fue patológico, pues se detectó un crecimiento intrauterino retrasado (CIR) en el segundo trimestre, y se programó una cesárea a las 34 semanas de edad gestacional por sospecha de pérdida de bienestar fetal. No obstante, nació vigoroso, sin precisar reanimación, y recibió un Apgar 9/10. Asimismo, no presentó distrés respiratorio tras el nacimiento, pero sí tuvo que ingresar por la prematuridad y

acabó siendo ventilado mecánicamente. A los 21 días de vida fue hospitalizado nuevamente por una enterocolitis necrotizante y una sepsis secundaria. Durante el ingreso presentó además hiperbilirrubinemia no conjugada, anemia, eosinofilia, diarrea, hernia umbilical, dermatitis seborreica y eritrodermia descamativa de Leiner.

A los 5 meses ingresó en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos por debut diabético con cetoacidosis. Además se detectó hipotiroidismo autoinmune, iniciando tratamiento hormonal sustitutivo, y presentó un cuadro de diarreas. Como complicaciones, presentó cuadro compatible con shock séptico por *Staphylococcus aureus* e infección del tracto urinario por *Escherichia coli*. Ante la sospecha de IPEX (presencia de DM tipo 1, hipotiroidismo, diarrea, dermatitis e infecciones graves), se realizó estudio inmunológico y genético. Dentro del primer estudio se determinaron los niveles de inmunoglobulinas, que fueron normales para la edad del paciente, estudio del complemento, que también fue normal, y subpoblaciones linfocitarias, donde se observó la cifra de linfocitos B muy disminuida. Dentro del análisis genético se realizó un estudio de mutaciones del gen *FOXP3*, que fue negativo, y estudio de la proteína BTK, que resultó normal. Como no se halló mutación en el gen, pero el cuadro clínico sugería el diagnóstico de IPEX, no se le catalogó como tal, sino de IPEX-like.

Al año de vida se le realiza biopsia intestinal de colon descendente, donde se observa escasa infiltración linfocitaria con linfocitos CD3CD8⁺. Ingresa nuevamente al año y medio de edad por cuadro de diarrea crónica de 3 meses de evolución e infección del Port-a-Cath por estafilococo coagulasa negativo. Se realiza en esta ocasión estudio de médula ósea, donde se observa stop madurativo en LB en fase pre-B2.

Desde el punto de vista cardiológico, fue diagnosticado a los 2 años de edad de extrasístoles ventriculares frecuentes, por lo que precisa tratamiento con Propranolol desde los 5 años y medio. El ecocardiograma realizado fue normal.

A los 4 años, se le diagnosticó además de potomanía, alopecia universal e hipogammaglobulinemia, por lo que precisa infusión de gammaglobulinas endovenosas cada 21 días desde entonces. También se inició tratamiento sustitutivo con hormona de crecimiento por déficit de GH, que tuvo que ser suspendido al año por falta de respuesta. Además se realizó resonancia magnética nuclear cerebral donde se objetivó microcefalia vera con disminución de circunvoluciones e hipogenesia de cuerpo calloso. En el electroencefalograma que se le practicó se vio un trazado anormal, con actividad de base en vigilia escasamente estructurada en relación a la edad del paciente.

El paciente no ha presentado asma ni rinoconjuntivitis alérgica. No consta en la historia clínica si se le ha realizado pruebas cutáneas a aeroalérgenos y/o alimentos, ni si se ha determinado la IgE total, porque es seguido clínicamente en su ciudad de origen, y sólo realiza los seguimientos por el Endocrinólogo Infantil en el Hospital Universitario de Salamanca.

En su historia tampoco figura si recibió lactancia artificial o materna, si la madre fumó en el embarazo o si fuman los padres, ni tampoco si fue a la guardería.

No presenta antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes ni alérgicas. Sin embargo, cabe destacar que dos tías maternas fallecieron de lactantes debido a una sepsis.

5.2. ANÁLISIS BIVARIANTE

Se han realizado estudios de asociación en tres niveles distintos, en relación con los datos demográficos, clínicos, antecedentes personales (obstétricos, perinatales y socio-ambientales) y antecedentes familiares.

5.2.1. GRUPO GLOBAL

En el conjunto global de los pacientes estudiados, al analizar los antecedentes obstétricos se encontró, como era de esperar, una asociación entre el curso del embarazo y la edad gestacional ($p = 0,004$), observando que cuando el curso fue normal hubo más partos a término (91,3%). De la misma manera, también se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el curso del embarazo y el tipo de parto, $p = 0,004$, OR [IC 95%] = 3,5 [1,5-7,9], observando más partos eutócicos cuando no aparecieron incidencias durante el embarazo (72,8% vs 56,7%). También se observó relación entre la edad gestacional y el tipo de lactancia ($p = 0,011$), pues se detectaron más casos de lo esperado de niños a término con lactancia materna (70,7% vs 17,3%), mientras que ocurrió lo contrario en los nacidos pretérmino (28,6% alimentados al pecho y 50% con fórmula artificial) (figura 44). No se encontró asociación en los niños posttérmino. Igualmente se observó una asociación significativa entre haber presentado un Apgar inferior a 7 al minuto y haber tenido distrés respiratorio posterior, $p = 0,012$, OR = 24,33 [3,14-188,35], (40% vs 2,7%). Finalmente, se halló relación entre el tipo de lactancia y haber presentado distrés respiratorio ($p = 0,018$). La mayoría de los niños con lactancia mixta había presentado distrés respiratorio (50% vs 11%) (figura 45). Estas asociaciones, muchas de ellas

esperadas desde el punto de vista pediátrico, constituyen un control estadístico de la muestra de nuestro estudio.

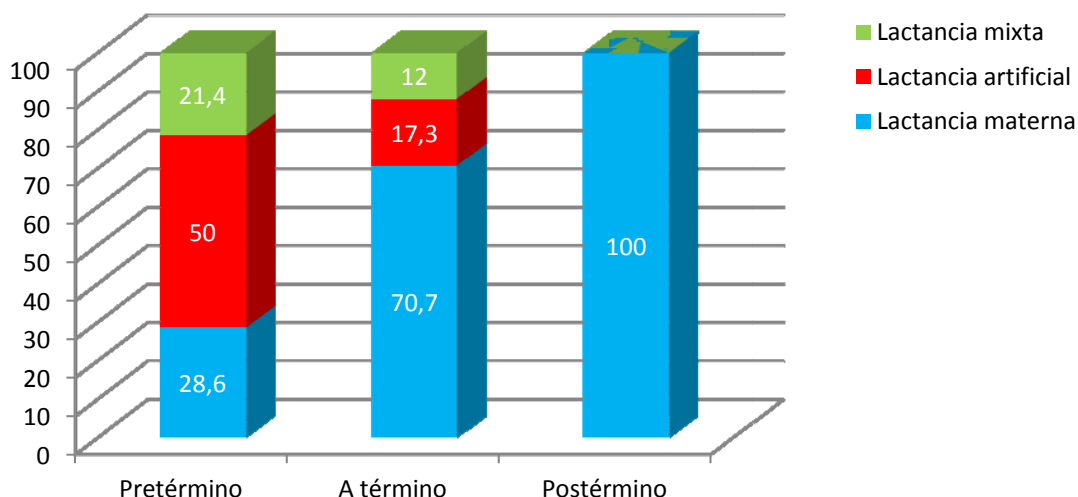


Figura 44. Tipo de lactancia (en porcentajes) según la edad gestacional en el grupo global de pacientes.

En relación a los factores de riesgo ambiental, se detectó que los pacientes que no fueron a la guardería presentaban una mayor presencia de asma (87,2%) frente a los que acudieron a la guardería (64%), $p = 0,018$, $OR = 0,27 [0,09-0,78]$.

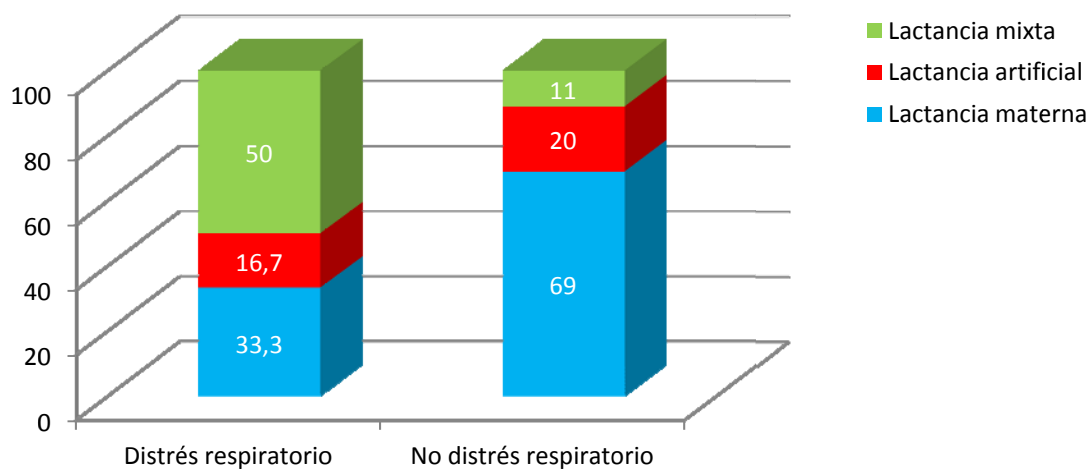


Figura 45. Tipo de lactancia (en porcentaje) según la presencia de distrés respiratorio en el grupo global de pacientes.

Cuando analizamos la distribución del sexo y edad en los tres principales grupos de pacientes (pacientes con enfermedad autoinmune, con atopia y con ambas patologías), vimos que existía una asociación estadísticamente significativa entre el grupo al que pertenece el paciente y el sexo ($p < 0,001$), observándose más pacientes de sexo masculino en el grupo de atopia (76,3%), respecto al grupo de autoinmunidad (34,7%). En cambio, la distribución de edad en ambos grupos fue similar (figuras 46 y 47).

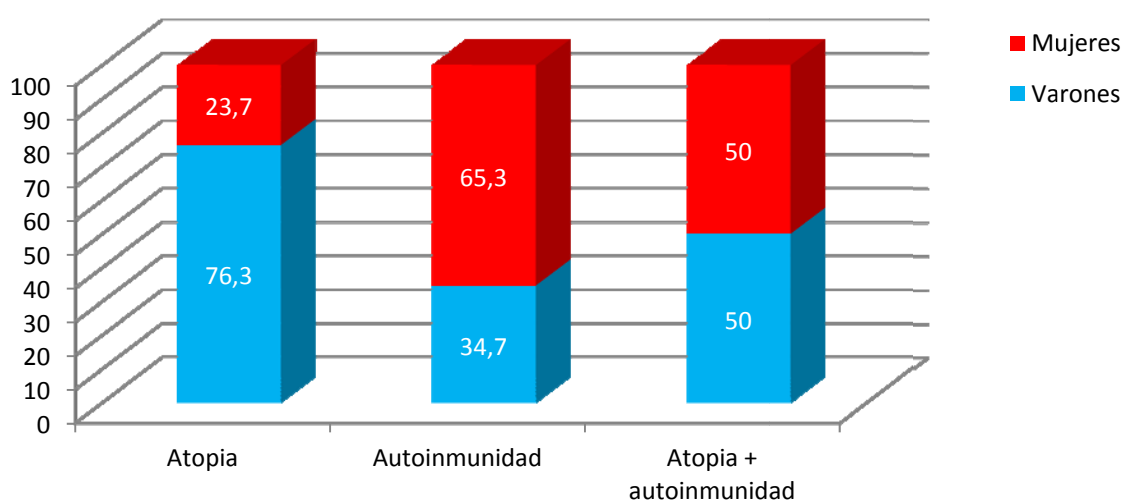


Figura 46. Distribución por sexo (en porcentajes) en los grupos de pacientes.

En relación con las variables clínicas recogidas, se obtuvo, como era de esperar, una relación significativa entre la presencia de asma con el grupo de atopia ($p < 0,001$). No se observó asma en ningún paciente con enfermedad autoinmune. También hubo asociación con la presencia de dermatitis atópica ($p < 0,001$), observando más niños con esta dermopatía en los atópicos (89,5%) que en el grupo de pacientes con enfermedad autoinmune (41,7%).

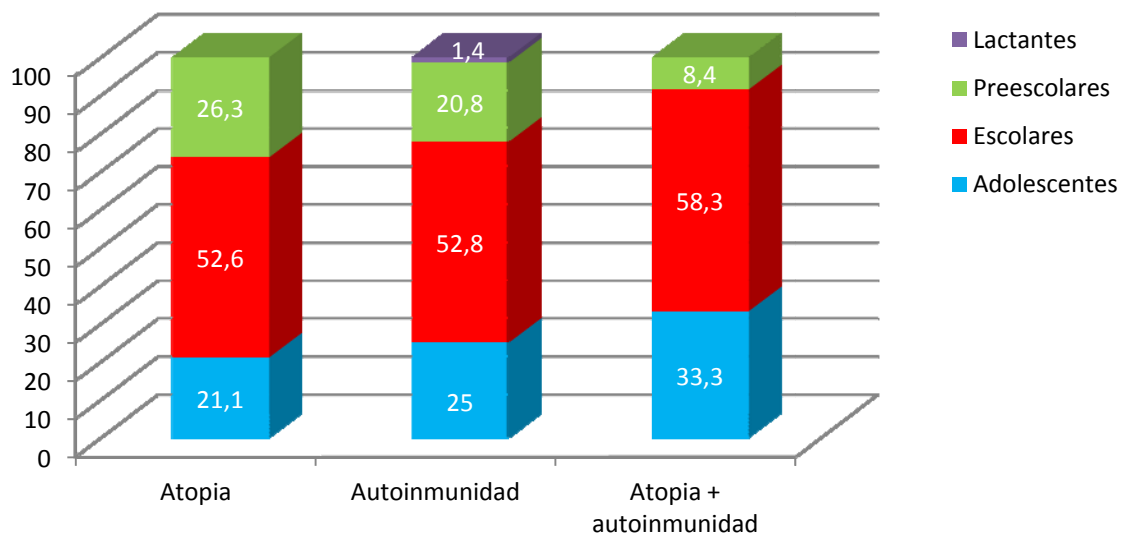


Figura 47. Distribución por edad (en porcentajes) de los grupos de pacientes.

Del mismo modo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgE, con un aumento de éstos en el grupo de atopia ($p < 0,01$) y en el grupo de atopia y autoinmunidad ($p < 0,01$), respecto el control (representadas en la figura 48). No se observaron diferencias significativas entre el grupo de atopia y el de atopia y autoinmunidad.

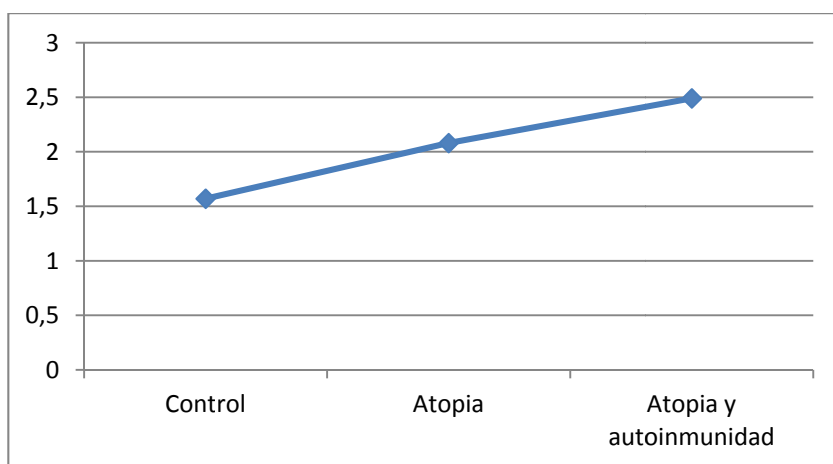


Figura 48. Comparación de la media de los logaritmos de la IgE entre el grupo control y los grupos con atopia.

Al comparar los antecedentes obstétricos, perinatales y de riesgo ambiental entre los tres grupos de pacientes, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad gestacional de los pacientes de los distintos grupos ($p = 0,008$). Se observaron más niños pretérmino en el grupo de atopia y autoinmunidad que en los otros grupos (36,4% vs 7,9% y 8,7% respectivamente) y tan sólo se observaron niños postérmino en el grupo de autoinmunidad (5,8%) (figura 49).

No se encontró asociación estadística con el resto de variables.

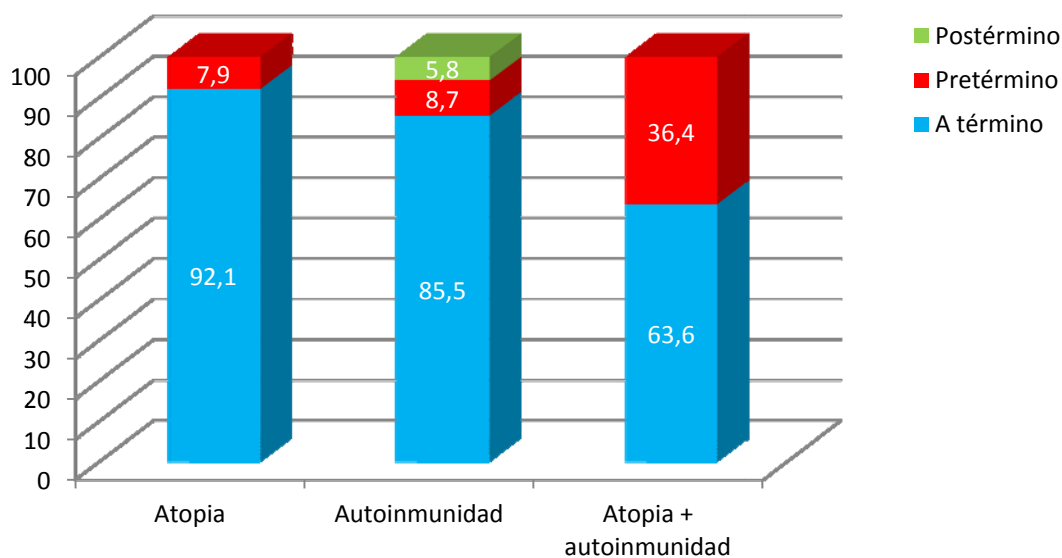


Figura 49. Distribución de la edad gestacional (en porcentajes) en los grupos de pacientes.

Cuando analizamos los antecedentes familiares, observamos una distribución similar en los tres grupos de pacientes, si bien el grupo de atopia y autoinmunidad presentó el porcentaje más elevado de antecedentes familiares tanto de atopia (75% vs 72% en el grupo de atopia y 60% en el autoinmunidad), como de asma (25% vs 17,3% en el grupo de pacientes alérgicos y 19,4% en el de pacientes autoinmunes) como de antecedentes familiares de autoinmunidad (41,7% vs 17% en el grupo de atopia y 39,1 en el de autoinmunidad).

5.2.2. PACIENTES CON ENFERMEDAD AUTOINMUNE

Al estudiar el grupo de pacientes con enfermedad autoinmune, se halló una asociación estadísticamente significativa entre el curso del embarazo y la edad gestacional ($p = 0,045$), observando más niños a término cuando el embarazo transcurrió sin incidencias (86,8%) y más niños pretérmino cuando no ocurrió así (33,3%). Asimismo, se obtuvo asociación significativa ($p = 0,006$, OR = 6,38 [1,69-23,99]) entre la evolución del embarazo y el tipo de parto, siendo más esperado un parto eutócico cuando el embarazo fue normal y distócico si había habido algún problema (76,1% vs 66,7%). Además, hubo una asociación estadísticamente significativa entre la edad gestacional y la necesidad de ventilación mecánica ($p = 0,019$), encontrando que los recién nacidos a término precisaron menos ventilación mecánica (0%) que los pretérmino (11,1%). También entre la edad gestacional y la asistencia a guardería ($p = 0,042$); un 82,6% de niños a término acudieron a la guardería, mientras que sólo lo hicieron el 33,3% de los pretérminos (figura 50). Igualmente, obtuvimos un resultado significativo entre el Apgar y el distrés respiratorio ($p = 0,025$, OR = 77 [2,56-2312,22]), encontrando más neonatos que presentaron un Apgar al minuto inferior a 7 y que posteriormente padecieron distrés (100%), respecto a los que obtuvieron un Apgar normal y tuvieron distrés respiratorio (1,3%).

Por último, también se observó asociación entre el distrés respiratorio y el tipo de lactancia ($p = 0,039$). Así, se vió que entre los pacientes que habían presentado distrés, el 50% recibieron lactancia mixta y ninguno sólo lactancia materna; mientras que entre los que no habían presentado distrés respiratorio, había más casos de lactancia materna (69,9%) y menos con mixta (6,8%).

En estos pacientes se observó una asociación entre los antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes y la edad gestacional, de forma que sólo el 66,7% de los que niños que tenían

antecedentes familiares de autoinmunidad fueron a término, frente al 93,8% de los que carecían de ellos ($p = 0,013$).

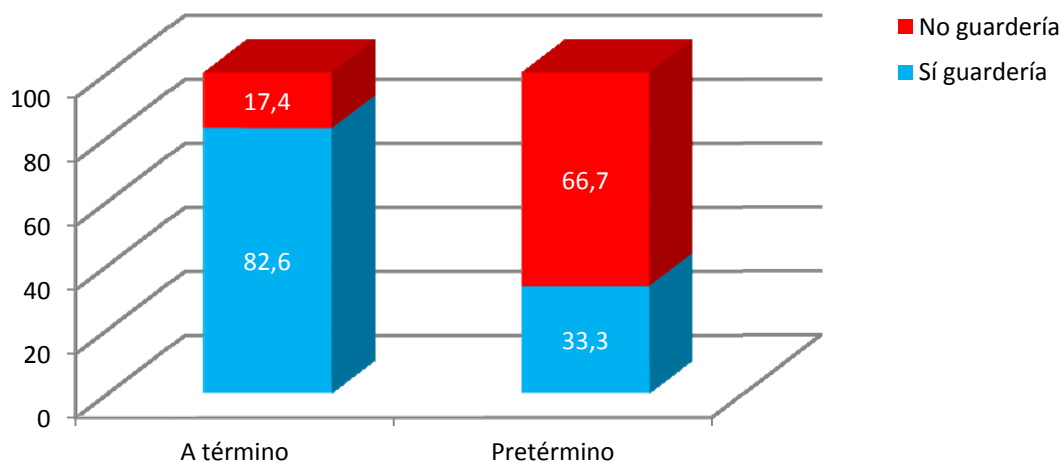


Figura 50. Asistencia a guardería (en porcentajes) en relación con la edad gestacional en pacientes con enfermedad autoinmune.

5.2.3. PACIENTES CON ATOPIA

De la misma manera que en el grupo de pacientes con autoinmunidad, se analizó si existían relaciones estadísticamente significativas entre los antecedentes obstétricos y perinatales en los pacientes con atopia. Se obtuvo relación entre el curso del embarazo y la edad gestacional ($p = 0,035$, $OR = 4,5 [1,14-17,68]$), encontrando más casos de partos a término en los embarazos que evolucionaron con normalidad (92,6%).

Igualmente se encontró asociación entre la edad gestacional y el tipo de lactancia ($p = 0,003$), observándose que los niños a término recibieron lactancia materna en mayor número (71,4%), y los pretérmino, lactancia artificial (55,6%).

En los pacientes atópicos se detectó una asociación entre el hábito tabáquico de los padres y la presencia de dermatitis atópica, de forma que hasta el 97,7% de los niños que vivían en un hogar en el que los padres fumaban presentaron dermatitis atópica frente al 79,3% de los niños que no vivían en domicilio con progenitores fumadores ($p = 0,015$, OR = 10,96 [1,24-96,65]).

En cuanto al tipo de alimentación se observó que hasta el 75% de los pacientes que recibieron lactancia artificial presentaron pruebas cutáneas positivas, en concreto a ácaros, frente al 23,1% de los pacientes con lactancia mixta ($p = 0,031$).

5.2.4. PACIENTES CON ENFERMEDAD AUTOINMUNE Y ATOPIA

De la misma manera que para los otros dos subgrupos de pacientes, se estudió la posible asociación estadística entre los antecedentes obstétricos, perinatales y postnatales en el subgrupo de pacientes que presentaban atopia y enfermedad autoinmune, sin haber encontrado ninguna asociación.

5.2.5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE CORRESPONDENCIAS (HOMALS)

En relación a los individuos, en el análisis multivariante de correspondencias (ACM) se consideraron 160 pacientes sobre los que se realizó la tipología. Dado la gran cantidad de variables utilizadas y las características propias del cuestionario, mediante la aplicación de la “Exclusión de valores perdidos” se excluyeron aquellos casos que por tener “valores perdidos” no contribuían a la variable seleccionada.

En relación a las variables que fueron utilizadas en el análisis, se seleccionaron aquellas con mayor importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica. Se descartaron aquellas otras que proporcionaban información redundante o que presentaban la misma respuesta para la mayoría de los pacientes, y que por tanto no servían a efectos de obtener una tipología de los individuos. Así, se consideraron finalmente 33 variables activas, que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Variables activas en el ACM.

CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIABLES	VARIABLES	NOMENCLATURA DE LAS VARIABLES EN EL ACM
<i>Sociodemográficas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Edad 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Edad
<i>Clínicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Tiroditis autoinmune • Celiaquía • Otra enfermedad autoinmunitaria • Dermatitis atópica • Asma • Rinitis alérgica 	<ul style="list-style-type: none"> • DiabMel • Tirodes • Celiaquía • OtrAlergAutoinm • DermAtop • Asma • RinitAlerg
<i>Analíticas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pruebas cutáneas a pólenes • Pruebas cutáneas a ácaros • Pruebas cutáneas a hongos • Pruebas cutáneas a epitelios • Pruebas cutáneas a alimentos • IgE total 	<ul style="list-style-type: none"> • Pólenes • Ácaros • Hongos • Epitelios • Alimento • IgEclasific

<i>Antecedentes familiares (1r grado) de enfermedad autoinmunitaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Tiroiditis autoinmunitaria • Enfermedad celiaca • Otras enfermedades autoinmunitarias 	<ul style="list-style-type: none"> • DM1rGrado • Tiroid1rGrado • Celiaq1rGrado • Otros1rGrado
<i>Antecedentes familiares (1r grado) de atopia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Atopia madre • Atopia padre y/o hermanos • Asma madre • Asma padre y/o hermanos 	<ul style="list-style-type: none"> • Atopiamadr • AtopiaOt1rgrado • Asmamadr • AsmaOt1rgrado
<i>Antecedentes personales obstétricos y perinatales</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Curso del embarazo • Edad gestacional • Parto • Apgar • Distrés respiratorio • Ventilación mecánica 	<ul style="list-style-type: none"> • Embarazo • Egestac • Parto • Apgar • DistResp • VM
<i>Otros antecedentes personales y de riesgo ambiental</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo de lactancia • Hábito tabáquico padres • Hábito tabáquico durante embarazo • Asistencia a guardería 	<ul style="list-style-type: none"> • LactMat • FumPad • FumEmbar • Guardería

Dado que el ACM es una técnica que exige que todas las variables tengan un nivel de escalamiento nominal (sean cualitativas no ordinales), las variables cuantitativas (como la variable “Edad”, “IgE total” o “Edad gestacional”) fueron transformadas a tal efecto antes de la realización del estudio.

Mediante el análisis multivariante se obtuvo una solución en 3 dimensiones (variables latentes) que recogían una varianza explicada (o montante de información) alta, prácticamente del 40%

(0,393). La primera variable latente (1ª dimensión), era capaz de recoger el 21% de toda la información original de la matriz de datos, mientras que las otras dos variables latentes (2ª y 3ª dimensión) recogían el 9,4% y el 8,9%, respectivamente (tabla 9).

Tabla 9. Varianza explicada por cada dimensión y la total del modelo.

Dimensión	Varianza explicada	
	Total (Autovalores)	Inercia
1	6,960	0,211
2	3,088	0,094
3	2,936	0,089
Total	12,983	0,393

El ACM mostró las variables más importantes en la construcción de las variables latentes, y por tanto, que más contribuían en la tipología de los pacientes en cada uno de los planos factoriales resultantes (tabla 10).

Las variables “asma” y “enfermedad celiaca” fueron las variables con mayor influencia en la discriminación en relación a la primera dimensión encontrada en el análisis, aunque también fueron relevantes en la definición de la misma, variables como “pruebas cutáneas a pólenes”, “dermatitis atópica”, “sexo”, “hábito tabáquico de los padres” y “hábito tabáquico durante el embarazo”.

Tabla 10. Medidas de discriminación. Se han resaltado las mayores contribuciones de las variables a cada dimensión, y se han atenuado los valores menores de 0,2 (menos importantes).

	Dimensión		
	1	2	3
Edad	,053	,169	,163
Sexo	,348	,003	,080
DiabMel	,248	,003	,221
Tiroides	,145	,101	,603
Celiaquía	,616	,016	,325
DermAtop	,224	,168	,057
Asma	1,245	,003	,002
RinitAlerg	,324	,308	,049
OtrAlergAutoinm	,070	,010	,020
Ácaros	,231	,218	,009
Epitelios	,311	,430	,042
Hongos	,260	,186	,061
Pólenes	,353	,231	,109
IgEclasific	,240	,229	,011
DM1rGrado	,237	,063	,010
Tiroid1rGrado	,236	,018	,270
Celiaq1rGrado	,267	,073	,046
Otros1rGrado	,230	,093	,006
Atopiamadr	,091	,039	,023
AtopiaOt1rgrado	,098	,074	,087
Asmamadr	,082	,023	,012
AsmaOt1rgrado	,083	,005	,039
Embarazo	,036	,196	,000
Egestac	,078	,103	,218
Parto	,028	,064	,008
Apgar	,032	,017	,000
DistResp	,024	,009	,014
VM	,024	,006	,260
LactMat	,039	,083	,023
ClasifLM	,010	,029	,042
FumPad	,280	,032	,021
FumEmbar	,299	,001	,004
Guardería	,114	,085	,102

En cuanto a la segunda dimensión, la discriminación de los pacientes se detectó básicamente en relación a las variables “pruebas cutáneas a epitelios” y “curso del embarazo”, pero también “rinitis alérgica”.

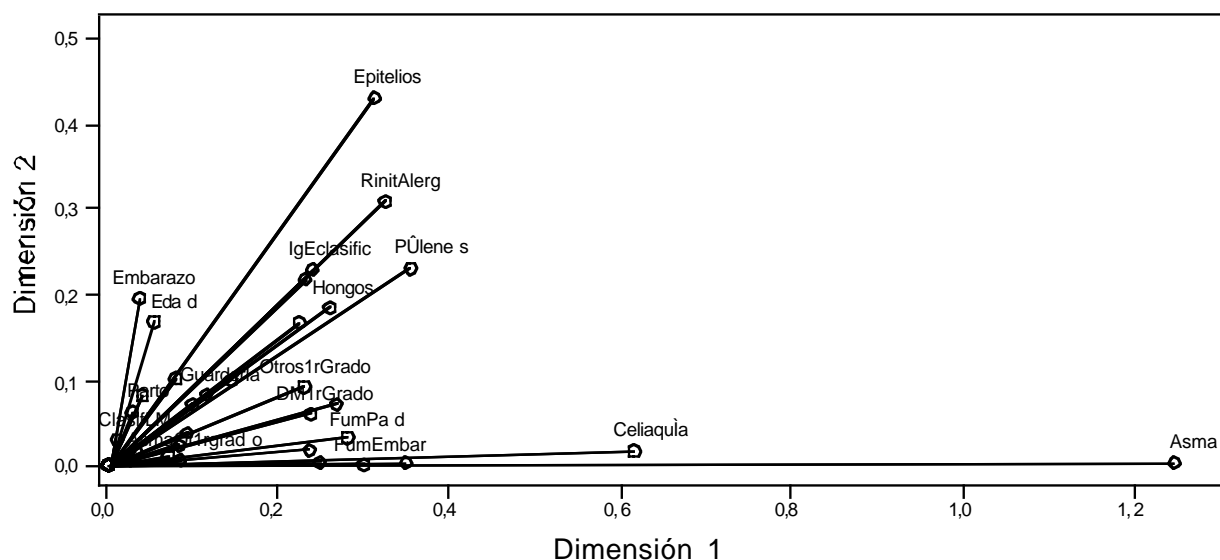


Figura 51. Representación gráfica de las medidas de discriminación en el plano 1-2.

Por lo que se refiere a la tercera dimensión, las variables determinantes fueron “tiroiditis autoinmunitaria”, “edad gestacional” y “ventilación mecánica”, aunque también “celiaquía” (figura 52).

La tipología o caracterización de los pacientes puede determinarse a partir de su representación en el plano factorial de dimensión reducida, determinado por dos de las variables latentes obtenidas en el análisis de correspondencias múltiples, teniendo en cuenta las medidas de discriminación que configuran dichas variables latentes o dimensiones.

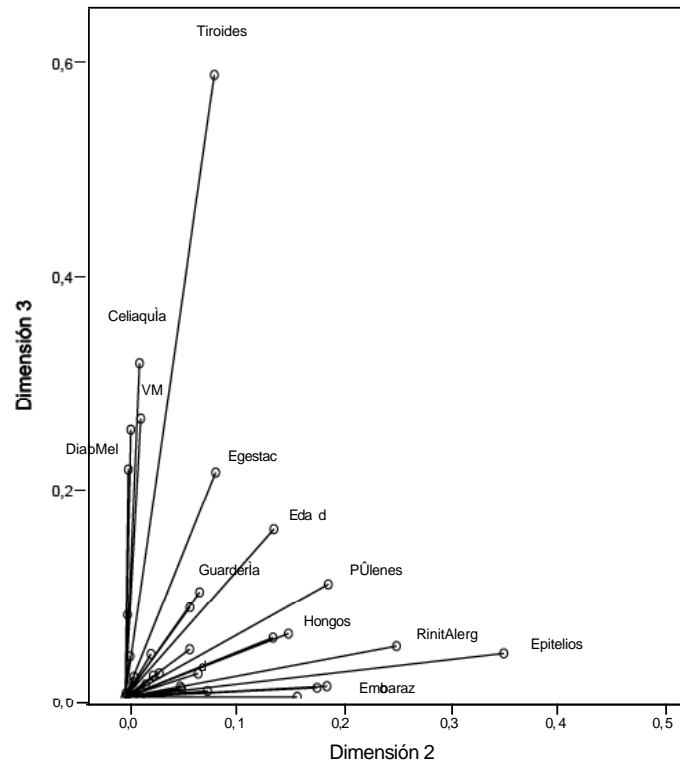


Figura 52. Representación gráfica de las medidas de discriminación en el plano 2-3.

Así, se apreciaban aparentemente dos grupos en relación a la primera dimensión, básicamente determinada por los pacientes que presentaban asma (a la izquierda del gráfico) frente a los que no (a la derecha) (figura 53).

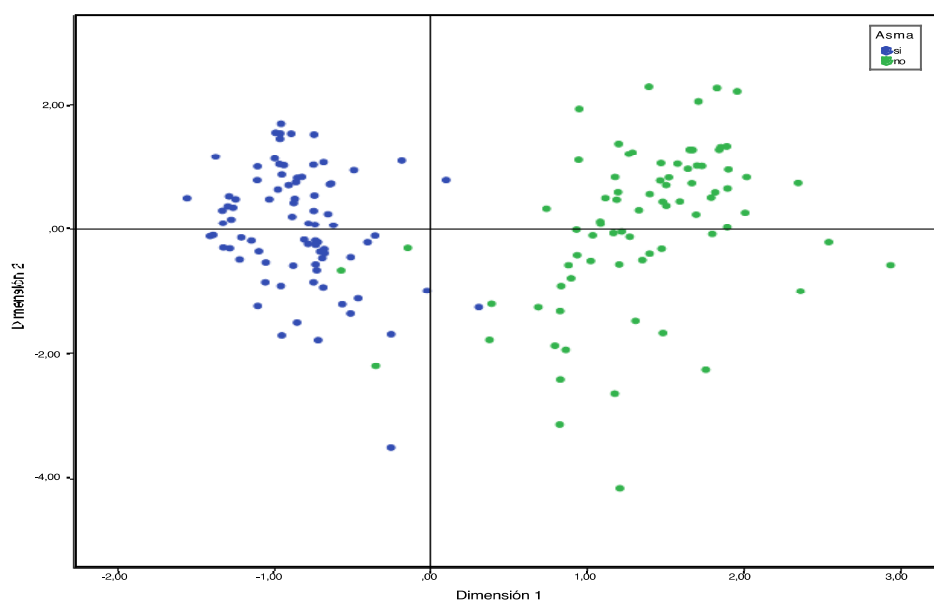


Figura 53. Plano factorial 1-2 en el que los pacientes aparecen señalados en relación a la variable “asma”.

Si en el primer plano factorial se representaba a los individuos en función de que presentasen atopía, autoinmunidad o una mezcla de ambas, entonces se observaba un gradiente, en el que a la izquierda del gráfico se situaban los pacientes atópicos, mientras que a la derecha se presentaban los pacientes autoinmunes, en tanto que entre ambos grupos se situaban los pacientes que presentaban tanto atopía como autoinmunidad (figura 54).

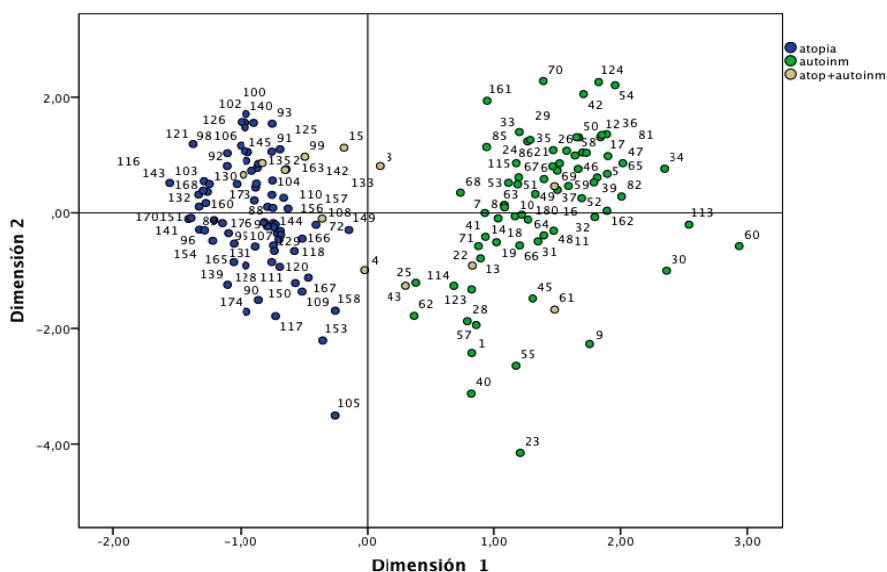


Figura 54. Plano factorial 1-2 en el que los pacientes aparecen identificados según presentasen atopía, autoinmunidad o ambas.

En el plano factorial 1-3, ya no se observaba tan claramente este grupo intermedio (figura 55).

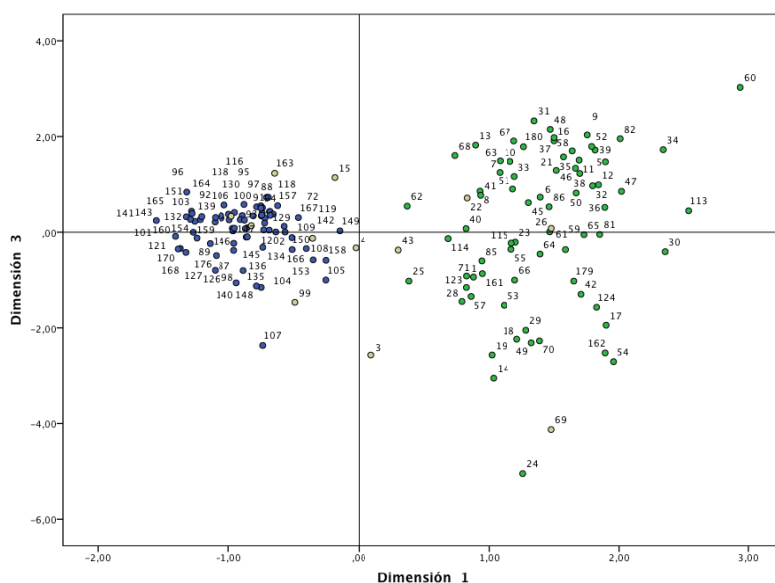


Figura 55. Plano factorial 1-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presentasen atopía, autoinmunidad o ambas.

En el plano factorial 2-3 desaparece esa diferenciación (figura 56).

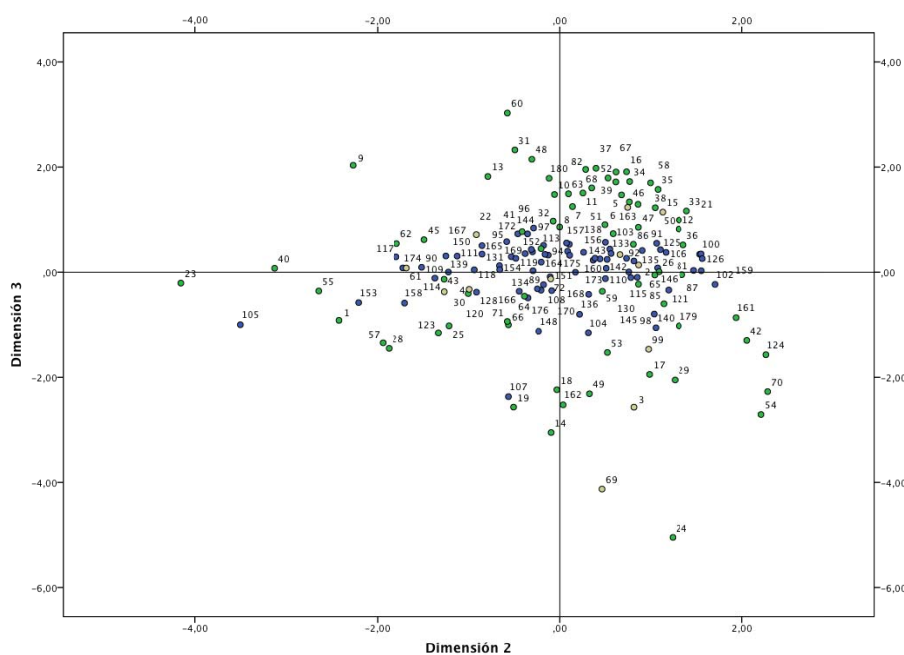


Figura 56. Plano factorial 2-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presentasen atopía, autoinmunidad o ambas.

En el plano factorial 2-3, y de acuerdo a las medidas de discriminación de las variables originales con las dimensiones 2 y 3 (variables latentes 2 y 3), sí que se observaba un gradiente en relación al posicionamiento de los individuos a estudio. Esta diferenciación ocurría en relación fundamentalmente a la 3ª dimensión, donde se situaban diferenciados los pacientes celíacos (parte superior), de los diabéticos (parte intermedia), de los pacientes que presentaban tiroiditis (parte inferior del gráfico). Los individuos que presentaban más de una patología se posicionan, en general, en las zonas de transición entre celiaquía, diabetes y tiroiditis (figura 57).

A partir de las puntuaciones conseguidas en las 3 dimensiones de la solución obtenida mediante el ACM, se realizó un análisis de conglomerados de K-medias, con la intención de determinar otras diferencias entre grupos, a partir de la información proporcionada por las

variables involucradas en el análisis, y que por tanto podrían ser no visibles gráficamente y sin embargo resultar de interés en la tipología de los individuos analizados.

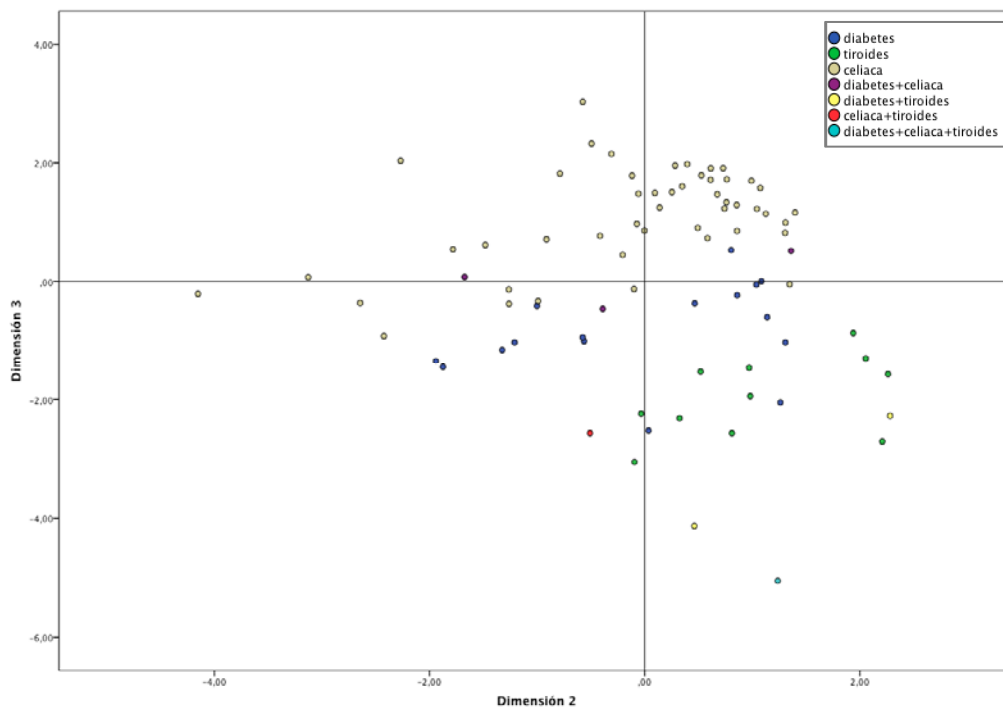


Figura 57. Plano factorial 2-3 en el que los pacientes aparecen identificados según presentasen distintas patologías.

Tras realizar este análisis, se obtuvieron 3 conglomerados con la información reflejada en la tabla 11.

Tabla 11. Número de casos en cada conglomerado.

Conglomerado	1	33
	2	108
	3	19

Se puede comprobar que el grupo mayoritario estaba formado por 108 pacientes (conglomerado 2), en tanto que el más pequeño estaba formado únicamente por 19 individuos (conglomerado 3). Representando esta información en el mismo gráfico anterior, pero diferenciando los individuos con colores, en relación al conglomerado de pertenencias, se obtenía la figura 58.

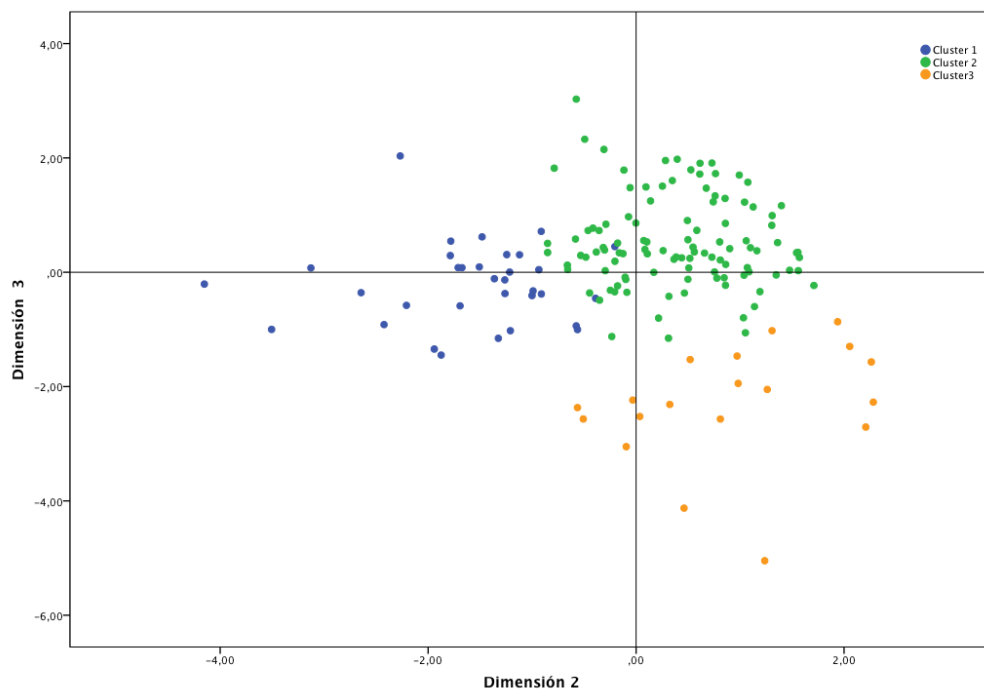


Figura 58. Representación de los pacientes en el tercer plano factorial obtenido, identificados por un color relativo al grupo de conglomerado determinado por el procedimiento K medias realizado.

La discriminación entre los conglomerados 2 y 3, por un lado, y el conglomerado 1 por otro, se producía en relación a la segunda dimensión (variable latente 2). La discriminación entre el grupo 3, frente a los conglomerados 1 y 2, se producía por otro lado, en relación a la 3ª dimensión.

En el análisis de Clúster no apareció ninguna agrupación clara de los individuos en relación a alguna de las variables analizadas, para ninguno de los análisis exploratorios realizados, ni en

ninguna de las combinaciones utilizadas. Sí que fue posible encontrar agrupaciones de pacientes que presentaban unas características más acentuadas que otras en relación a una o varias variables. De esta forma, fue posible establecer una caracterización grosera de los 3 grupos encontrados sobre la solución factorial, sobre todo en lo referido a los Clúster 2 y 3. Así, el Clúster 2 lo constituirían fundamentalmente pacientes con pruebas cutáneas positivas a epitelios, en tanto que el Clúster 3 estaría determinado básicamente por individuos con patología tiroidea autoinmune. Sin embargo, el Conglomerado 1 no tenía una interpretación tan evidente, pero si algo caracterizaba a la mayoría de los individuos que lo conformaban era la ausencia de la característica que recogía la gran mayoría de las variables del estudio (figura 59).

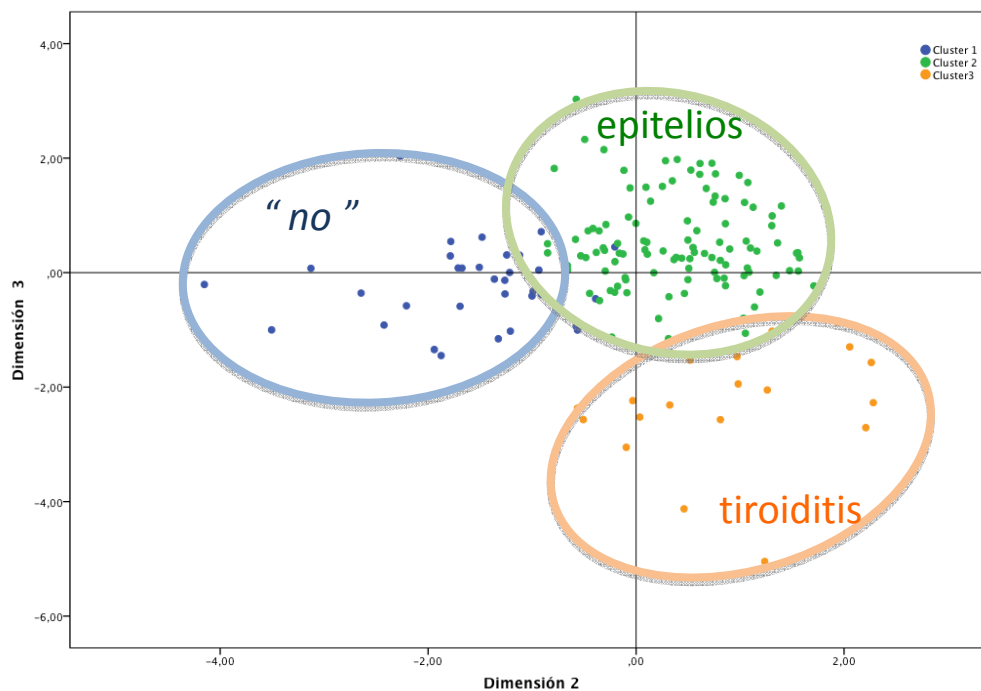


Figura 59. Representación de los pacientes en el tercer plano factorial, con las posibles interpretaciones de las agrupaciones encontradas.

5.3. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

Tras analizar la secuencia del gen en los 255 participantes (95 controles y 160 pacientes), hemos identificado 13 polimorfismos, de los cuales 7 no han sido descritos previamente.

Se observó que el 16,9% de los participantes (43) presentaban al menos un polimorfismo y en 2 individuos se encontraron dos SNP. Se identificó la presencia en homocigosis en el 33,3% de los participantes y en heterocigosis en el 67,7% (figura 60). Este aumento de heterocigosis sobre homocigosis se observó en todos los grupos, excepto en los pacientes con autoinmunidad y atopía en los que el porcentaje de homo y heterocigosis fue similar.

No se ha encontrado ningún polimorfismo en el paciente diagnosticado de IPEX-like.

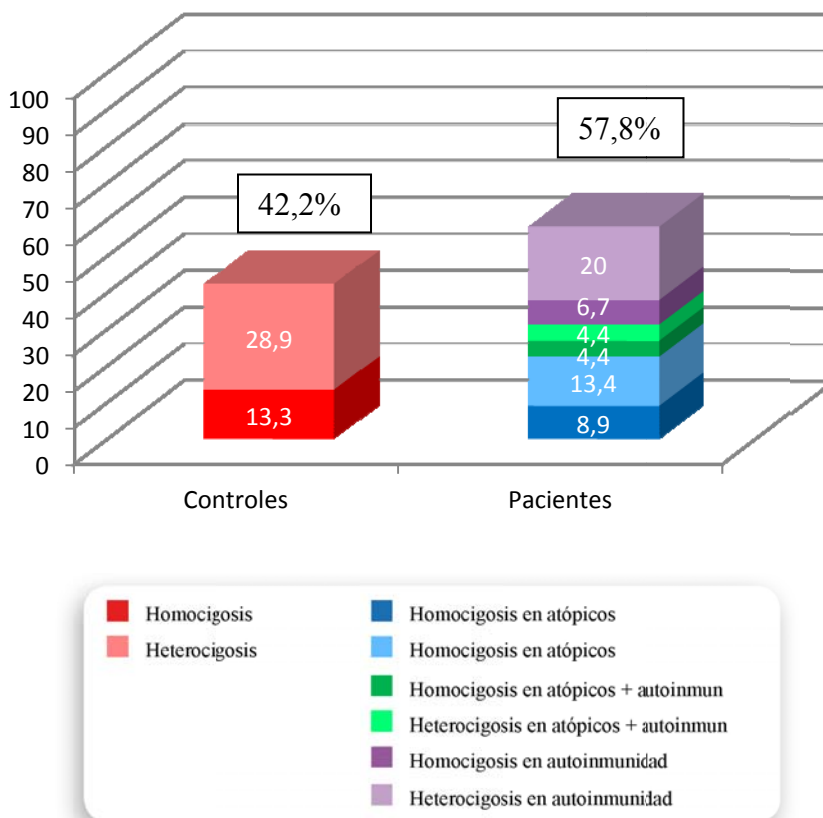


Figura 60. Características clínicas de los individuos con mutación (expresado en porcentajes) y la relación alélica del SNP.

5.3.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS POLIMORFISMOS

En el estudio se amplificó toda la región codificante del gen *FOXP3*, excepto el exón 1 que no se analizó porque no se consiguió obtener unos fragmentos amplificados adecuados que permitieran la lectura de la secuencia. Además se amplificó una secuencia reguladora localizada tras el exón 11 (región UTR) y una secuencia reguladora localizada antes del ATG (región RS 9859r).

Tabla 12. Características de los polimorfismos del gen *FOXP3* encontrados.

	Nomenclatura	rs	Posición en el cromosoma	Situación en el gen	Secuencia 5' - 3'
SNP 1	4640C>T	rs11465476	49110323	Intrón 8-9	CAGGCC→TCTGGG
SNP 2	7841C>T	rs148013438	49107122	Intrón 11-UTR	CTGTGC→TGTGTG
SNP 3	1651C>T	rs2232367	49113312	Exón 5	CCCAGC→TACCCT
SNP 4	2680A>G	rs2232368	49112283	Intrón 7-8	TGCATA→GGAATC
SNP 5	7340A>G	rs56066773	49107623	Intrón 11-UTR	GATGGA→GGGAGG
SNP 6	-4704A>G	rs6609859	49119666	Intrón -1-1	CCAATA→GAATAG
SNP 7	1855A>G	No descrito	49113108	Intrón 5-6	GTAAGA→GTGCAA
SNP 8	4572C>T	No descrito	49110391	Exón 8	GGAAAC→TAGCAC
SNP 9	7093C>T	No descrito	49107871	Exón 11	GTGGAC→TCGTGG
SNP 10	926C>T	No descrito	49114036	Intrón 2-3	GCCCAC→TATGTG
SNP 11	7872G>A	No descrito	49107153	Intrón 11-UTR	GTCCCG→ATGCAG
SNP 12	5234G>T	No descrito	49109729	Intrón 8-9	GTAGGG→TGGAGG
SNP 13	8150G>A	No descrito	49106813	UTR	ACAGCG→AGAGGA

En el estudio molecular de la secuencia génica se identificaron 13 polimorfismos diferentes, las características de los cuales se detallan en la tabla 12. El 44,5% de los polimorfismos identificados se localizaron en regiones exónicas y el 2,2% de estos se localizaron en la zona de unión al ADN (dominio FKH), es decir, en los exones 9, 10 y 11 (72). Los polimorfismos localizados en región intrónica no se hallaban en la región de procesamiento del intrón o “*splicing*”.

5.3.2. FRECVENCÍAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

Se realizó la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo, comparándolas con el grupo control. Los resultados se expresan en las tablas 13 a 16.

Dentro de la población masculina se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes global para los SNP 3, 5 y 12. En concreto, se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas para el SNP3 entre el grupo control y el formado por los pacientes que tenían atopía o autoinmunidad ($p = 0,01$, OR = 0,16 [0,03-0,79]). El alelo mutado T se observó con más frecuencia en controles. En el resto de grupos se observó una p significativa, sin embargo el intervalo de confianza de la *Odds Ratio* incluyó el 1 por lo que no se consideró la asociación (tabla 13).

Igualmente en la población masculina se observaron también diferencias significativas en las frecuencias alélicas ($p = 0,004$, OR = 16,2 [1,34-195,15]) del SNP5 entre el grupo control y el grupo de pacientes con atopía y autoinmunidad. Se observó una mayor presencia del alelo mutado T en este grupo de pacientes (0,17) que en los controles (0,01) (tabla 13).

Tabla 13. Frecuencias alélicas de los polimorfismos descritos anteriormente del gen *FOXP3* en los varones (al ser hemicigóticos para los genes del cromosoma X, las frecuencias genotípicas serían similares a las alélicas).

Fenotipo	Alélica				Genotípica					
	SNP1	n	A	G	p valor	SNP5	CC	CT	TT	p valor
Controles	41	1	-	-	-	0,98	0,98	0,02#	-	-
Pacientes totales	89	1	-	-	-	0,99	0,99	-	0,01	0,27
Atopia	58	1	-	-	-	1	1	-	-	0,24
Autoinmunidad	25	1	-	-	-	1	1	-	-	0,43
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	0,83	0,83	-	0,17	0,03*
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	-	-	1	1	-	-	0,16
SNP2	n	G	A	p valor						
Controles	41	0,98	0,02	-						
Pacientes totales	89	0,99	0,01	0,43						
Atopia	58	1	-	0,97						
Autoinmunidad	25	0,96	0,04	0,61						
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	0,58						
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,48						
SNP3	n	C	T	p valor						
Controles	41	0,93	0,07	-						
Pacientes totales	89	0,98	0,02	0,05*						
Atopia	58	0,98	0,02	0,05*						
Autoinmunidad	25	1	-	0,05*						
Atopia y autoinmunidad	6	0,83	0,17	0,28						
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,01*						
SNP4	n	G	A	p valor						
Controles	41	1	-	-						
Pacientes totales	89	0,99	0,01	0,33						
Atopia	58	1	-	-						
Autoinmunidad	25	0,96	0,04	0,07						
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-						
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,31						
SNP6	n	C	T	p valor						
Controles	41	1	-	-						
Pacientes totales	89	1	-	-						
Atopia	58	1	-	-						
Autoinmunidad	25	1	-	-						
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-						
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	-						

* $p < 0,05$

(-) no detectado

Paciente diagnosticado de síndrome de Klinefelter

Tabla 14. Frecuencias alélicas de los polimorfismos no descritos anteriormente del gen *FOXP3* en los varones (al ser hemicigóticos para los genes del cromosoma X, las frecuencias genotípicas serían similares a las alélicas).

Fenotipo		Alélica		
SNP7	n	A	G	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	1	-	-
Atopia	58	1	-	-
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	-
SNP8	n	G	A	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	0,99	0,01	0,33
Atopia	58	0,98	0,02	0,23
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,32
SNP9	n	G	A	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	0,99	0,01	0,33
Atopia	58	0,98	0,02	0,22
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,31
SNP10	n	C	T	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	0,99	0,01	0,33
Atopia	58	0,98	0,02	0,22
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	0,99	0,01	0,31
SNP11	n	G	A	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	1	-	-
Atopia	58	1	-	-
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	-
SNP12	n	G	T	p valor
Controles	41	0,98	0,02	
Pacientes totales	89	1	-	0,04*
Atopia	58	1	-	0,09
Autoinmunidad	25	1	-	0,26
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	0,58
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	0,04*
SNP13	n	C	T	p valor
Controles	41	1	-	
Pacientes totales	89	1	-	-
Atopia	58	1	-	-
Autoinmunidad	25	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	83	1	-	-

* p < 0,05
 (-) no detectado

Asimismo, en los varones se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas del SNP12 entre el grupo control y el grupo de pacientes global ($p = 0,04$) y con el subgrupo de atopía o autoinmunidad ($p = 0,04$). En este caso las diferencias se deben a una mayor frecuencia del alelo mutado T en la población control (tabla 14).

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas en los polimorfismos descritos anteriormente del gen *FOXP3* en las mujeres.

Fenotipo	Genotípica					Alélica		
	n	AA	AG	GG	p valor	A	G	p valor
SNP1	n	AA	AG	GG	p valor	A	G	p valor
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	0,99	0,01	-	0,38	0,99	0,01	0,38
Atopia	18	0,94	0,06	-	0,08	0,97	0,03	0,08
Autoinmunidad	47	1	-	-	-	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	0,98	0,02	-	0,36	0,99	0,01	0,36
SNP2	n	GG	GA	AA	p valor	G	A	p valor
Controles	54	0,98	0,02	-		0,99	0,01	
Pacientes totales	71	0,97	0,03	-	0,74	0,99	0,01	0,74
Atopia	18	1	-	-	0,56	1	-	0,56
Autoinmunidad	47	0,98	0,02	-	0,93	0,99	0,01	0,93
Atopia y autoinmunidad	6	0,83	0,17	-	0,06	0,92	0,08	0,06
Atopia o autoinmunidad	65	0,98	0,02	-	0,88	0,99	0,01	0,88
SNP3	n	CC	CT	TT	p valor	C	T	p valor
Controles	54	0,91	0,09	-		0,95	0,05	
Pacientes totales	71	0,90	0,09	0,01	0,67	0,94	0,06	0,72
Atopia	18	0,94	0,06	-	0,62	0,97	0,03	0,63
Autoinmunidad	47	0,91	0,09	-	0,56	0,94	0,06	0,58
Atopia y autoinmunidad	6	0,83	0,17	-	0,57	0,92	0,08	0,58
Atopia o autoinmunidad	65	0,91	0,08	0,01	0,63	0,95	0,05	0,79
SNP4	n	GG	GA	AA	p valor	G	A	p valor
Controles	54	0,96	0,04	-		0,98	0,02	
Pacientes totales	71	1	-	-	0,10	1	-	0,10
Atopia	18	1	-	-	0,41	1	-	0,41
Autoinmunidad	47	1	-	-	0,18	1	-	0,18
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	0,63	1	-	0,63
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	0,12	1	-	0,12
SNP5	n	CC	CT	TT	p valor	C	T	p valor
Controles	54	0,93	0,07	-		0,96	0,04	
Pacientes totales	71	0,97	0,03	0,01	0,23	0,99	0,01	0,24
Atopia	18	0,94	0,06	-	0,79	0,97	0,03	0,79
Autoinmunidad	47	0,98	0,02	-	0,22	0,99	0,01	0,22
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	0,49	1	-	0,50
Atopia o autoinmunidad	65	0,97	0,03	-	0,28	0,98	0,02	0,29
SNP6	n	CC	CT	TT	p valor	C	T	p valor
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	0,97	0,03	-	0,34	0,99	0,01	0,34
Atopia	18	0,94	0,06	-	0,18	0,97	0,03	0,18
Autoinmunidad	47	0,98	0,02	-	0,41	0,99	0,01	0,41
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	0,97	0,03	-	0,32	0,98	0,02	0,32

* $p < 0,05$
 (-) no detectado

Sin embargo, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa en el grupo de mujeres (tablas 15 y 16).

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas en los polimorfismos no descritos anteriormente del gen *FOXP3* en las mujeres.

Fenotipo	Genotípica					Alélica		
	n	AA	AG	GG	p valor	A	G	p valor
SNP7								
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	0,99	0,01	-	0,38	0,99	0,01	0,38
Atopia	18	1	-	-	-	1	-	-
Autoinmunidad	47	0,98	0,02	-	0,28	0,99	0,01	0,28
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	0,98	0,02	-	0,36	0,99	0,01	0,36
SNP8								
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	1	-	-	-	1	-	-
Atopia	18	1	-	-	-	1	-	-
Autoinmunidad	47	1	-	-	-	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	-	1	-	-
SNP9								
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	1	-	-	-	1	-	-
Atopia	18	1	-	-	-	1	-	-
Autoinmunidad	47	1	-	-	-	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	-	1	-	-
SNP10								
Controles	54	1	-	-		1	-	
Pacientes totales	71	1	-	-	-	1	-	-
Atopia	18	1	-	-	-	1	-	-
Autoinmunidad	47	1	-	-	-	1	-	-
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	-	1	-	-
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	-	1	-	-
SNP11								
Controles	54	0,98	0,02	-		0,99	0,01	
Pacientes totales	71	1	-	-	0,25	1	-	0,25
Atopia	18	1	-	-	0,56	1	-	0,56
Autoinmunidad	47	1	-	-	0,35	1	-	0,35
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	0,74	1	-	0,74
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	0,27	1	-	0,27
SNP12								
Controles	54	0,98	-	0,02		0,98	0,02	
Pacientes totales	71	1	-	-	0,25	1	-	0,10
Atopia	18	1	-	-	0,56	1	-	0,41
Autoinmunidad	47	1	-	-	0,35	1	-	0,18
Atopia y autoinmunidad	6	1	-	-	0,74	1	-	0,63
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	0,27	1	-	0,12
SNP13								
Controles	54	0,98	0,02	-		0,99	0,01	
Pacientes totales	71	0,99	0,01	-	0,84	0,99	0,01	0,84
Atopia	18	1	-	-	0,56	1	-	0,56
Autoinmunidad	47	1	-	-	0,35	1	-	0,35
Atopia y autoinmunidad	6	0,83	0,17	-	0,06	0,92	0,08	0,06
Atopia o autoinmunidad	65	1	-	-	0,27	1	-	0,27

* p < 0,05
 (-) no detectado

5.3.3. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS

Asimismo, se analizó la distribución global de los haplotipos y de cada una de las combinaciones haplotípicas. Se analizaron las posibles diferencias estadísticamente significativas entre estas distribuciones en el grupo control y los grupos de pacientes.

Tabla 17. Frecuencias haplotípicas en los varones. Se expresa la frecuencia (en %) de cada haplotipo en los distintos grupos, así como la p de Fisher para las distribuciones de cada haplotipo frente al resto y finalmente el p valor de la distribución haplotípica general. Los haplotipos con frecuencia inferior al 1% no se han incluido.

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Pacientes totales	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,91	0,91	0,96
CCCAGGATGCGGC	H1	-	0,04	0,00*
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,02	0,04	0,42
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,01	-	0,47
CCCAGAGGCGGC	H4	0,01	-	0,47
CCCAGAAGGCGGT	H5	0,01	-	0,47
CCCAGGAGACGGC	H6	0,01	-	0,47
CTCAGGAGGCGGC	H7	0,01	-	0,47
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,01	-	0,47
			p valor general	0,17
Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atopia	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,93	0,91	0,68
CCCAGGATGCGGC	H1	-	0,04	0,02*
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,02	0,04	0,32
CCCAGAAGGCGGT	H5	0,02	-	0,37
CCCAGGAGACGGC	H6	0,02	-	0,37
CTCAGGAGGCGGC	H7	0,02	-	0,37
			p valor general	0,13
Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Autoinm	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,92	0,91	0,90
CCCAGGATGCGGC	H1	-	0,04	0,13
CCTAGGAGGCGGC	H2	-	0,04	0,13
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,04	-	0,17
CCCAGAGGCGGC	H4	0,04	-	0,17
			p valor general	0,09
Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atop + Autoin	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,67	0,91	0,03*
CCCAGGATGCGGC	H1	-	0,04	0,45
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,17	0,04	0,15
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,17	-	0,01*
			p valor general	0,01*
Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atop o Autoin	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,92	0,91	0,73
CCCAGGATGCGGC	H1	-	0,04	0,01*
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,01	0,04	0,16
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,01	-	0,46
CCCAGAGGCGGC	H4	0,01	-	0,46
CCCAGAAGGCGGT	H5	0,01	-	0,46
CCCAGGAGACGGC	H6	0,01	-	0,46
CTCAGGAGGCGGC	H7	0,01	-	0,46
			p valor general	0,10

* p < 0,05

(-) no detectado

Tabla 18. Frecuencias haplotípicas en las mujeres. Se expresa la frecuencia (en %) de cada haplotipo en los distintos grupos, así como la p de Fisher para las distribuciones de cada haplotipo frente al resto y finalmente el p valor de la distribución haplotípica general. Los haplotipos con frecuencia inferior al 1% no se han incluido.

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Pacientes totales	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,89	0,91	0,74
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,05	0,03	0,53
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,01	-	0,33
CCCAAGAGGCGGC	H4	-	0,02	0,14
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,01	0,05	0,17
p valor general				0,26

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atopia	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,92	0,91	0,86
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,03	0,03	0,92
CCCAAGAGGCGGC	H4	-	0,02	0,45
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,03	0,05	0,64
TCCAGGGGCGGC	H9	0,03	-	0,18
p valor general				0,63

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Autoinm	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,90	0,91	0,96
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,05	0,03	0,51
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,01	-	0,41
CCCAAGAGGCGGC	H4	-	0,02	0,22
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,01	0,05	0,17
CCCGGGAGGCGGC	H10	0,01	-	0,41
TCTAGGAGGCGGC	H11	0,01	-	0,41
p valor general				0,43

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atop + Autoin	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,75	0,91	0,12
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,08	0,03	0,25
CCCAGGAGGCAGC	H3	0,08	-	0,02*
CCCAAGAGGCGGC	H4	-	0,02	0,66
CCCAGGAGGTGGC	H8	-	0,05	0,44
CCCAGGAGGCGGT	H12	0,08	-	0,02*
p valor general				0,03*

Haplotipos		Frecuencia		p valor
		Atop o Autoin	Control	
CCCAGGAGGCGGC	H0	0,91	0,91	0,45
CCTAGGAGGCGGC	H2	0,05	0,03	0,59
CCCAAGAGGCGGC	H4	-	0,02	0,16
CCCAGGAGGTGGC	H8	0,01	0,05	0,21
p valor general				0,28

* p < 0,05
 (-) no detectado

Se observaron 9 haplotipos en los varones y 13 en las mujeres. En los varones se detectó en conjunto que el haplotipo H1 sólo se observaba en controles ($p = 0,005$) (tabla 17). Las mayores diferencias se detectaron en la distribución global de haplotipos entre el grupo control y el grupo de atopia y autoinmunidad ($p = 0,01$), en concreto, el haplotipo H8 ($p = 0,01$) sólo se detectó en el grupo de pacientes con atopia y autoinmunidad (tabla 17) y en ningún control.

En el grupo de mujeres también se observaron diferencias en la distribución de haplotipos en el grupo de atopia y autoinmunidad ($p = 0,03$), en concreto para el H3 ($p = 0,02$) y para el H12 ($p = 0,02$), más frecuentes en pacientes que en controles (tabla 18).

5.3.4. COMPARACIÓN CON LAS FRECVENCIAS ALÉLICAS DESCRITAS EN OTRAS POBLACIONES

A continuación se detalla la frecuencia alélica de los polimorfismos que hemos encontrado y que han sido descritos previamente en otras poblaciones (tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia alélica reportada para los polimorfismos encontrados descritos anteriormente. Se describe también la observada en los controles de nuestra población. En la tabla se muestra la frecuencia del alelo mutado.

	rs	Frecuencia alélica en otras poblaciones	Frecuencia alélica en nuestra población
SNP1	rs11465476	0,007	0
SNP2	rs148013438	0,009	0,016
SNP3	rs2232367	0,022	0,058
SNP4	rs2232368	0,016	0,011
SNP5	rs56066773	0,017	0,026
SNP6	rs6609859	0,057	0

Se observa que el SNP más frecuente en la población descrita es el SNP6, sin embargo en nuestra población no sólo no se ha detectado, sino que el más frecuente es el SNP3.

5.3.5. PREDICCIÓN PROTEICA

El análisis de predicción proteica para el haplotipo H0 proporcionó la secuencia que se observa en la figura 61.

```

MPNPRPGKPSAPSLALGPSWRAAPKASDLLGARGPG
GTFQGRDLRGGAHASSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGAR
LGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPA
MISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCT
FPNPSAPRKD S T L S A V P Q S S Y P L L A N G V C K W P G C E K V F E E P E
D F L K H C Q A D H L L D E K G R A Q C L L Q R E M V Q S L E Q Q L V L E K E K L S
A M Q A H L A G K M A L T K A S S V A S S D K G S C C I V A A G S Q G P V V P A W
S G P R E A P D S L F A V R R H L W G S H G N S T F P E F L H N M D Y F K F H N M R
P P F T Y A T L I R W A I L E A P E K Q R T L N E I Y H W F T R M F A F F R N H P A T
W K N A I R H N L S L H K C F V R V E S E K G A V W T V D E L E F R K K R S Q R P S
R C S N P T P G P

```

Figura 61. Predicción proteica para el haplotipo H0. Se señala los aminoácidos que corresponden a las posiciones de los polimorfismos en región exónica (se marca el SNP3 en amarillo, el SNP8 en verde y el SNP9 en azul).

Dicho análisis permitió identificar dos motivos *forkhead*, un motivo en dedos de zinc y diversos sitios de miristilación, fosforilación y glicosilación (figura 62).

El análisis individual de los SNP y de los haplotipos identificados en nuestra población no presentó ninguna modificación en la estructura primaria de la proteína predicha; sin embargo, se observaron modificaciones en los distintos codones según se muestra en la tabla 20.

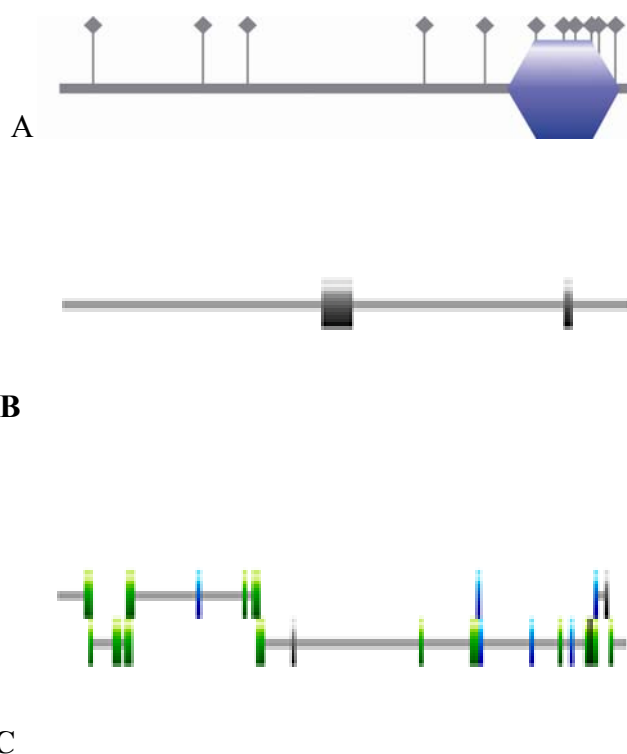


Figura 62. Sitios funcionales de la proteína FOXP3: motivos *forkhead* (A), motivos en dedo de zinc (B) y motivos de fosforilación, glicosilación y miristilación (C).

Tabla 20. Cambio de codón, aminoácido codificado y motivo en el que se localiza el polimorfismo.

Polimorfismo	Codón silvestre	Codón mutado	Aminoácido	Motivo
SNP3*	AGC	AGT	Serina	Sitio de fosforilación
SNP8	AAC	AAT	Asparagina	Sitio de miristilación Sitio de glicosilación
SNP9	ACC	ACT	Treonina	Motivo Forkhead Sitio de miristilación Sitio de fosforilación

*Polimorfismo con significación estadística.

6. DISCVSIÓN

6. DISCVSIÓN

6.1. DESCRIPCIÓN GENERAL Y VARIABLES AMBIENTALES

En nuestro estudio, la distribución de varones y mujeres entre el grupo control y el de pacientes fue similar, con lo que se evitó la presencia de sesgos relativos al sexo. Sin embargo, la presencia de mujeres fue superior en el grupo de enfermedades autoinmunes, tal y como se ha descrito en la literatura excepto para la diabetes (2-5, 27-34). En nuestra muestra predominaba también el sexo femenino entre los pacientes diabéticos. Por otro lado, en el asma la mayoría de los pacientes eran varones, al igual que se cita en la bibliografía (53-56).

Al analizar la distribución por grupos, además de la citada situación de los pacientes diabéticos, se observó un predominio de mujeres en el grupo de patología tiroidea, tal y como ha sido descrito en la bibliografía (27-30); así como un predominio del sexo femenino en el grupo de enfermedad celiaca, si bien no fue muy marcado (31-34).

Por lo que respecta a la edad, como se ha comentado previamente, el grupo control provenía de población adulta para asegurar que no desarrollarían ninguna de las patologías de estudio en un futuro. Se observaron diferencias en la distribución por edades en las distintas enfermedades autoinmunes, explicable por la distinta edad de presentación de las mismas. Esta edad de diagnóstico concuerda con la recogida en la bibliografía, salvo para la enfermedad celiaca, que habitualmente se diagnostica en los dos primeros años de vida y, en nuestro estudio, la media fue ligeramente superior. Es interesante resaltar que dos de los pacientes con diabetes mellitus fueron diagnosticados cuando eran lactantes, lo cual no es habitual en esta enfermedad, aunque

cada vez se describen más casos, sin embargo, es muy característico del debut de la diabetes en pacientes afectos de IPEX. De todos modos, ninguno de estos dos pacientes presentaban otro problema asociado a este síndrome.

En relación a la prevalencia, se observó un número similar de individuos con enfermedades alérgicas y con enfermedades autoinmunes, determinado a priori en la inclusión de los pacientes, aunque en realidad sea más frecuente el primer grupo de enfermedades. Sin embargo, las distintas enfermedades autoinmunes incluidas en el estudio sí siguen la frecuencia descrita en la literatura, siendo los pacientes celíacos los más numerosos en el estudio, frente a los afectados de patología tiroidea autoinmune, los menos numerosos (2-5, 27-34).

En referencia a la dermatitis atópica, en nuestro estudio se observó una asociación significativa entre esta dermatopatía y presentar alergia, asociación clásicamente conocida, pues comparten mecanismos fisiopatológicos. No obstante, se cifra en un 12,2% los pacientes asmáticos que presentan dermatitis atópica (48), mientras que en nuestra muestra fue superior al 80%.

En nuestra muestra, tanto en el grupo de atopia como en el de atopia y autoinmunidad, la mayoría de pacientes estaban sensibilizados a pólenes, seguido de los epitelios y los hongos y, finalmente, los ácaros. Esta distribución sigue la misma prevalencia que la descrita en otros estudios nacionales (98), si bien ésta varía en función de la región española estudiada (48).

En relación a la IgE total, clásicamente se definían las enfermedades alérgicas como aquellas mediadas por IgE, así que ésta debía estar elevada en este grupo. Hoy en día se sabe que es un criterio que apoya el diagnóstico, pero no es excluyente (49). Así que, como era de esperar, se observó una asociación significativa entre las cifras de IgE total y presentar alergia, si bien no

se han observado diferencias entre pertenecer al grupo de atopia o al de atopia más autoinmunidad.

Al analizar los antecedentes obstétricos y perinatales entre los tres grupos de pacientes, se observó la presencia de más partos pretérminos en el de atopia y autoinmunidad y más partos postérminos en los pacientes con autoinmunidad. En el grupo de enfermedad autoinmune se observó también un mayor porcentaje de pacientes que nacieron postérmino cuando tenían antecedentes familiares de enfermedad autoinmune. Sin embargo el poder estadístico fue muy escaso y de hecho no hemos encontrado referencias en la bibliografía.

En relación a los factores de riesgo ambiental, se detectó en el grupo global que los pacientes que no fueron a la guardería presentaban una mayor presencia de asma. Merece destacar que el poder estadístico de esta asociación fue del 82,3% ($\alpha = 0,05$) para este tamaño muestral. Esta asociación podría ser debida a que los padres de lactantes con sibilancias hubieran decidido no llevarlos a la guardería para evitar infecciones que precipitaran el cuadro, o bien, que aquellos niños que no fueron a la guardería padecieron menor número de infecciones, y en consecuencia, desarrollaron más alergias y asma atópica según la hipótesis de la higiene. Sin embargo, dada la enorme controversia existente en este tema y al carecer de la información temporal, resulta difícil valorar si, en este caso, la presencia de asma fue una causa o una consecuencia de la no asistencia a la guardería.

En este grupo de pacientes también se relacionó la edad gestacional con la asistencia a guardería, observándose un menor número de pretérminos que fueron a guardería. En general, los pediatras aconsejan que los niños pretérmino no acudan a la guardería, sobre todo si fueron muy prematuros, pues son más propensos a las infecciones que los a término.

En cuanto a los antecedentes familiares, los pacientes incluidos en este estudio presentaban un alto porcentaje del mismo tipo de enfermedad que padecían entre sus familiares de primer grado, similar a su vez a lo descrito en la bibliografía. Así, se hace referencia a un mayor número de antecedentes familiares en el grupo de pacientes tiroideos (27). En nuestro estudio, merece destacar que existían más antecedentes familiares en el grupo de pacientes que compartían síntomas de alergia y autoinmunidad. En la bibliografía se describen antecedentes de enfermedad alérgica entre los asmáticos en el 70%, porcentaje similar al encontrado en nuestro grupo de atópicos, y para nuestros pacientes que además padecían alguna patología autoinmune el porcentaje fue superior (75%). Esto refuerza la idea de la implicación del componente genético como factor etiopatogénico en este grupo de pacientes.

En el grupo de atopia, la mayoría de pacientes que vivían en un hogar en el que los padres fumaban presentaron dermatitis atópica (99). El poder estadístico para el tamaño muestral fue de 80,3%. La asociación entre dermatitis atópica y tabaco ha sido previamente descrita en concreto relacionada con fumar durante el embarazo, sobre todo durante el tercer trimestre (100); sin embargo existe cierta controversia sobre este tema (101).

En este mismo grupo, un alto porcentaje de los pacientes que tomaron lactancia artificial presentaron pruebas cutáneas positivas, en concreto a ácaros. Se conoce el efecto protector de la lactancia materna frente al desarrollo de asma y de otras enfermedades alérgicas. Por lo que no es de extrañar que aquellos que se alimentaron con lactancia artificial, presentasen una sensibilización, como primer paso del desarrollo de este tipo de enfermedades (102-105).

6.1.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE CORRESPONDENCIAS (HOMALS)

El Análisis de Correspondencias Múltiple se realizó para identificar las variables que mayor influencia presentaban en la discriminación de nuestra población. Este análisis multivariante proporciona un método estadístico que permite seleccionar el mínimo número de variables necesarias para tipificar a los pacientes. En nuestro caso, mediante esta técnica estadística apreciamos que, de las numerosas variables recogidas en el estudio, sólo unas pocas son las que mejor definirían a los individuos en el espacio de dos dimensiones. Tras la identificación de estas variables, y en función de su influencia en cada una de las tres dimensiones del estudio, se realizó la representación gráfica de los pacientes. Al etiquetar estos pacientes se observó que claramente el plano factorial 1-2 era el que mejor individualizaba los tres grupos de nuestro estudio. Del mismo modo, el plano 2-3 individualizó los grupos de pacientes según la enfermedad autoinmunitaria que presentasen. En nuestro estudio las variables que mejor caracterizaban la población fueron el asma, las pruebas cutáneas a epitelios, la enfermedad celiaca, la tiroiditis autoinmune, el curso del embarazo y la edad gestacional. Merece destacar que de nuevo la dermatitis atópica y el hábito tabáquico en el domicilio figuraban como variables con gran influencia en la caracterización de la muestra.

6.2. ESTUDIO GENÉTICO

En este estudio hemos identificado por primera vez 7 nuevos polimorfismos en el gen *FOXP3*. Además hemos analizado otros 6 SNP anteriormente descritos, pero que no habían sido previamente estudiados en otras poblaciones con las mismas patologías que los pacientes de nuestra muestra. Únicamente el polimorfismo descrito en nuestro estudio, el SNP4 había sido

estudiado previamente en población China adulta con rinitis (106). En este estudio no se encontró asociación con dicha enfermedad. En nuestro análisis el SNP4 tampoco se asoció a ninguna de las variables analizadas relacionadas con la alergia.

En general, se observó una mayor heterocigosis que homocigosis en todos los grupos de pacientes. No obstante, cabe destacar que únicamente en el grupo de pacientes con autoinmunidad y atopia los porcentajes de homocigotos mutados y heterocigotos fueron similares. Previamente hemos descrito un aumento de los antecedentes familiares en este grupo de pacientes, siendo a su vez este subgrupo de pacientes el que presentaba mayores asociaciones génicas, por lo que la repercusión de la carga genética en este grupo parece ser importante.

En nuestro estudio hemos encontrado 3 polimorfismos en región exónica, el SNP3, el SNP 8 y el SNP9, que no producen cambios en la estructura primaria de la proteína, por lo que clásicamente se clasificarían como mutaciones silenciosas. El conjunto del proceso de transferencia de información génica, denominado código genético, contempla el sistema de las cuatro letras del ADN, y su posterior transferencia al código requerido para seleccionar cada uno de los 20 aminoácidos. Pero este código es "redundante", es decir, cada aminoácido tiene varios codones que potencialmente pueden identificarlo. Al existir codones sinónimos para cada aminoácido, puede suceder que una mutación, a pesar de afectar a un nucleótido de uno de los codones, no necesariamente altere la estructura de la proteína, debido a la existencia de codones sinónimos. Al no alterar la estructura primaria de la proteína a estas mutaciones se las ha llamado "mutaciones silenciosas". Sin embargo se ha demostrado que estas mutaciones pueden interferir en la transcripción del ADN y en la síntesis de la proteína.

Se han identificado en los últimos años unas secuencias denominadas "potenciadores de empalmes de exones" (*exonic splicing enhancer* o, *ESE*) que son secuencias cortas de tres a ocho nucleótidos que se intercalan cerca del extremo de los exones y definen el punto donde debe actuar la maquinaria del empalme. Se ha observado que dentro de los codones sinónimos algunos actúan como *ESE* y otros no, alterando de ese modo la expresión proteica final.

El otro mecanismo descrito está relacionado con la estructura que adopta el mRNA ya formado que puede variar en función de la mutación identificada debido al apareamiento de nucleótidos complementarios. La forma en que se pliega el mRNA determina su estabilidad y ello afecta la velocidad de la traducción y al plegamiento de la proteína. La forma de la proteína depende de su plegamiento y determina completamente la función de la misma. Este mecanismo ha sido recientemente identificado para el gen receptor de dopamina D2. En la actualidad se conocen más de 50 enfermedades debidas a mutaciones silenciosas.

Del mismo modo que para las mutaciones silenciosas, tradicionalmente se creía que las mutaciones localizadas en regiones intrónicas no implicaban ninguna alteración en la función de la proteína porque no se traducían, pero cada vez hay más evidencias acerca del efecto regulador que ejercen algunas secuencias intrónicas. En este sentido, en nuestro estudio se han identificado polimorfismos en secuencias reguladoras intrónicas como SNP2, SNP5 y SNP11, así como en la región 3'UTR, como SNP13, que podrían estar modulando la expresión de *FOXP3*. Estos resultados plantean la posibilidad de que las variantes génicas identificadas en *FOXP3* en estos pacientes se relacionen más con el control de la expresión génica que con la modificación de la propia estructura primaria de la proteína.

El análisis de frecuencias alélicas y genotípicas se realizó diferenciado por sexos, debido a la localización del gen en el cromosoma X. En el análisis llevado a cabo en el grupo de varones se obtuvieron asociaciones significativas con tres polimorfismos, el SNP3, el SNP5 y el SNP12; sin embargo, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa en el grupo de mujeres. Posiblemente la doble dosis aportada por los dos alelos del cromosoma X en mujeres explica las diferencias en las asociaciones encontradas entre ambos grupos, ya que en las mujeres heterocigotas los alelos mutados, si se comportaran como recesivos, verían enmascarado su efecto sobre el fenotipo.

En este estudio hemos identificado una asociación estadísticamente significativa entre el alelo mutado del SNP5, y la presencia simultánea de alergia y autoinmunidad (poder estadístico superior al 70% con una probabilidad de emitir un resultado positivo falso, FPRP, menor al 10%). Este polimorfismo ha sido reportado con anterioridad y se localiza en la región no codificante del exón 11, es decir, en un región que se transcribe a mRNA, pero que tras el procesamiento de éste, no se traduce a proteína. Por lo tanto, dicha mutación no afectaría a la secuencia de aminoácidos de la proteína pero sí a la secuencia final del RNA mensajero. Esta alteración podría tener consecuencias sobre la estabilidad del RNA que podría ver alterada la eficiencia de transcripción o incluso sus señales de localización celular. De hecho, Bennett y cols. encontraron mutaciones en la región posterior al último exón que producían una disminución de la expresión de la proteína por reducción de la expresión del mRNA (138). Nos encontramos de nuevo ante una variante génica con efecto sobre el control del mecanismo transcripcional.

En referencia al SNP3, éste se observó con mayor frecuencia en el grupo control. Este polimorfismo, ya descrito con anterioridad, se localiza en el exón 5. (Poder estadístico 77,7%

FPRP 6,2%). Los resultados encontrados sugieren que sería un cambio con efecto protector, que aunque no produzca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína podría producir modificaciones funcionales en la proteína resultante, como se ha mencionado anteriormente. En la bibliografía consultada únicamente identificamos un artículo en el que estudiaron esta variante génica pero en enfermos italianos pediátricos afectados de enfermedad de Kawasaki, que no ha sido objetivo de nuestro estudio. Aunque, si bien es cierto, no encontraron asociación con esta enfermedad.

Finalmente, el SNP12 se encontró con mayor frecuencia en los controles que en los pacientes. Este polimorfismo se localiza en región intrónica, pero no ha sido reportado anteriormente. Así, según nuestros resultados, se podría pensar que el polimorfismo se asociaría a un efecto protector, pero en este caso el poder estadístico fue inferior al 70%.

En los estudios de asociación resulta esencial analizar los SNP en su contexto, no sólo de forma aislada, ya que su efecto en la proteína expresada va a depender del alelo en el que se localice cada una de las copias. En nuestro estudio hemos analizado las combinaciones haplotípicas de los SNP objeto de estudio observándose una distribución diferente de dichas combinaciones entre los grupos de mujeres y hombres. En este sentido hemos encontrado 13 combinaciones distintas en las mujeres y únicamente 9 entre los hombres, lo que nuevamente puede deberse al hecho de que las mujeres presentan doble dosis génica y por lo tanto mayor posibilidad de variación.

Dentro del grupo de los varones se encontró asociación estadísticamente significativa en la distribución global de haplotipos entre el grupo control y el grupo de pacientes que presentaban conjuntamente autoinmunidad y alergia. Al igual que en resultados anteriores, este grupo

vuelve a presentarse como un grupo compacto con unas características genéticas concretas y significativamente distintas del resto de grupos. En el análisis de cada uno de los haplotipos frente al resto destacan tres haplotipos para los que se encontró asociación significativa en el análisis. En este sentido, el haplotipo H8 se observó únicamente en el grupo de pacientes con autoinmunidad y alergia (poder estadístico 70% para este tamaño muestral), por el contrario, los haplotipos H1 y H0 (PE menor de 70%; FPRP menor del 1%) se detectaron con mayor frecuencia en el grupo control que en el grupo de autoinmunidad y atopia. Estos datos sugieren que los haplotipos H0 y H1 podrían ser protectores, en especial el H1 que no se ha detectado en ningún paciente, mientras que el H8 estaría más relacionado con el desarrollo de ambas enfermedades de forma conjunta.

Al analizar los posibles haplotipos en los individuos de sexo femenino, se ha encontrado dos haplotipos asociados de forma significativa: el H3 y el H12. Estos haplotipos se deben a los SNP2 y SNP13, respectivamente, que están en región 3'-UTR relacionada como se ha comentado con el control de la transcripción, sin embargo el poder estadístico fue muy bajo con lo que este tamaño muestral no sería suficiente para confirmar esta asociación.

En resumen, podríamos concluir que las asociaciones detectadas son claramente distintas en los grupos de hombres y mujeres, pero en conjunto se observa que el grupo de atopia y autoinmunidad es el que presenta mayores diferencias en cuanto a la distribución haplotípica, tanto en el sexo masculino como en el femenino y dichas asociaciones podrían tener efectos en el control de la transcripción.

El gen *FOXP3* fue descrito en el 2001, y desde entonces se ha intentado conocer más sobre sus funciones en las células T reguladoras y sus posibles interacciones con otros genes. Se sabe que

está implicado directamente en la patogénesis del IPEX, produciendo numerosas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. Por este motivo, se ha especulado sobre si podría estar también implicado en el desarrollo, de forma individual, de estas enfermedades englobadas en el IPEX, y/o de otras, también de naturaleza inmunitaria, en las que se ha evaluado también la participación de las células T reguladoras. Así, podemos encontrar en la literatura estudios que intentan relacionar polimorfismos en el gen *FOXP3* o alteraciones en el número o función de las Treg con la diabetes mellitus, la tiroiditis autoinmune, la enfermedad celíaca, el asma y la rinitis alérgica, toda ellas, incluidas en el síndrome IPEX; así, como con la cirrosis biliar primaria, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la enfermedad de Kawasaki, entre otras. Estos estudios son escasos y sus resultados son contradictorios (25, 68, 80, 106-137).

Como se ha comentado anteriormente, en nuestro caso las asociaciones se han encontrado en los pacientes del grupo que compartían alergia y autoinmunidad o cuando ambas entidades eran consideradas en conjunto. Considerando las diferentes enfermedades autoinmunes de forma independiente, prácticamente la mitad de los niños portadores de alelos mutados para los SNP 3, 5 y 12 presentaban celiaquía; el resto eran diabéticos o con tiroiditis, en un porcentaje similar. En relación con los estudios en los que se ha analizado la posible asociación entre polimorfismos del gen y una patología concreta, los resultados tampoco son concordantes. Existen diversos estudios que analizan determinados polimorfismos del gen en pacientes con diabetes tipo 1, en cuatro de los cuales participan niños (123-128). Tres de estos estudios están realizados en población caucásica. Los resultados, sin embargo, son contradictorios, aún en aquellos que han estudiado los mismos polimorfismos, no encontrando asociación entre los polimorfismos estudiados y la patología en cuatro estudios, mientras que en los dos restantes, sí que la hallan. Son dos los estudios que comentan la asociación de mutaciones en el gen con la

patología tiroidea autoinmune (129, 130). Uno estudia población japonesa adulta, y el otro incluye además a caucásicos. Los resultados encontrados son curiosos, pues mientras que en uno sí encuentra asociación; en el otro, sólo la encuentran en la población caucásica, pero no en la japonesa. En relación a la enfermedad celiaca, otras dos publicaciones han sido estudiadas (128, 131). Ambos estudian población caucásica y en ninguno encuentran asociación con los polimorfismos que estudian. Cabe mencionar, que uno de éstos es el único estudio que se realiza en población española, aunque en población adulta. Si analizamos la asociación con la enfermedad alérgica (sensibilización a algún alérgeno, alergia alimentaria, rinitis alérgica y/o asma), nos encontramos con siete estudios, tres de los cuales realizados en raza caucásica y en dos de éstos, participaron niños (106, 132-137). Todos encuentran algún tipo de relación entre alguno de los polimorfismos analizados y la enfermedad alérgica estudiada.

En referencia a los trabajos que han estudiado la relación entre las células Treg y las enfermedades autoinmunes y/o de base alérgica, los resultados son dispares. Así, mientras que algunos autores encuentran sorprendentemente un incremento de las células Treg en los enfermos celíacos (107, 108), otros no lo observan, pero sí observan una disminución de su actividad (109, 110). Algunos investigadores, además de encontrar este aumento celular, valoran la expresión de *FOXP3*; si bien los resultados son opuestos entre los distintos estudios, pues mientras que unos encuentran un aumento de la expresión (111), otros encuentran una disminución (112). En la alergia alimentaria también han encontrado un aumento de este subtipo celular (113); sin embargo, en la diabetes tipo 1 los estudios vuelven a ser contradictorios, tanto en si existe una disminución en el número de Treg, como si hay una alteración en su función (25, 68, 80, 114-122). En cualquier caso el efecto oscilante previamente descrito en relación con la proliferación de las células Treg podría explicar en parte esta controversia.

En nuestro análisis de la secuencia del gen, hemos encontrado cierta asociación especialmente en los pacientes que presentan alergia y autoinmunidad, sin embargo en el estudio del paciente con IPEX-like no encontramos ninguna asociación.

Como se comentó anteriormente, ya se había realizado el estudio en otro hospital, sin objetivar tampoco ningún cambio en la secuencia del ADN de *FOXP3*, por lo que lo diagnosticaron de IPEX-like, pero desconocíamos la profundidad del estudio realizado previamente. Considerando los resultados detectados en otros pacientes que se relacionaban más con el control transcripcional, es posible que este paciente porte variaciones génicas que no se encuentren en las regiones codificantes, sino en regiones intrónicas, o promotoras que regulen la expresión de estas primeras. Como se ha comentado han sido reportadas mutaciones en la región posterior al último exón que producían una disminución de la proteína por reducción de la expresión del mRNA (138). Nosotros encontramos un polimorfismo con significación estadística en esta región, el SNP5, que se ha comentado anteriormente, aunque no en este paciente.

Asimismo, se habla de una heterogenicidad genética, al haberse observado la enfermedad hasta en un 10-40% de varones sin mutación en el gen o en mujeres. Apoyando este dato existen distintos artículos que postulan la posible existencia de genes en regiones autosómicas responsables de esta situación, pero que se desconocen (61, 65). Barzaghi y cols. observaron un menor número de Treg en la periferia en pacientes con IPEX-like (en los que no se ha encontrado mutación), con respecto a controles; y comentaron la posibilidad de un control epigenético del gen (139). En la línea de esta teoría, hay estudios que han observado la existencia de acetilaciones y metilaciones en sitios específicos en proteínas histonas que son esenciales para la remodelación de la cromatina, permitiendo o no el acceso de factores de

transcripción hasta la región promotora del gen. Adicionalmente, los residuos citosina de los dinucleótidos CpG, ubicados dentro de las regiones promotoras, también se ha visto que pueden ser blanco de metilaciones o demetilaciones, llevando a condensación o descondensación de la cromatina respectivamente, afectando así la expresión génica (62, 72). Otro posible control epigenético podría ser el observado por Liu y cols. Ellos detectaron que el déficit de la proteína PIAS1 produce la diferenciación de las células T reguladoras naturales. PIAS1 actúa uniéndose al promotor de *FOXP3* para reclutar DNA metiltransferasas, y en su defecto, *FOXP3* no se metila aumentando la accesibilidad de otros factores a su promotor para iniciar la transcripción (140). En nuestro caso, el análisis epigenético de la región promotora escapa el alcance de los objetivos de esta tesis, ya que al actuar FOXP3 como factor de transcripción con motivos específicos de unión al ADN considerábamos que las mutaciones más interesantes desde el punto de vista funcional se localizarían en la región codificante. Sin embargo, dado los resultados obtenidos en este trabajo que orientan hacia un control transcripcional de la expresión génica, consideramos que sería interesante analizar también la región promotora del gen en este tipo de pacientes.

Dada esta heterogenicidad de resultados publicados y que sólo un estudio estaba realizado en población española (aunque no pediátrica) nos planteamos la necesidad de analizar el gen en algunas de las enfermedades inmunológicas más frecuentes de la infancia. Además, la mayoría de los investigadores analizaron algunos de los polimorfismos más frecuentes del gen; excepto tres grupos que realizaron primero un cribaje de todo el gen en algunos pacientes, para después estudiar los polimorfismos más relevantes en el resto de la muestra. Nuestro objetivo, sin embargo, fue secuenciar todas las regiones codificantes del gen en todos los individuos incluidos en el estudio, lo que podría conllevar un importante impacto potencial en el conocimiento del papel del gen *FOXP3* en las enfermedades alérgicas y autoinmunes.

Diversos motivos pueden explicar esa heterogeneidad así como las discordancias en los resultados de asociación, desde la diferente distribución étnica a los criterios fenotípicos de inclusión. Por otro lado, es muy importante el control en la calidad tanto del trabajo de laboratorio como en los análisis estadísticos. En nuestro estudio, los criterios de inclusión están claramente establecidos y resultó fundamental la caracterización del grupo control. En relación a la calidad del trabajo de laboratorio es fundamental seguir procedimientos controlados, como evitar la contaminación de las muestras. Igualmente para evitar sesgos experimentales es necesario no genotipar los pacientes y los controles en series separadas y desconocer la procedencia de las muestras en el momento de la interpretación. En nuestro caso hemos seguido estrictamente las recomendaciones de la European Management Quality Network (141).

Por lo que respecta al control de la calidad de los análisis in silico es fundamental emplear criterios de control como el estudio del equilibrio de Hardy-Weinberg que se cumplió en todos los casos. Además, merece destacar que en los estudios de asociación no es suficiente la obtención de p significativas menores de 0,05 sino que es fundamental evitar emitir resultados positivos falsos y controlar el poder estadístico del tamaño muestral empleado (142-145). El descuido de cualquiera de estos aspectos puede ser una de las causas de ausencia de concordancia en los estudios de asociación. En nuestro caso, aunque consideramos que todas las asociaciones génicas deben ser confirmadas en más de un estudio poblacional, pensamos que en especial aquellas asociaciones en las que no se ha superado el 80% del poder estadístico (o el 70% acompañado de un FPRP inferior al 10%) deberían ser estudiadas en poblaciones más amplias para su confirmación.

6.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En todo estudio realizado existen una serie de limitaciones, y consideramos importante realizar un análisis crítico de este trabajo.

En primer lugar, se trata de un estudio transversal de casos y controles. Este tipo de diseño de un estudio permite estudiar varias variables resultado, como enfermedad y exposición. Por otro lado el diseño requiere un buen control de la selección de los sujetos de estudio, un tamaño muestral relativamente pequeño y poco tiempo de ejecución del estudio, puesto que no hay seguimiento de los individuos. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, entre los que destacan la dificultad de determinar si la exposición precede a la enfermedad, es decir, dificultad para establecer el sentido de la direccionalidad de asociaciones; y la información de la exposición es muy vulnerable a errores de medición, especialmente si la recogida es retrospectiva.

Además, el método de recogida de los datos de los pacientes y controles se realizó mediante revisión de historias clínicas. Esto conlleva una serie de limitaciones como, la ausencia de algunos datos de interés, la posibilidad de diferencias en criterios médicos debidas a que las historias no estaban realizadas por el mismo profesional, y que muchos datos no eran objetivos pues provenían de una encuesta clínica.

El tamaño muestral en nuestro estudio si bien no fue muy reducido, sí presentó algunas limitaciones al hacer análisis de subgrupos, sin embargo, el estudio del poder estadístico permitió calcular el tamaño muestral en nuestro estudio.

Como se ha comentado anteriormente, existe una diferencia entre la edad del grupo de pacientes y de los controles. Esta diferencia se debe a que la elección de un grupo control en el que estén ausentes todas las patologías de estudio es requerimiento esencial en estos análisis por lo que no podíamos utilizar controles de edad pediátrica ya que estos son susceptibles de desarrollar posteriormente alguna de las enfermedades objeto de este estudio.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Las variables clínico-biológicas que mejor caracterizan nuestra población desde el punto de vista epidemiológico son la presencia de asma, las pruebas cutáneas a epitelios, la enfermedad celiaca, la tiroiditis autoinmune, el curso de embarazo y la edad gestacional.
2. En este estudio, la exposición al humo de tabaco parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de dermatitis atópica. El desarrollo de asma resultó ser inferior en los pacientes de nuestro estudio que asistieron a guardería. En esta última asociación no podemos identificar claramente cual de ambos es el efecto causal.
3. En este trabajo se identifican por primera vez 7 polimorfismos nuevos en el gen *FOXP3*, que no habían sido descritos previamente en la bibliografía.
4. Existen diferencias en relación con el sexo entre las asociaciones de las variantes génicas del gen *FOXP3* y las enfermedades inmunológicas estudiadas, atribuibles a la localización génica de *FOXP3* en el cromosoma X.
5. De los polimorfismos identificados, se han detectado asociaciones génicas con los SNP 3, 5 y 12. En concreto, el alelo mutado del polimorfismo SNP5 del gen *FOXP3* se asocia a la presencia conjunta de enfermedad alérgica y autoinmunidad en los varones, mientras que los otros dos se detectan con más frecuencia en los controles en nuestro estudio.
6. Existe una distribución significativamente diferente de los haplotipos del gen *FOXP3*, específicamente el haplotipo H8 sólo se ha detectado en los pacientes con enfermedad alérgica

y autoinmunidad, en los varones, en contraste con los haplotipos H0 y H1 más frecuentes en los controles.

7. Los pacientes que presentaban simultáneamente alergia y autoinmunidad presentaron más asociaciones génicas que el resto de los grupos de enfermedades inmunológicas en relación con el gen *FOXP3*, lo que sugiere una mayor implicación de este factor genético en la regulación inmunológica en nuestros pacientes.

8. Las variantes génicas de *FOXP3* detectadas en este trabajo estarían implicadas fundamentalmente en la estabilización del RNA y en el control transcripcional, por lo que proponemos que la modulación de la expresión génica podría ser el mecanismo que subyace en la asociación identificada en los pacientes que presentan simultáneamente alergia y enfermedades autoinmunes en nuestro estudio.

8. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

8. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

1. Guyer B, Minkovitz C, Strobino D. Morbilidad y mortalidad en niños. En: McInerny T, editor. Tratado de Pediatría. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 254-7.
2. Barreiro J, Carabias P, Castro L, Pombo M. Diabetes mellitus infantil: clasificación, diagnóstico, epidemiología y etiología. En: Pombo M, editor. Tratado de Endocrinología Pediátrica. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España 2009. p. 748-55.
3. Alemzadeh R, Wyatt D. Diabetes mellitus infantil. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. Nelson Tratado de Pediatría. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 1947-67.
4. Rubio-Cabezas O, Argente J. Diabetes mellitus tipo 1 y otras formas de diabetes por deficiencia de insulina. En: Cruz-Hernández M, editor. Tratado de Pediatría. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 1006-20.
5. Tebben P, Schwenk F. Diabetes mellitus. En: McInerny T, editor. Tratado de Pediatría. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 2100-10.
6. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E y cols. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012 Aug; 55(8):2142-7.
7. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986 Mayo 22; 314(21):1360-8.
8. Zhang S, Cheng H, Fu Z, Zhong G, Yan T. Contribution of the absence of aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain to predisposition to insulin-dependent diabetes mellitus in a southern Chinese population. *Chin Med J (Engl)* 1998 Aug; 111(8):694-7.
9. Ettinger RA, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. Beta 57-Asp plays an essential role in the unique SDS stability of HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC allele associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 2000 Sep 15; 165(6):3232-8.
10. Mimbacas A, Pérez-Bravo F, Hidalgo PC, Javiel G, Pisciotto C, Grignola R y cols. Association between diabetes type 1 and DQB1 alleles in a case-control study conducted in Montevideo, Uruguay. *Genet Mol Res* 2003; 2(1):29-35.
11. Olerup O, Aldener-Cannava A, Fogdell-Hahn A, Getty RR, Wagenknecht DR, McIntyre JA. DQB1*0202 and the new DQB1*0203 allele: a fourth pair

- of DQB1 alleles differing only at codon 57. *Tissue Antigens* 1997 Mar; 49(3 Pt 1):271-3.
12. Pérez F, Carrasco E, Calvillan M, Gutiérrez MD, Larenas G, López G y cols. Genetic predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. A population study in Santiago and Temuco, Chile. *Rev Med Chil* 1995 Oct; 123(10):1205-13.
 13. Chauffert M, Cisse A, Chevenne D, Parfait B, Michel S, Trivin F. HLA-DQ beta 1 typing and non-Asp57 alleles in the aborigine population of Senegal. *Diabetes Care* 1995 May; 18(5):677-80.
 14. Rani R. Immunogenetics of Type 1 Diabetes. En: Mavragani C, editor. *Autoimmune Disorders: Pathogenetic aspects: InTech*; 2011. p. 221-44.
 15. Morran MP, Omenn GS, Pietropaolo M. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt Sinai J Med* 2008 Ag; 75(4):314-27.
 16. Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011 Jan; 91(1):79-118.
 17. Cerna M. Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr* 2008; 158(1-2):2-12.
 18. Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jul; 92(7):2403-7.
 19. Jaidane H, Sane F, Hiar R, Goffard A, Gharbi J, Geenen V y cols. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2012 Abr; 168(1):39-46.
 20. Di Caro V, Giannouskakis N, Trucco M. Tolerance and Autoimmunity in Type 1 Diabetes. En: Mavragani C, editor. *Autoimmune Disorders: Pathogenetic aspects: InTech*; 2011. p. 194-220.
 21. López MJ, Oyarzábal M, Rodríguez M. Tratamiento de la diabetes mellitus en la infancia y la adolescencia. En: Pombo M, editor. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2009. p. 756-70.
 22. Phillips BE, Trucco M. Immunotherapy-based strategies for the treatment of autoimmune diabetes: searching for the cure. *Curr Pharm* 2011 Dic; 17(29):3217-23.
 23. Phillips B, Trucco M, Giannouskakis N. Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clin Dev Immunol*; 2011:432016.

24. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T y cols. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007 Oct; 219:118-42.
25. Li CR, Baaten BJ, Bradley LM. Harnessing memory adaptive regulatory T cells to control autoimmunity in type 1 diabetes. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(1):38-47.
26. Hippen KL, Riley JL, June CH, Blazar BR. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin Immunol* 2011 Dic; 23(6):462-8.
27. LaFranchi S. Tiroiditis. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. *Nelson Tratado de Pediatría*. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 1879-80.
28. Muñoz-Calvo MT, Argente J. Hipotiroidismo adquirido. Tiroiditis. En: Cruz-Hernández M, editor. *Tratado de Pediatría*. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 1047-9.
29. Iwona B. Hashimoto's Thyroiditis - Interactions of Lymphocytes, Thyroid Cells and Fibroblasts. En: Mavragani C, editor. *Autoimmune Disorders: Pathogenetic aspects*: InTech; 2011. p. 257-65.
30. Botero D. Tiroiditis de la infancia. En: Pombo M, editor. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2009. p. 390-1.
31. García-Coreaga M, Kerner J. Trastornos de malabsorción. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. *Nelson Tratado de Pediatría*. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 1264-6.
32. Vitoria J, Castaño L. Enfermedad celiaca. En: Cruz-Hernandez M, editor. *Tratado de Pediatría*. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 1241-50.
33. Safta A, Kerner J. Enfermedad celiaca. En: McInerny T, editor. *Tratado de Pediatría*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 2147-52.
34. Pollanco I, Mearin ML. Enfermedad celíaca. En: Argüelles F, García MD, Pavón P, Román E, Silva G, Sojo A, editores. *Tratado de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica aplicada de la SEGHNP*. 1ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 284-91.
35. Mowat AM. Coeliac disease--a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet* 2003 Abr 12; 361(9365):1290-2.
36. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM y cols. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002 Sep 27; 297(5590):2275-9.

37. Serban DE. The gut microbiota in the metagenomics era: sometimes a friend, sometimes a foe. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2011 Jul-Sep; 70(3):134-40.
38. Plot L, Amital H, Barzilai O, Ram M, Nicola B, Shoenfeld Y. Infections may have a protective role in the etiopathogenesis of celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Sep; 1173:670-4.
39. Shah S, Leffler D. Celiac disease: an underappreciated issue in women's health. *Womens Health (Lond Engl)* 2010 Sep; 6(5):753-66.
40. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007 Jan; 117(1):41-9.
41. Vereckei E, Szodoray P, Poor G, Kiss E. Genetic and immunological processes in the pathomechanism of gluten-sensitive enteropathy and associated metabolic bone disorders. *Autoimmun Rev* 2011 Abr; 10(6):336-40.
42. Diosdado B, Wijmenga C. Molecular mechanisms of the adaptive, innate and regulatory immune responses in the intestinal mucosa of celiac disease patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2005 Sep; 5(5):681-700.
43. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R y cols. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012 Enero; 54(1):136-60.
44. Comino I, Real A, Vivas S, Siglez MA, Caminero A, Nistal E y cols. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr* 2012 Mar; 95(3):670-7.
45. Toll MT. Trombocitopenia. Trombopatías. Trombocitosis. En: Cruz-Hernández M, editor. *Tratado de Pediatría*. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 1672-4.
46. Montgomery JM, Paul J. Enfermedades de las plaquetas y de los vasos sanguíneos. En: Behrman R KR, Jenson H, editor. *Nelson Tratado de Pediatría*. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 1670-1.
47. Monteagudo E, Fernández-Delgado R, Sastre A, Toll T, Llord A, Molina J y cols. Protocol for the study and treatment of immune thrombocytopenic purpura (ITP). ITP-2010. *An Pediatr (Barc)* 2011 Jun; 74(6):414 e1-8.
48. Garde Garde J, Ibáñez Sandín MD. Alergia en menores de 14 años. En: SEAIC, editor. *Alergológica* 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. Madrid: Schering-Plough; 2006. p. 323-83.

49. Leung D. La alergia y las bases inmunitarias de las enfermedades atópicas. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. Nelson Tratado de Pediatría. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 743-7.
50. Martín-Mateos MA, Muñoz-López F. Diagnóstico general de la alergia en pediatría. En: Cruz-Hernández M, editor. Tratado de Pediatría. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 341-6.
51. Atkins D, Leung DY. Diagnóstico de las enfermedades alérgicas. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. Nelson Tratado de Pediatría. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 747-51.
52. García Robaina JC, Matheu Delgado V, Sánchez Machín J, Seoane Leston J. Técnicas diagnósticas *in vivo*. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 115-44.
53. Liu A, Spahn J, Leung D. Asma en la infancia. En: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, editores. Nelson Tratado de Pediatría. 17ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 760-74.
54. Muñoz-López F, Cruz-Hernández M. Asma bronquial infantil. En: Cruz-Hernández M, editor. Tratado de Pediatría. 10ª ed. Madrid: Ergon; 2011. p. 1432-41.
55. Cohn R, Martin J. Asma. En: McInerny T, editor. Tratado de Pediatría. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 1972-82.
56. Barranco Sanz P, Galán Labaca I, Cid Sánchez AB, Valls Sánchez A. Epidemiología y etiopatogenia del asma. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 609-30.
57. Cabañes Higuero N, Fernández Meléndez S, Vega Chicote JM, Jiménez Lara M. Aspectos clínicos del asma: presentación habitual. Formas de presentación atípica y diagnóstico diferencial. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 645-53.
58. Vidal Pan C, Garde Garde J, Álvarez 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. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 655-84.
59. Rodríguez Fernández F, López Abad R, Iglesias Souto FJ, Jáuregui Presa I. Factores relevantes en la presentación clínica del asma: tabaquismo, contaminación ambiental, infecciones, factores psicosociales. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 685-710.

60. Carrillo Díaz T, Almeida Quintana L, Fernández Meléndez S, Rodríguez Rodríguez M. Tratamiento integral del asma: educación, farmacoterapia, inmunoterapia. Nuevas líneas de tratamiento. En: Peláez Hernández A, Dávila González IJ, editores. Tratado de Alergología. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2007. p. 729-53.
61. Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, Bridges NA, Cheetham TD y cols. Mutational analysis of the *FOXP3* gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Dic; 88(12):6034-9.
62. González Parias JL, Duque Giraldo VE, Velásquez-Lopera MM. *FOXP3*: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. [Revisión]. 2010; 29(2):74-84.
63. Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F y cols. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the *FOXP3* gene. *Gastroenterology* 2007 May; 132(5):1705-17.
64. Myers AK, Perroni L, Costigan C, Reardon W. Clinical and molecular findings in IPEX syndrome. *Arch Dis Child* 2006 Enero; 91(1):63-4.
65. Van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in *FOXP3*. *Clin Dev Immunol* 2007; 2007:89017.
66. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002 Ag; 39(8):537-45.
67. Hannibal MC, Torgerson T. IPEX Syndrome. 1993.
68. Waterfield M, Anderson MS. Clues to immune tolerance: the monogenic autoimmune syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2010 Dic; 1214:138-55.
69. Blanco Quirós A, Arranz Sanz E, Bernardo Ordiz D, Garrote Adrados JA. From autoimmune enteropathy to the IPEX (immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2009 Jul-Ag; 37(4):208-15.
70. Otsubo K, Kanegane H, Kobayashi I, Miyawaki T. IPEX syndrome and human Treg cells. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2010; 33(4):196-206.
71. Marinic I, Gagro A, Rabatic S. Regulatory T cells. *Acta Med Croatica* 2006 Dic; 60(5):447-56.
72. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of *FOXP3* expression. *Blood* 2009 Oct 29; 114(18):3727-35.

73. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C y cols. *JM2*, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000 Dec; 106(12):R75-81.
74. Rudensky AY. Regulatory T cells and *FOXP3*. *Immunol Rev* 2011 May; 241(1):260-8.
75. Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Brennan P, Chatila TA y cols. FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. *Int Immunol* 2007 Jul; 19(7):825-35.
76. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, Anover SD, Ocheltree EL, Ochs HD, y cols. Analysis of *FOXP3* reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol* 2006 Sep 1; 177(5):3133-42.
77. Procaccini C, Galgani M, De Rosa V, Matarese G. Intracellular metabolic pathways control immune tolerance. *Trends Immunol* 2012 Enero; 33(1):1-7.
78. Sakaguchi S. Naturally arising *FOXP3*-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005 Abr; 6(4):345-52.
79. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010 Enero; 11(1):7-13.
80. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010 Dic; 10(12):849-59.
81. Dons EM, Raimondi G, Cooper DK, Thomson AW. Induced regulatory T cells: mechanisms of conversion and suppressive potential. *Hum Immunol* 2012 Abr; 73(4):328-34.
82. Le Bras S, Geha RS. IPEX and the role of *FOXP3* in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006 Jun; 116(6):1473-5.
83. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L y cols. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with *FOXP3* mutations. *J Clin Invest* 2006 Jun; 116(6):1713-22.
84. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011 Feb; 11(2):119-30.
85. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A y cols. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009 Aug; 15(8):930-9.

86. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Nov; 152(5 Pt 2):S77-121.
87. Crapo RO. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1):309-29.
88. De Leeuw J, Van Rijkevorsel J. HOMALS and PRINCALS. Some generalizations of principal components analysis. En: Diday y cols. editores. *Data Analysis and Informatics*. Amsterdam 1980. p. 231-42.
89. Gifi A. *Nonlinear Multivariate Analysis*. Wiley J, editor. Chichester 1990.
90. Hartigan JA. *Clustering algorithms*. Wiley J, editor. Nueva York 1975.
91. Heiser WJ, Meulman JJ. Homogeneity analysis: Exploring the distribution of variables and their nonlinear relationships. En: Greenacre M, Blasius J, editores. *Correspondence analysis in the social sciences: Recent developments and applications*. Nueva Cork: Academic Press; 1994. p. 179-209.
92. Crivisqui EM. *Análisis factorial de Correspondencias, un instrumento de investigación en las Ciencias Sociales*. Bruselas 1993.
93. Escofier B, Pagès J. *Análisis Factoriales simples y múltiples. Objetivos, métodos e interpretación*. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao 1992.
94. Greenacre M, Jörg B. *Correspondence Analysis in the Social Sciences. Recent developments and applications*. Press A, editor. 1994.
95. Lebart L, Morineau A, Piron M. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, editor. París 1995.
96. Li Z. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis. *Cell Res* 2005; 19(4):519-23.
97. 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.
98. González Macías M, Balboada Paz F, Rueda Esteban S. Prevalencia de la sensibilización a neumoalérgenos en nuestro medio. *Acta Paediatr Esp* 2007; 65(9):441-4.

99. Yi O, Kwon HJ, Kim H, Ha M, Hong SJ, Hong YC y cols. Effect of environmental tobacco smoke on atopic dermatitis among children in Korea. *Environ Res* 2012 Feb; 113:40-5.
100. Wang IJ, Hsieh WS, Wu KY, Guo YL, Hwang YH, Jee SH, y cols. Effect of gestational smoke exposure on atopic dermatitis in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol* 2008 Nov; 19(7):580-6.
101. Tanaka K, Miyake Y, Sasaki S, Ohya Y, Hirota Y. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of allergic diseases in Japanese infants: the Osaka Maternal and Child Health Study. *J Asthma* 2008 Nov; 45(9):833-8.
102. Liu YQ, Zhao Y, Liu MM, Wang D, Ren WH, Gao F, y cols. The effects of breastfeeding on asthma and asthma related symptoms among children. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2012 Ag; 46(8):718-21.
103. Lau S. What is new in the prevention of atopy and asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013 Abr;13(2):181-6.
104. Mavroudi A, Xinias I. Dietary interventions for primary allergy prevention in infants. *Hippokratia* 2011 Jul; 15(3):216-22.
105. Kopp MV. The revised guideline on Primary Allergy Prevention. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2012 Mar; 55(3):338-42.
106. Zhang L, Zhang Y, Desrosiers M, Wang C, Zhao Y, Han D. Genetic association study of *FOXP3* polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Hum Immunol* 2009 Nov; 70(11):930-4.
107. Brazowski E, Cohen S, Yaron A, Filip I, Eisenthal A. *FOXP3* expression in duodenal mucosa in pediatric patients with celiac disease. *Pathobiology* 2010; 77(6):328-34.
108. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Assunta B y cols. Increased CD4+CD25+Foxp3+ T cells in peripheral blood of celiac disease patients: correlation with dietary treatment. *Hum Immunol* 2009 Jun; 70(6):430-5.
109. Granzotto M, dal Bo S, Quaglia S, Tommasini A, Piscianz E, Valencic E, y cols. Regulatory T-cell function is impaired in celiac disease. *Dig Dis Sci* 2009 Jul; 54(7):1513-9.
110. Hmida NB, Ben Ahmed M, Moussa A, Rejeb MB, Said Y, Kourda N y cols. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease? *Am J Gastroenterol* 2012 Abr; 107(4):604-11.

111. Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Rago T, Honkanen J, Vaarala O y cols. Increased *FOXP3* expression in small-bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44(4):422-30.
112. Tiittanen M, Westerholm-Ormio M, Verkasalo M, Savilahti E, Vaarala O. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2008 Jun; 152(3):498-507.
113. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Tiittanen M, Savilahti E. Infiltration of Foxp3- and Toll-like receptor-4-positive cells in the intestines of children with food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010 Abr; 50(4):367-76.
114. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D y cols. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2007 Mar; 56(3):604-12.
115. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, y cols. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002 Enero; 109(1):131-40.
116. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 2005 Feb; 24(1):55-62.
117. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005 Enero; 54(1):92-9.
118. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2008 Nov 15; 181(10):7350-5.
119. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S y cols. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of *FOXP3* expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes* 2010 Feb; 59(2):407-15.
120. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M y cols. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2008 Dic; 154(3):353-9.
121. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005 May; 54(5):1407-14.
122. Marwaha A, Crome S, Panagiotopoulos C. Cutting edge: Increased Il-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol* 2010 Oct 1; 185(7):3814-8.

123. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N y cols. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the *FOXP3*/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003 Jun; 55(3):149-56.
124. Zavattari P, Deidda E, Pitzalis M, Zoa B, Moi L, Lampis R y cols. No association between variation of the *FOXP3* gene and common type 1 diabetes in the Sardinian population. *Diabetes* 2004 Jul; 53(7):1911-4.
125. Iwase K, Shimada A, Kawai T, Okubo Y, Kanazawa Y, Irie J y cols. *FOXP3*/Scurfin gene polymorphism is associated with adult onset type 1 diabetes in Japanese, especially in women and slowly progressive-type patients. *Autoimmunity* 2009 Feb; 42(2):159-67.
126. Nakanishi K, Shima Y. No contribution of a GT microsatellite polymorphism in the promoter region of the *FOXP3* gene to susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese population. *Clin Chim Acta* 2007 Sep; 384(1-2):171-3.
127. Howson JM, Walker NM, Smyth DJ, Todd JA. Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. *Genes Immun* 2009 Dic; 10 Suppl 1:S74-84.
128. Bjornvold M, Amundsen SS, Stene LC, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Njolstad PR y cols. *FOXP3* polymorphisms in type 1 diabetes and coeliac disease. *J Autoimmun* 2006 Sep; 27(2):140-4.
129. Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Jacobson EM, Concepcion ES, Tomer Y. The regulatory T cell gene *FOXP3* and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *J Autoimmun* 2007 Jun; 28(4):201-7.
130. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K y cols. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of *FOXP3* with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2010 Dic; 162(3):402-6.
131. Sanchez E, Rueda B, Orozco G, Oliver J, Vilchez JR, Paco L y cols. Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the *foxp3*/scurfin gene in autoimmune diseases. *Hum Immunol* 2005 Ag; 66(8):869-73.
132. Bottema RW, Kerkhof M, Reijmerink NE, Thijs C, Smit HA, van Schayck CP y cols. Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Ag; 126(2):338-46, 46 e1-10.
133. Bottema RW, Kerkhof M, Reijmerink NE, Koppelman GH, Thijs C, Stelma FF y cols. X-chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts. *Allergy* 2010 Jul; 65(7):865-74.

134. Hassannia H, Abediankenari S, Ghaffari J. *FOXP3* and TGF-beta Gene Polymorphisms in Allergic Rhinitis. *Iran J Immunol* 2011 Dic;8(4):218-25.
135. Fodor E, Garaczi E, Polyanka H, Koreck A, Kemeny L, Szell M. The rs3761548 polymorphism of *FOXP3* is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Hum Immunol* 2011 Oct; 72(10):926-9.
136. Zhang Y, Wang CS, Zhang L. Correlation between *FOXP3* gene polymorphisms and allergic rhinitis. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010 May; 45(5):397-400.
137. Lee SM, Gao B, Dahl M, Calhoun K, Fang D. Decreased *FOXP3* gene expression in the nasal secretions from patients with allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009 Feb; 140(2):197-201.
138. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L y cols. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nat Genet* 2001 Jan; 27(1):20-1.
139. Barzaghi F, Passerini L, Gambineri E, Ciullini Mannurita S, Cornu T, Kang ES y cols. Demethylation analysis of the *FOXP3* locus shows quantitative defects of regulatory T cells in IPEX-like syndrome. *J Autoimmun* 2012 Feb; 38(1):49-58.
140. Liu B, Tahk S, Yee KM, Fan G, Shuai K. The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* 2010 Oct 22; 330(6003):521-5.
141. Muller C. Quality control in mutation analysis: the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN). *Eur J Pediatr* 2001 (160):464-7.
142. Hernández-Hernández L, Sanz C, García-Solaesa V, Padrón J, García-Sánchez A, Dávila I y cols. Tryptase: genetic and functional considerations. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012 Nov-Dic; 40(6):385-9.
143. Isidoro-García M, Sanz C, García-Solaesa V, Pascual M, Pescador DB, Lorente F y cols. *PTGDR* gene in asthma: a functional, genetic, and epigenetic study. *Allergy* 2011 Dic; 66(12):1553-62.
144. Pascual M, Dávila I, Isidoro-García M, Lorente F. Epigenetic aspects of the allergic diseases. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010; 2:815-24.
145. Arriba-Méndez S, Sanz C, Isidoro-García M, Pascual M, Ávila C, Dávila I y cols. Analysis of 927T > C *CYSLTR1* and -444A > C *LTC4S* polymorphisms in children with asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2008 Sep-Oct; 36(5):259-63.

