

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

El gen *PTGDR* en la alergia

Estudio de genotipado y análisis de expresión
génica

Ignacio San Segundo Val

DIRECTORES

Dr. D. Ignacio J. Dávila González

Dra. Dña. María Isidoro García

Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano

2015



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO

El gen *PTGDR* en la alergia

Estudio de genotipado y análisis de
expresión génica

Memoria presentada por D. Ignacio San Segundo Val para optar al grado de
Doctor

Fdo: Ignacio San Segundo Val

2015

El Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González, Profesor Titular del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría, la Prof^a. Dra. Dña. María Isidoro García, Profesora Asociada de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y la Prof^a Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Microbiología y Genética Molecular.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “*El gen PTGDR en la alergia. Estudio de genotipado y análisis de expresión génica*”, que presenta el licenciado en Bioquímica D. Ignacio San Segundo Val ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 4 de Noviembre de 2015.

Fdo: Prof. Dr. Ignacio J. Dávila González

Fdo: Prof^a Dra. María Isidoro García

Fdo: Prof^a Dra. Catalina S. Sanz Lozano

A mi familia

A mis amigos

Por brindarme una sonrisa

todos los días de mi vida

Agradecimientos

Muchas son las personas a las que quiero agradecer su apoyo durante los años en que he desarrollado este proyecto

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis María Isidoro García, Ignacio Dávila González y Catalina Sanz Lozano; por apoyarme en cada momento de este proyecto que me ha hecho crecerme frente a las adversidades enriqueciéndome a nivel profesional y personal.

A mis amigos del Laboratorio, Choni, Laura, Elena, Mari Paz, Marili, Fernando y Virginia por hacerme disfrutar de la investigación a vuestro lado. Gracias Choni por animarme cuando nadie se daba cuenta, Laura por repetirme que detrás del 1 va el 2, a Elena por ser un ángel y a Mari Paz por todo su cariño. Gracias por esas tardes que junto con Marili guardo en el recuerdo con mucho cariño.

A mis amigos residentes por animarme cada momento de esta etapa vuestra felicidad es mi felicidad, ahora que nuestros caminos se van separando poco a poco, os deseo lo mejor.

A mis amigos de Bilbao que sois muchos, gracias por preguntar y escuchar. A pesar de estar alejados tanto tiempo me habéis hecho sentirme uno más aunque os viese dos veces al año.

Al servicio de Alergia porque cada una de las personas de ese servicio me ha tratado como si fuese del mismo desde el primer día. Gracias por facilitarme las cosas para conseguir desarrollar este trabajo. Gracias Carmen por tu cariño y tus reprimendas, sobre todo por las segundas, me ayudaron mucho.

A todos mis compañeros de trabajo del Servicio de Bioquímica Clínica que me han animado durante tantas mañanas, tardes y noches, y que me han facilitado la vida para que pudiese terminar este proyecto. Gracias a Genética Molecular por permitirme ser un "Okupa" en vuestro lugar de trabajo.

A mi grupo de Frikis de Salamanca, gracias por vuestros consejos y grandes conversaciones durante esas tardes de juego de tablero interminable.

A las griegas por hacerme reír tanto, gracias por los grandes momentos y porque a vuestro lado los problemas son menos importantes.

Al equipo de limpieza del hospital, que durante muchas tardes me han animado y se han preocupado por un "desconocido".

A mi amigo Mikel y su familia gracias por vivir y sufrir nuestras tesis. Gracias por vuestros consejos con una taza de té en la mano.

A mis padres por creer en mí y compartir mis preocupaciones a pesar de no entender muy bien que es lo que hacía; gracias por dármelo todo para llegar hasta aquí. A mi hermana, Cristina y su familia, José Luis y Asier por venir a verme y quererme sin pedir nada a cambio.

A chispa por escucharme cuando no había nadie más para hacerlo.

“El éxito es la capacidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo”

Winston Churchill

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	2
1.1- Terminología	2
1.1.1- Definición de alergia y atopia.....	2
1.1.2.- Definición de asma y rinitis.....	3
1.2.- Epidemiología	5
1.3.- Características clínicas	10
1.4.- Diagnóstico.....	10
1.5- Factores de riesgo del asma y la rinitis alérgica.....	11
1.5.1- Genética.....	12
1.5.2- Tabaquismo	12
1.5.3- Obesidad	14
1.5.4- Estrógenos	15
1.5.5- Infecciones.....	16
1.5.6- Antibióticos	17
1.5.7- Estrés	18
1.5.8- Factores maternos.....	19
1.5.9- Aeroalérgenos.....	21
1.5.10- Contaminación del aire.....	21
1.5.11- Dieta	22
1.6.- Sensibilización	23
1.7.- Genética del asma y la rinitis	26
1.7.1- Estudios genéticos	27
1.7.2- Principales genes asociados al asma y la rinitis	30
1.7.3- Epigenética y alergia	32

1.8.- <i>PTGDR</i> y las enfermedades alérgicas	34
1.8.1- Prostaglandina D2	34
1.8.2- Receptor <i>PTGDR</i>	36
1.8.3- Asociación con el asma y la rinitis alérgica	38
2.- Hipótesis	42
3.- Objetivos	44
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1.- Diseño del estudio	46
4.2.- Sujetos	46
4.2.1.- Muestreo	46
4.2.2.- Criterios de inclusión.....	46
4.2.3.- Descripción de la muestra	47
4.3.- Variables.....	47
4.3.1.- Diagnóstico de asma.....	48
4.3.2.- Gravedad del asma	49
4.3.3.- Diagnóstico de rinitis.....	51
4.3.4.- Gravedad de la rinitis.....	51
4.3.5.- Diagnóstico de atopia	52
4.3.6.- Antecedentes familiares de atopia o enfermedad alérgica....	54
4.3.7.- Utilización de inmunoterapia	54
4.3.8.- Niveles de inmunoglobulina E total (IgE total).....	54
4.3.9.- Niveles de expresión del gen del receptor de la Prostaglandina D2 (<i>PTGDR</i>)	57
4.3.10.- Polimorfismos o SNP de <i>PTGDR</i>	57
4.4.-Análisis molecular.....	58
4.4.1.- Estudio de genotipado	58

4.4.2.- Estudio de expresión.....	66
5.- RESULTADOS.....	84
5.1.- Características de la muestra.....	84
5.1.1.- Grupo control.....	85
5.1.2.- Grupo pacientes.....	86
5.2.- Estudio de asociación entre los valores de expresión de <i>PTGDR</i> y las variables clínicas.....	90
5.2.1.- Selección de genes de referencia o constitutivos.....	90
5.2.2.- Expresión de <i>PTGDR</i>	94
5.3.- Estudio de asociación de los polimorfismos de la región promotora de <i>PTGDR</i> con las variables clínicas.....	101
5.3.1.- Polimorfismos de <i>PTGDR</i> y sensibilización alérgica.....	101
5.3.2.- Polimorfismos de <i>PTGDR</i> y diagnóstico clínico.....	104
5.4.- Estudio de asociación entre los niveles de expresión y los polimorfismos del promotor de <i>PTGDR</i>	106
5.4.1- Población general.....	106
5.4.2- Sensibilización solamente a ácaros y polen.....	107
5.5- Niveles de <i>PTGDR</i> y aplicación clínica.....	108
6.- DISCUSIÓN.....	110
6.1.- Características de la muestra.....	110
6.2.- Estudio de asociación entre los valores de expresión de <i>PTGDR</i> y las variables clínicas.....	111
6.2.1- Estudio de asociación entre los valores de expresión de <i>PTGDR</i> y la sensibilización alérgica.....	112
6.2.2.- Estudio de asociación entre los valores de expresión de <i>PTGDR</i> y las manifestaciones clínicas.....	115

6.2.3.- Estudio de asociación entre los valores de expresión de PTGDR y los niveles de IgE total.....	115
6.3.- Estudio de asociación de los polimorfismos de la región promotora de <i>PTGDR</i> con las variables clínicas.....	116
6.3.1.- Estudio de asociación de los polimorfismos de la región promotora de <i>PTGDR</i> con la sensibilización alérgica	116
6.3.2.- Estudio de asociación de los polimorfismos de la región promotora de <i>PTGDR</i> con las manifestaciones clínicas.	118
6.4.- Estudio de asociación entre los niveles de expresión y los polimorfismos del promotor de <i>PTGDR</i>	119
7.- CONCLUSIONES	124
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
9.- ÍNDICE DE TABLAS	152
10.- ÍNDICE DE FIGURAS.....	156
11.- ABREVIATURAS.....	160

INTRODVCCIÓN

1.~ INTRODUCCIÓN

1.1~ TERMINOLOGÍA

El estudio de enfermedades alérgicas es muy complejo (1), para entenderlo primero es necesario definir los conceptos de alergia y atopia.

1.1.1~ DEFINICIÓN DE ALERGIA Y ATOPIA

ALERGIA

Las reacciones mortales del cuerpo a ciertas sustancias se conocían desde la antigüedad, como dejó escrito Hipócrates en su obra *Corpus Hippocraticum*. Pero no fue hasta 1906, cuando Clemens Von Pirquet utilizó por primera vez el término alergia, creado a partir de la conjunción de dos palabras griegas: Allos-otro /αλλος/ y Ergon-acción /εργεια/ (2).

El término alergia hace referencia a una respuesta inflamatoria inadecuada del sistema inmune desencadenada por una sustancia denominada alérgeno. Esta respuesta inmune puede manifestarse en forma de asma, rinoconjuntivitis, dermatitis atópica y alergia a alimentos, entre otros (1,3).

ATOPIA

En 1923, Coca y Coke definen el término atopia (*atopos* significa A-sin /α/, Topos-lugar /τοπος/) para definir un conjunto de enfermedades extrañas caracterizadas por una hipersensibilidad del sistema inmune. Entre estas enfermedades se encontraba el asma alérgica, la rinitis alérgica, el eczema (dermatitis) y la conjuntivitis alérgica (4,5). Pero no fue hasta 1967, con el descubrimiento de la inmunoglobulina E, cuando se abriría el camino para explicar el mecanismo de las reacciones alérgicas (6), tras lo cual la atopia fue relacionada con la predisposición de los enfermos alérgicos a responder con un aumento de inmunoglobulina E (IgE) (5).

Actualmente, aunque no existe un claro consenso sobre la definición de atopía, este término suele hacer referencia a una predisposición con base genética a desarrollar respuestas mediadas por anticuerpos IgE frente a antígenos ambientales, fundamentalmente aeroalérgenos. Las principales enfermedades atópicas son: la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica, el asma alérgica y la dermatitis atópica (1,3)

1.1.2.~ DEFINICIÓN DE ASMA Y RINITIS

ASMA

La palabra asma, proviene del latín *asthma* (âsth-m(a)) que a su vez deriva del griego (ἄσθ-μα/-ματος, 'jadeo'). Se recoge ya en textos homéricos del siglo VIII a.C., y fue utilizada por Hipócrates como un síntoma, más que como una enfermedad. Aunque el término procede del griego, estos no fueron la primera civilización que tuvo conocimiento de la enfermedad. Siglos antes, en el Antiguo Egipto, sobre el 1510 a.C. se escribió el Papiro de Ebers, en el que se describe el primer tratamiento para el asma (7).

Actualmente, el asma se define, en la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA), como: “Enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con una hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente”. Además la propia GEMA considera que el asma es “un síndrome que incluye diversos fenotipos clínicos que comparten manifestaciones clínicas similares, pero de etiologías probablemente diferentes” (8).

Por otra parte, en 1928 Rackemann diferenció dos tipos de asma, el asma extrínseca o alérgica del asma intrínseca o no alérgica (9). La terminología asma intrínseca y extrínseca fue reemplazada por asma no alérgica y alérgica en una declaración oficial de la *European Academy of Allergology and Clinical Immunology* (EAACI) en 2001 (10).

- El asma alérgica: la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias viene condicionada por la existencia de IgE específica frente a un alérgeno que penetra por vía inhalatoria.
- El asma no alérgica: no se conoce frente a qué se dirige la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias.

Con frecuencia, asma y alergia concurren en un mismo individuo o en diferentes individuos dentro de la misma familia (1). Además, en la patogenia de ambas entidades es muy importante la interacción entre factores genéticos y ambientales, lo cual parece contribuir a que las manifestaciones fenotípicas puedan ser muy heterogéneas (1,10,11,12,13).

RINITIS

Aunque el asma y la alergia a los alimentos fueron descritas por los griegos en la antigüedad, no fue hasta el siglo X d.C. cuando un médico árabe de origen persa llamado Al-Razi o Rhazes definió la rinitis (*rhinós/ρινοσ*/: nariz; *itis*/: inflamación) como una irritación de las fosas nasales. Concretamente, describió la rinitis alérgica estacional por sensibilización al polen como la irritación de las fosas nasales debido al olor de un perfume (14).

La descripción tan tardía de este trastorno se puede explicar por la baja prevalencia en la población hasta la reciente era de la industrialización. El incremento más significativo se produjo hace 50 años y actualmente en algunos países la prevalencia llega a ser del 50% en los adolescentes (15).

Actualmente, la rinitis alérgica se define en la guía ARIA 2008 (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) como un trastorno sintomático de la nariz inducido tras la exposición a un alérgeno que produce una inflamación mediada por IgE de la membrana mucosa de las fosas nasales (16).

1.2.~ EPIDEMIOLOGÍA

El incremento en la prevalencia del asma, rinitis y otras enfermedades alérgicas afecta a los habitantes de todos los países, de cualquier edad, sexo y etnia.

ASMA

La prevalencia del asma varía entre el 1-18% de la población; así mismo, se estima que el asma afecta a 300 millones de personas y que se incrementará a 400 millones de personas en el año 2025 (17). Este incremento previsto se relaciona con el hecho de que se prevé que la población urbana aumentará del 45 % al 59 % para el año 2025 (17). En España, la prevalencia del asma se encuentra entre el 5,1-7,5 % como indica la figura 1.

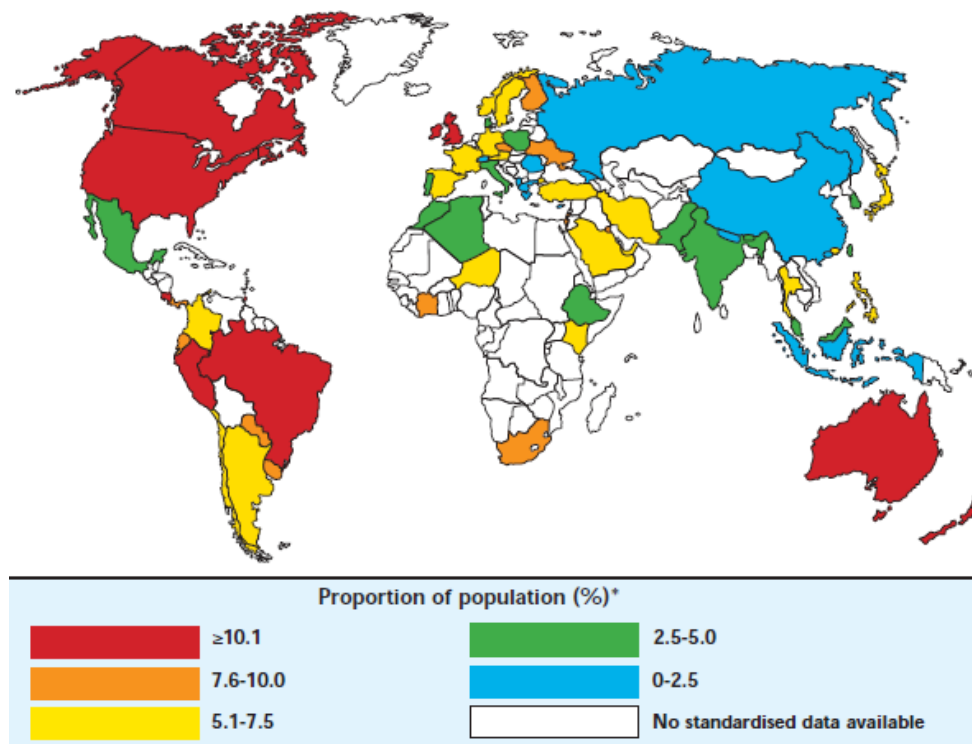


Figura 1.- Datos de prevalencia del asma a nivel mundial (17).

Por otra parte, los costes económicos directos e indirectos estimados en todo el mundo son de unos 19.700 millones cada año (18). Además, cabe destacar la pérdida en

2001 de 15 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) debido al asma. De esta forma, la enfermedad se colocó como la causa número 25 de pérdida de AVAD en dicho año. Esto representa el 1 % de todos los AVAD perdidos a nivel mundial, lo cual refleja las elevadas prevalencia y gravedad de la enfermedad. El número de AVAD perdidos a causa del asma es similar a los perdidos por patologías como la diabetes, la cirrosis o la esquizofrenia. Además, es importante recordar que en los niños se trata de la enfermedad crónica más frecuente (17).

Otro dato a tener en cuenta es la mortalidad generada por el asma, que se muestra en la figura 2. Se estima que 1 de cada 250 muertes se debe a esta patología, que provoca 250.000 muertes al año en el mundo (17), 2/3 partes de las mismas en ancianos (10).

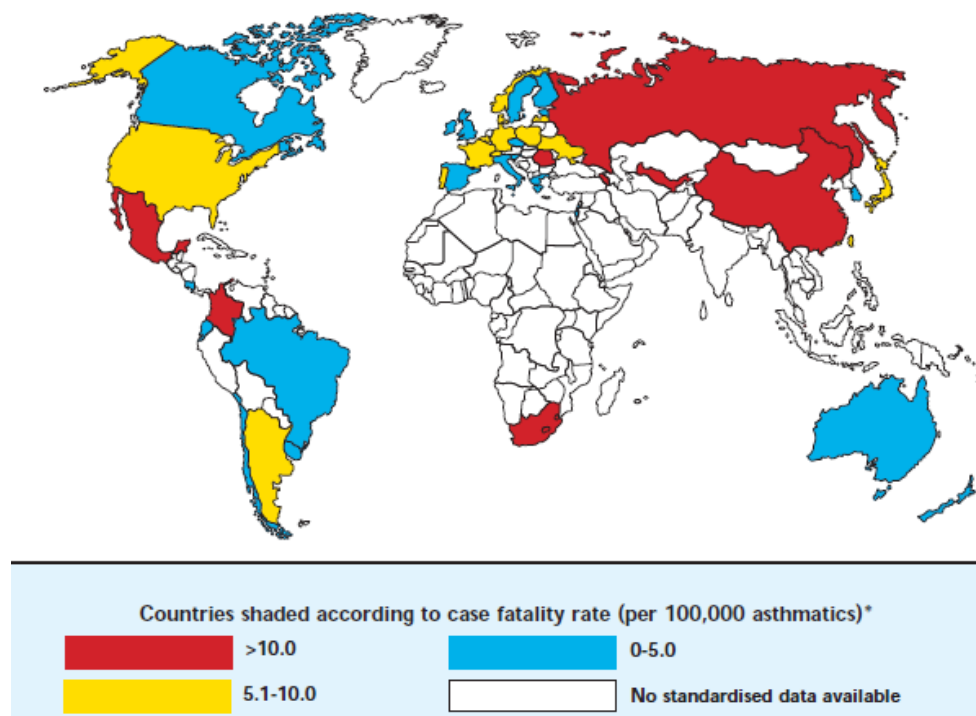


Figura 2.- Datos de muertes al año por cada 100.000 habitantes (17).

RINITIS

Los datos epidemiológicos relacionados con la rinitis son insuficientes, aunque muchos estudios nacionales e internacionales están mejorando el conocimiento sobre la prevalencia y factores de riesgo de la rinitis (16). El principal problema con el que se encuentran los clínicos para comparar datos de prevalencia entre estudios es la definición clínica estándar de rinitis (19). Además, los cuestionarios sobreestiman la prevalencia de la rinitis y no se puede realizar pruebas de laboratorio a cada persona de la población (16).

La prevalencia de la rinitis se ha incrementado considerablemente desde que comenzó el siglo XX, pasando del 1 % (20) a alcanzar una prevalencia entre el 10-20% de la población, según el país (17,20). Se estima que puede afectar a unos 500 millones de personas en todo el mundo. El resto de enfermedades alérgicas muestran una prevalencia similar a la del asma y la rinitis, mientras que la sensibilización a los alérgenos (atopia) presenta una prevalencia mucho más elevada (tabla 1).

Tabla 1.- Datos de prevalencia de las enfermedades alérgicas y de la atopia.

Patología	Prevalencia
Asma	1-18% (17)
Rinitis alérgica	10-20% (17)
Dermatitis Atópica	10-20% en niños (21) 1-3% en adultos
Atopia	16-57% (22)

La rinitis alérgica es la más frecuente de las enfermedades alérgicas; en EEUU se observó que los empleados afectados por la misma sufrían sus síntomas un promedio de 52,5 días al año, se ausentaban 3,6 días por año y eran improductivos 2,3 horas por cada día de trabajo con síntomas (23). En 1994, en EEUU se realizó un estudio en el que se estimó que se habían perdido aproximadamente 811.000 días de trabajo y había habido

4.230.000 días con actividad reducida por la rinitis alérgica (24), y se calculó que las pérdidas anuales por empleado eran de 593 dólares, muy por encima de otras enfermedades como el estrés, la depresión, la migraña y muy por encima del coste de 85 dólares por el asma (23).

En otro estudio, se observó un aumento de los costes directos de la rinitis alérgica, de 2.700 millones de dólares en 1995 a 7.300 millones de dólares en 2002, año en que los costes indirectos incrementaron esta cifra a los 11.580 millones de dólares. Las cifras de días de trabajo perdidos aumentaron hasta los 3,5 millones (25). En el informe de la Organización Mundial de la Alergia (WAO) respecto a los datos que conciernen a España se indica que sufren alguna enfermedad alérgica el 20 % de los adultos y el 25 % de los niños, aproximadamente (25). Por tanto, a la vista de los datos de EEUU podemos pensar que a nivel mundial las cifras aumentarán.

Algunos estudios a nivel europeo muestran como la prevalencia de la rinitis alérgica se encuentra entre el 17 % de Italia y el 28,5 % de Bélgica. En este estudio España mostró una prevalencia de 21,5 % (26), siendo este dato un promedio de los tomados en los centros distribuidos por toda la geografía española. En España, el estudio de la rinitis alérgica llevado a cabo en los servicios de Alergología indicó que al menos el 55 % de los pacientes que pasan por sus consultas presentan rinitis alérgica, de los cuales el 65 % presentan, además, conjuntivitis y el 37 % asma. De todos los pacientes diagnosticados, dos de cada tres acudieron al menos dos veces en 4 meses a las consultas de atención primaria, con el gasto que ello conlleva para el sistema sanitario español.

Los alérgenos implicados con mayor frecuencia fueron los pólenes (51 %) y los ácaros (42 %), aunque se encontró que el 31 % de todos los pacientes con rinitis alérgica estaba polisensibilizados. De todo el conjunto, el 38 % recibía tratamiento con inmunoterapia (27).

RELACIÓN ENTRE ASMA Y RINITIS

Por otra parte, es importante remarcar que en algunos estudios se ha demostrado como aumenta, con un perfil similar, la prevalencia del asma y la rinitis (Figura 3).

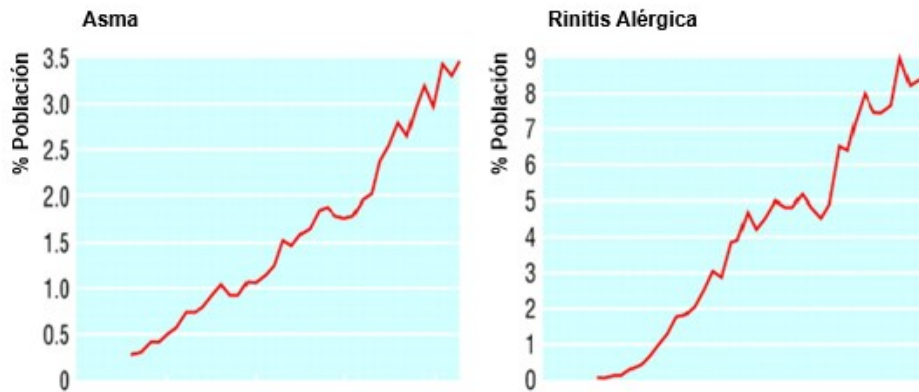


Figura 3.- Tendencia en la prevalencia de asma y rinitis en un estudio Finlandés, 1966-2003 (28).

La epidemiología de la rinitis y el asma permite ver que existe una clara relación entre ambas condiciones, observándose que la prevalencia de la rinitis es al menos el triple que la del asma (28,29). Otra observación interesante es que la mayoría de los afectados con asma también padecen rinitis (Figura 4).



Figura 4.- Relación entre asma y rinitis en un estudio realizado en población danesa (30).

1.3.~ CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

ASMA

El asma se manifiesta en forma de crisis recurrentes, con una intensidad y frecuencia variables. Se caracteriza por síntomas torácicos intermitentes, obstrucción reversible de las vías respiratorias e hiperreactividad bronquial (8,11,31,32).

Entre los síntomas torácicos intermitentes se encuentran la tos (habitualmente no productiva), las sibilancias, la opresión torácica, la disnea y, en determinadas circunstancias, la expectoración. La hiperreactividad bronquial no es exclusiva del asma y se describe como una sensibilidad anormal de las vías respiratorias (8,11,31,32).

RINITIS

La rinitis se caracteriza por síntomas relacionados con la hipersensibilidad de las fosas nasales como picazón nasal, estornudos, rinorrea y obstrucción nasal (16). Estos síntomas se producen durante dos o más días consecutivos durante más de una hora en la mayoría de días (33).

Cuando se asocia con una respuesta inmunitaria mediada por IgE frente a alérgenos se denomina rinitis alérgica. Además, se puede presentar de forma perenne o de forma estacional inducida por polen, en este caso se denomina rinitis alérgica estacional (3). A menudo se asocia con síntomas oculares y se puede clasificar como rinitis intermitente o persistente (16).

1.4.~ DIAGNÓSTICO

ASMA

El diagnóstico del asma se inicia mediante la exploración física del paciente y la recogida de información para su historia clínica. El diagnóstico se apoya en la evaluación

de los síntomas en un contexto de variabilidad funcional pulmonar provocada por factores desencadenantes.

La variabilidad funcional pulmonar se valora realizando las siguientes pruebas: espirometría basal, prueba de broncodilatación y pruebas de provocación bronquial. La posible base alérgica del asma se estudia mediante pruebas cutáneas intraepidérmicas con una batería de aeroalérgenos adaptada a la zona del paciente o a su característica; también se pueden determinar los niveles de IgE total e IgE específica. Para descartar otras patologías se deben valorar todos los datos de manera conjunta y utilizar los medios diagnósticos necesarios (8,32).

RINITIS

El diagnóstico de la rinitis es básicamente clínico. La historia clínica resulta esencial para el diagnóstico y para la valoración de su gravedad (16). El diagnóstico de rinitis se basa en la concordancia entre los síntomas y las pruebas diagnósticas. Los síntomas típicos son rinorrea, estornudos, obstrucción nasal, prurito nasal y es muy característico que se asocie conjuntivitis (16).

La estacionalidad de los síntomas o su aparición al contacto con determinados alérgenos incrementa la sospecha clínica. Si se sospecha rinitis ocupacional se realizarán pruebas de provocación nasal. Se puede realizar una endoscopia nasal para excluir causas estructurales en las fosas nasales (32).

La posible base alérgica de la rinitis se estudia, al igual que en el caso del asma alérgica, mediante pruebas cutáneas intraepidérmicas con una batería de aeroalérgenos adaptada a la zona del paciente o a sus características y se pueden determinar los niveles de IgE total e IgE específica. Se deben valorar todos los datos de manera conjunta y, en cualquier caso, siempre ligados con la clínica.

1.5~ FACTORES DE RIESGO DEL ASMA Y LA RINITIS ALÉRGICA

En la actualidad, se desconocen las causas responsables de la aparición del asma y la rinitis. Se piensa que su aparición es el resultado de una compleja interacción entre

una predisposición genética y diversos factores genéticos y ambientales, que se entremezclan de manera compleja, originando la susceptibilidad a dichas enfermedades. Por este motivo, estas enfermedades presentan una importante heterogeneidad fenotípica, es decir, presentan múltiples formas de manifestación.

En el asma y la rinitis existen factores de riesgo que provocan la aparición de los síntomas. Entre ellos cabe destacar:

1.5.1~ GENÉTICA

Las enfermedades atópicas (asma, rinitis, eczema) presentan fenotipos complejos, no solo por la influencia de una gran diversidad de factores ambientales, sino porque el componente genético se comporta de forma compleja. Se cree que el carácter poligénico de las enfermedades atópicas está influenciado por interacciones entre múltiples genes y por múltiples variantes genéticas. La identificación de genes de la enfermedad se ve dificultada por la cantidad de fenotipos resultantes de la heterogeneidad de *loci*, la penetrancia incompleta y otros factores no genéticos, muchos de ellos probablemente desconocidos (34). La contribución genética en el desarrollo de asma y rinitis alérgica tiene su propio apartado más adelante.

1.5.2~ TABAQUISMO

Ser fumador activo o pasivo aumenta el riesgo de desarrollar asma en la edad adulta. Se ha demostrado que cuantos más intenso es el tabaquismo, mayor es el riesgo de desarrollar asma. Además, parece ser que el tabaco y los aeroalérgenos combinados tienen un efecto aditivo o sinérgico (10).

Por otra parte, se ha observado que los asmáticos fumadores presentan más sintomatología, mayor morbilidad y peor calidad de vida que los asmáticos no fumadores (35). Esto podría ser debido al daño producido en la mucosa de las vías respiratorias, que puede manifestarse a través de un aumento de concentración de la IgE asociado al tabaco (36).

Estos hallazgos se traducen en una disminución acelerada de la función pulmonar en los asmáticos fumadores, una mayor gravedad y un peor control del asma, así como una reducción de la capacidad de respuesta a los glucocorticoides (37).

El daño producido en las vías respiratorias de fumadores con asma parece localizarse a nivel de las células epiteliales, lo cual aumenta la producción de moco y la disnea. Este daño no se observa en las células epiteliales de los ex fumadores y los no fumadores, lo cual sugiere que los cambios inducidos por el tabaco pueden revertir tras dejar de fumar (38).

Por último, el consumo de tabaco podría interferir en el tratamiento del asma reduciendo la efectividad de los corticosteroides a través de la generación de peroxinitrito, disminuyendo la actividad de la histona deacetilasa (HDAC), permitiendo, así, que los genes relacionados con la inflamación permanezcan activados mientras el peroxinitrito siga produciéndose (Figura 5) (37).

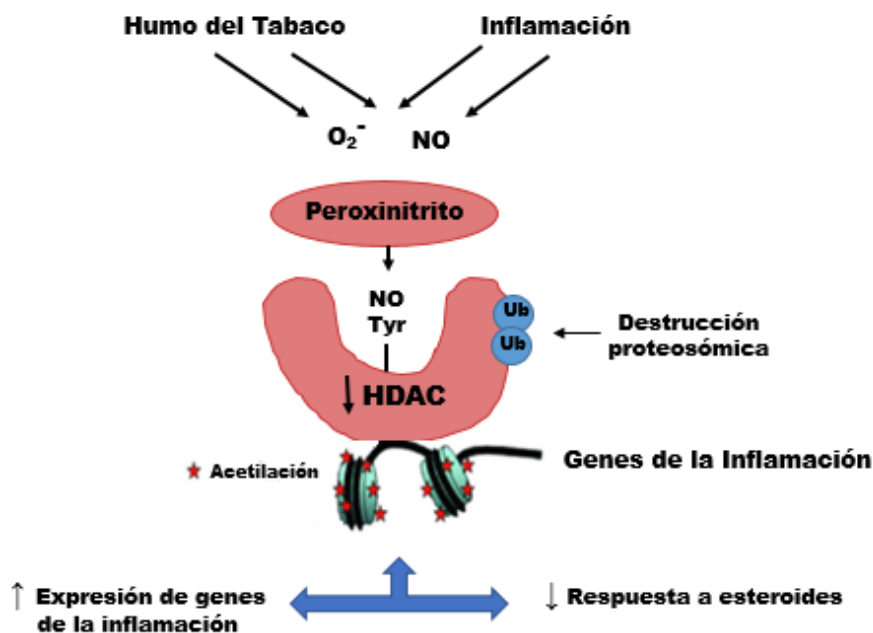


Figura 5.- Posible mecanismo de interferencia del tabaco en la acción de los corticosteroides (37).

1.5.3~ OBESIDAD

La incidencia de asma en pacientes con sobrepeso se incrementa en un 50 % (39). El mecanismo que permite la asociación del asma con la obesidad es complicado, y se ha relacionado con el aumento de adipocitocinas como la leptina y resistina, y la disminución de adiponectina en el tejido adiposo visceral. La leptina y la adiponectina pueden tener efectos directos en la inflamación de las vías respiratorias durante el ataque de asma (Figura 6) (10). Así, la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias, ya que inhibe los efectos proinflamatorios de citoquinas como TNF- α e IL-6, e induce la expresión de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10 y el antagonista del receptor de la IL-1 (40). Por su parte la leptina tiene un efecto proinflamatorio aumentando la producción de citoquinas estimuladoras de lipopolisacárido (LPS) por macrófagos y monocitos, aumentando la producción de citoquinas Th1 y disminuyendo las citoquinas Th2, lo que sugiere que la leptina puede desempeñar un papel en el asma (41,42).

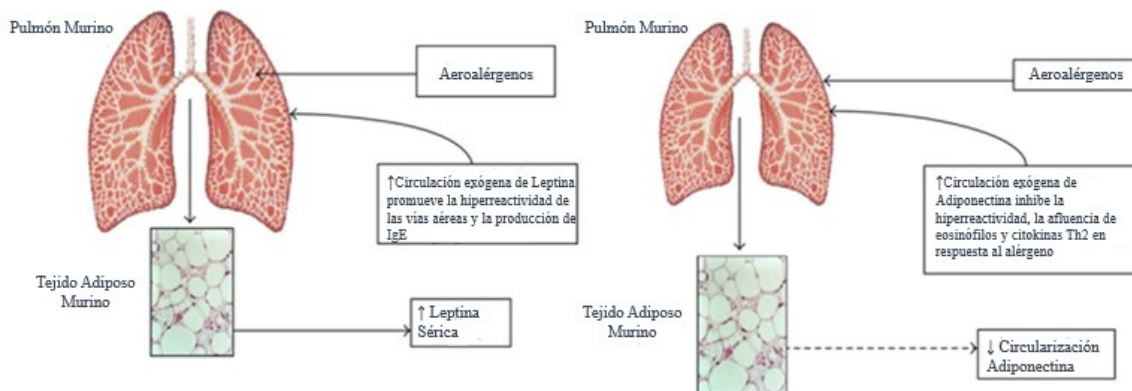


Figura 6.- Representación esquemática del papel sugerido para la adiponectina y leptina en la inducción del asma por alérgenos en un modelo murino. Modificada (42).

Además, el aumento del índice de masa corporal (IMC) se ha asociado con el incremento de manera paralela en la prevalencia de enfermedades alérgicas (40,43). Algunos autores creen que una explicación alternativa pueda ser que el sobrepeso y el

asma tenga factores de riesgo en común relacionados con el estilo de vida, la dieta o un bajo nivel de actividad física, en vez de que el sobrepeso sea el causante del asma (43). Por último, se ha observado en estudios de asociación en genoma completo, GWAS (*Genome-wide association study*), que existen regiones cromosómicas, como 5q, 6p, 11q y 12q, donde se localizan genes candidatos tanto para la obesidad como para el asma (41).

1.5.4~ ESTRÓGENOS

Los estrógenos desempeñan un papel dispar en las enfermedades alérgicas. Los datos epidemiológicos indican que el asma es más prevalente y grave en las mujeres adultas. Esto puede ser debido a la asociación de los estrógenos con cambios en el mecanismo de la inflamación de las vías respiratorias. Parece ser que el efecto depende de la concentración de hormona presente (44). También se ha observado que la prevalencia del asma disminuye tras la menopausia y con el uso de anticonceptivos, y que el riesgo aumenta con la terapia de reemplazo hormonal postmenopáusica (10). Algunos de los efectos de los estrógenos potencialmente relacionados con el asma se muestran en la figura 7.

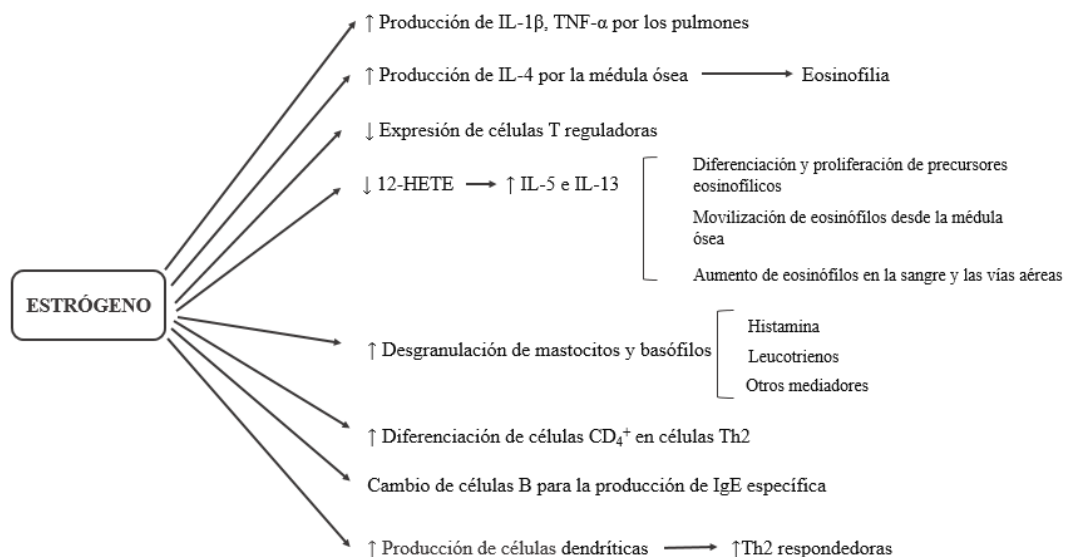


Figura 7.- Representación esquemática de algunos de los efectos de los estrógenos en células inmunes y moléculas con potencial interés en el asma (45).

Curiosamente, se ha demostrado una relación entre el asma y una hormona relacionada con los estrógenos, la oxitocina. Los receptores para la oxitocina se incrementan con el aumento de estrógenos y, recientemente, se ha descubierto que los receptores de oxitocina se expresan a niveles bajos en las células musculares lisas de las vías respiratorias. Estos receptores aumentan en el caso de aumentar la IL-13 y el TNF- α , que son mediadores de la inflamación en el asma; este hallazgo sugiere un papel de los receptores de oxitocina en el empeoramiento del asma durante el embarazo (45).

1.5.5~ INFECCIONES

Siempre han estado relacionadas con las enfermedades alérgicas. Se ha observado que el control del asma empeora cuando se produce una infección viral, particularmente por los rinovirus. Se ha confirmado que el 80-85 % de los niños asmáticos con infección viral sufrían una crisis de asma (46). También se ha observado que el riesgo de desarrollar asma aumenta en caso de infecciones por el virus respiratorio sincitial (VRS) y de rinovirus en las primeras etapas de la vida. Se ha demostrado que la infección por VRS en la infancia puede alterar el equilibrio en la respuesta inmune Th1/Th2, a favor de una respuesta Th2 de sensibilización a aeroalérgenos, pudiendo inducir, de este modo, el desarrollo de un fenotipo asmático (47).

Estudios recientes han descubierto que determinadas bacterias, como *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* podrían estar implicadas en el aumento de la inflamación y la sensibilización a factores estimulantes de la misma que causan ataques de asma (46). Otros estudios han implicado a la *Bordetella pertussis* y al virus del sarampión con el aumento de riesgo de desarrollar asma tardíamente en la vida (10). Varios estudios sugieren que la exposición a algunos agentes infecciosos y endotoxinas bacterianas puede mejorar la protección frente a la atopía, mientras que otras infecciones parecen estar relacionadas con el desarrollo de las enfermedades alérgicas (46).

La exposición a agentes infecciosos podría acelerar la disminución de la respuesta Th2, que se encuentra aumentada en las primeras semanas de vida; en relación a este punto, varios estudios han demostrado una relación inversa entre atopía y la respuesta a tuberculina, hepatitis A, e infección por sarampión en la infancia (Figura 8) (48).



Figura 8.- Esquema resumido donde la exposición a infecciones podría estar relacionada con la respuesta del sistema inmune y el desarrollo de las enfermedades alérgicas (49).

1.5.6~ ANTIBIÓTICOS

Recientemente se ha observado un aumento del riesgo de rinitis alérgica en niños que recibieron antibióticos en su primera semana de vida (50). La influencia de la microbiota intestinal en la vida temprana podría proteger frente al desarrollo de enfermedades alérgicas mediante la supresión de respuesta inmune dirigida por células Th2, siendo así más dominante la respuesta inmune dirigida por las células Th1. Por tanto, determinados cambios en la microbiota intestinal se asocian con una mayor prevalencia a desarrollar enfermedades alérgicas (50); por eso, parece ser que a través de la inhalación y exposición a los metabolitos de la fermentación bacteriana podrían influir en el desarrollo de la alergia y el asma (Figura 9) (51).

El efecto inmunomodulador de la microbiota se ha caracterizado en un estudio en el que se comprobó que los niños alérgicos presentaban menor cantidad de *Lactobacillus* y mayor de microorganismos aerobios, como coliformes y *Staphylococcus aureus*, en su flora intestinal en comparación con los niños no alérgicos (52). De hecho, se ha sugerido que la menor prevalencia de alergia entre los agricultores puede ser debida a la exposición a leche sin pasteurizar, que contiene gran cantidad de *Lactobacillus* (48).

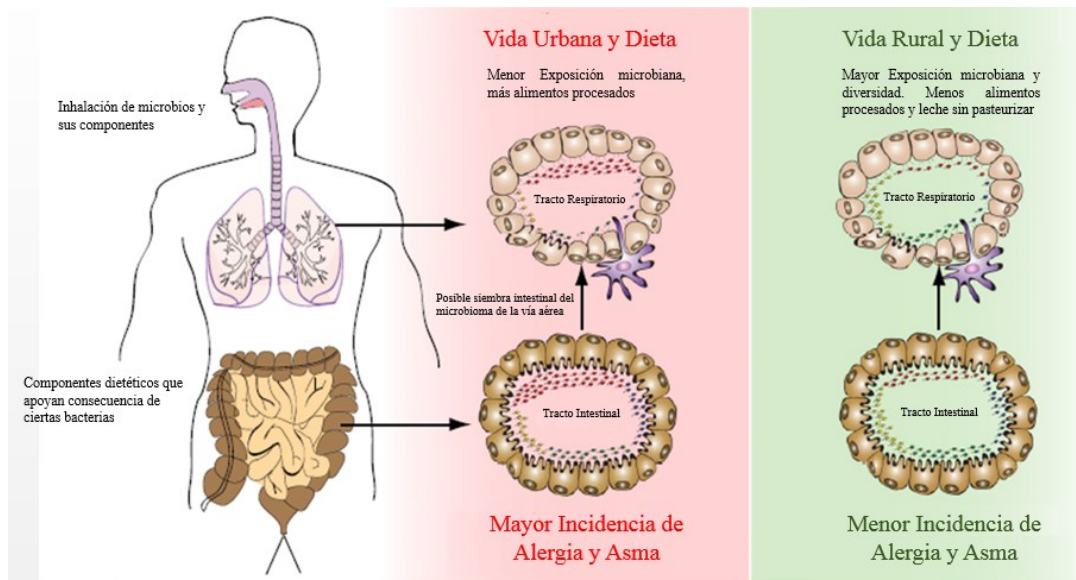


Figura 9.- La exposición microbiana directa a través de la inhalación y la microaspiración o la exposición a los metabolitos de la fermentación bacteriana mediada de componentes de la dieta podrían ser factores que influyen en el desarrollo de la alergia y el asma (52).

1.5.7~ ESTRÉS

Determinados estudios longitudinales indican que los niveles elevados de estrés aumentan de 2 a 3 veces el riesgo de sufrir asma (10). Se ha demostrado que el estrés modula y activa un número de vías biológicas que pueden estar implicadas en la fisiopatología del asma, entre las cuales se encuentra la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.

La activación de dicho eje compromete la producción de cortisol y adrenalina, que puede también activar la respuesta inmune mediada por células Th1 y Th2. De este modo, se puede alterar el sistema psicológico, inmunológico y endocrino, contribuyendo al comienzo del asma (10).

En el caso de la rinitis alérgica se ha demostrado un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias asociado a un episodio de ansiedad generado tras una situación de estrés (53). De esta forma, aumentaría la inmunidad humoral a expensas de

la inmunidad mediada por células, proporcionando el mecanismo por el cual el estrés favorece la producción de IgE.

Durante el estrés se producen cambios inmunológicos, como el cambio de respuesta Th1 a Th2, lo que puede fomentar la aparición de respuestas alérgicas en individuos susceptibles. De hecho, el cambio de respuesta Th1 a Th2 puede deberse a los niveles de cortisol o noradrenalina, controlados por el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y, por tanto, controlado por la situación emocional del individuo.

En un estudio reciente, en el que se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas antes y después de una situación de estrés que desencadenó un episodio de ansiedad, todos los individuos presentaron un diámetro de la pápula mayor tras la situación de estrés (54). Parece ser que el aumento de ansiedad se asocia con un aumento de IL-6 que aumenta y prolonga los síntomas de rinitis alérgica. También se demostró que la ansiedad aumenta los efectos del estrés sobre la respuesta de fase tardía (54).

Por último, se ha demostrado que la exposición maternal a eventos estresantes durante el embarazo aumenta el riesgo del futuro niño de padecer asma, rinitis alérgica y eczema en la infancia (55,56).

1.5.8~ FACTORES MATERNOS

Baker observó que los eventos intrauterinos podrían tener consecuencias para la vida del niño. Esto ha provocado un gran interés en el papel de los eventos intrauterinos para explicar el origen de muchas enfermedades crónicas (48).

En modelos murinos se ha demostrado que durante el embarazo la unidad feto-placentaria produce citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), que inhiben la actividad Th1 maternal con el fin de proteger el embarazo. Asimismo, la producción de citoquinas Th1 (IFN- γ , IL-2 y TNF- β) se asocia con compromiso del embarazo (Figura 10). Por esta razón la respuesta inmune fetal se encuentra sesgada hacia una respuesta Th2 (48).

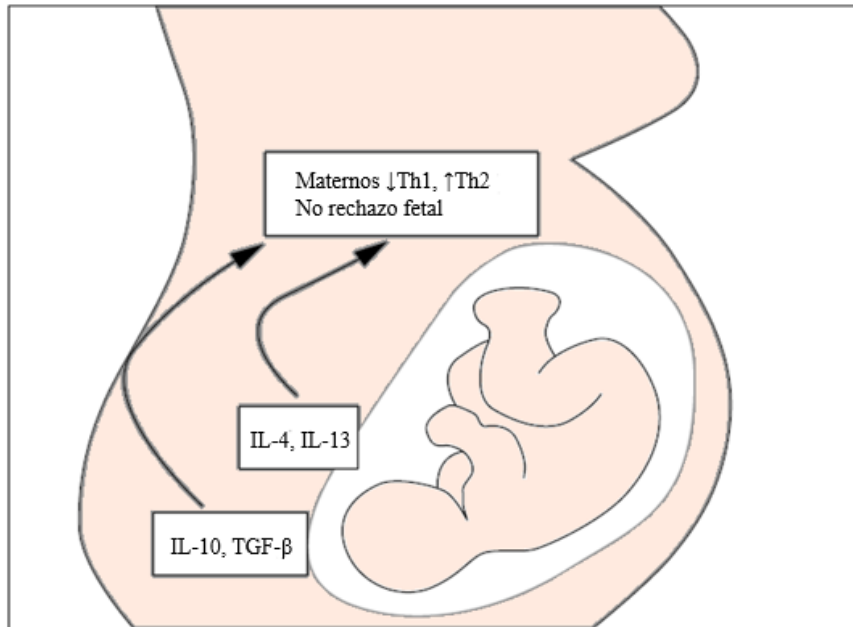


Figura 10.- Las citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) están relacionadas con el mantenimiento del embarazo y los linfocitos T reguladores fetales que segregan citoquinas (IL-10 y TGF-β) dirigidas a disminuir la respuesta Th1 de la madre (48).

Parece ser que una alteración en el equilibrio de la producción de citoquinas desempeña un papel importante en el riesgo de desarrollar alergia. Así por ejemplo, se ha observado que el riesgo es mayor en el caso de atopia materna; se piensa que esto pueda ser debido a que la madre presenta niveles más altos de IgE, los cuales son proporcionales a los que se encuentran en el líquido amniótico a pesar de que la IgE no atraviesa la placenta (57).

La presentación antigénica facilitada por IgE permitiría la sensibilización a concentraciones extremadamente bajas del alérgeno (48,57). Este mecanismo de sensibilizar al feto con una respuesta sesgada hacia Th2 pudo haber evolucionado como método de protección frente a la exposición a parásitos maternos del tipo de los helmintos (57).

1.5.9~ AEROALÉRGENOS

Los aeroalérgenos están implicados en el asma y la rinitis alérgicas. Se clasifican como aeroalérgenos de interior (principalmente ácaros, epitelios, y algunos hongos) o exterior (pólenes y hongos). Los alérgenos de exterior parecen estar relacionados con un mayor riesgo de rinitis estacional, mientras que los alérgenos de interior están más relacionados con el riesgo de padecer asma o rinitis perennes.

Sin embargo, estudios que utilizan la clasificación ARIA muestran que más del 50 % de los pacientes sensibilizados presenta rinitis persistente y la mayoría de pacientes sensibilizados a ácaros padece rinitis alérgica intermitente leve (16). La prevalencia de sensibilización mediada por IgE a alérgenos de interior se correlaciona con la frecuencia del asma y su gravedad (16).

1.5.10~ CONTAMINACIÓN DEL AIRE

Los estudios epidemiológicos sugieren una fuerte asociación entre la contaminación del aire y las exacerbaciones del asma, rinitis y otras enfermedades alérgicas. Los contaminantes aéreos se pueden clasificar de diferentes maneras, como se muestra en la tabla 2.

En experimentos realizados con animales se ha demostrado que la hipersensibilidad a la ovoalbúmina es más fácil de inducir cuando se expone a los animales a emisiones de partículas de diésel u ozono (O₃) (46). Por esto, se ha sugerido que las modificaciones de los epitelios influyen directamente sobre cómo actúa el sistema inmune, aumentando la respuesta a los antígenos. El aumento de niveles de O₂ y NO₂ se ha asociado a un mayor riesgo de ingreso por asma, tanto en niños como en adultos (46). También las partículas de combustión de los motores diésel (DEP) intensifican la sensibilización a alérgenos; teniendo en cuenta que hasta el 30 % de DEP inhaladas puede depositarse en los alveolos, podemos entender la importancia que tiene considerando que tienen un efecto adyuvante (46). Las partículas de escape diésel alteran las respuestas a citoquinas, provocan un aumento de IgE y una activación preferencial de células Th2 (16).

Tabla 2.- Clasificación de los contaminantes aéreos (58).

Según el mecanismo de producción	
Primarios	Emitidos directamente a la atmósfera (SO ₂ , NO _x , CO, Partículas)
Secundarios	Formados en el aire como resultado de reacciones químicas (O ₃ , NO _x y algunas partículas)
Según la localización	
De interior	Productos de combustión (humo de tabaco, leña), CO, CO ₂ , compuestos orgánicos volátiles (hidrocarburos, aldehídos, benceno, tolueno), agentes microbiológicos, polvos orgánicos, radón, fibras de vidrio, etc.
De exterior	SO ₂ , O ₃ , NO _x , CO, partículas y compuestos orgánicos volátiles
Según las características físico-químicas	
Gaseosos	SO ₂ , O ₃ , NO _x , CO, compuestos orgánicos volátiles (dioxinas, bencenos, aldehídos, 1,3 butadieno)
Partículas	Gruesas (2,5-10µm), finas (0,1-2,5 µm) y ultrafinas (< 0,1 µm)

1.5.11~ DIETA

El aumento de la riqueza en los países desarrollados ha crecido en paralelo al aumento de la prevalencia del asma. Esto puede ser debido al empobrecimiento de la dieta en consumo de frutas, verduras y patatas que parece haber aumentado los niveles de enfermedades atópicas. Estos alimentos son la principal fuente de antioxidantes como la vitamina C y los carotenos (59).

Se ha demostrado, en ratones, cómo el ácido retinoico desempeña un papel importante sobre el equilibrio Th1/Th2 ya que tiene la capacidad de inhibir la producción de IgE dependiente de IL-4 en células B (60).

Por otra parte, la deficiencia de vitamina D en los países industrializados puede afectar al desarrollo fetal del pulmón y del sistema inmune. Se postula que esta deficiencia

tendría un papel crucial en el desarrollo del asma (61). También se ha demostrado que la vitamina D desempeña un papel importante en el desarrollo de rinitis alérgica, tanto en hombres como en mujeres de origen europeo (62); los datos parecen replicarse en etnias diferentes, como muestra un estudio coreano (63).

En cuanto a los beneficios de la dieta sobre la sintomatología, en un estudio realizado en niños se estudió la prevalencia de rinitis alérgica y se asoció a los hábitos alimenticios, concluyendo que el consumo frecuente de cereales, arroz, pasta y chocolate puede tener un efecto beneficiosos sobre los síntomas de la rinitis (64).

Por otra parte, en cuanto al embarazo, se ha observado que la ingesta de leche y cacahuete por parte de la madre se ha asociado con una reducción en el riesgo a padecer asma y rinitis alérgica en los niños (65). Además, en una revisión se llegó a la conclusión de que una dieta materna saludable rica en antioxidantes y ácidos grasos omega-3 durante el embarazo y del niño durante la infancia puede reducir significativamente la prevalencia y la incidencia de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica, incluso en niños con una predisposición hereditaria a padecer atopia (66). No obstante estos datos no están universalmente aceptados.

Otros estudios han apercibido que el consumo de refrescos se asocia con un mayor riesgo de desarrollar asma (67). Además se sugirió que los yogures bajos en grasa pueden estar detrás de un aumento de riesgo de padecer asma y rinitis alérgicas en niños cuyas madres se han alimentados de los mismos durante el embarazo (68).

1.6.~ SENSIBILIZACIÓN

Generalmente se acepta que la exposición a los alérgenos es un prerrequisito para la sensibilización a alguno de ellos, por ello es necesario comenzar definiéndolos. La EAACI como la WAO define alérgeno como una proteína o glicoproteína capaz de unirse a la IgE (69,70). Por otro lado, la WAO define la monosensibilización como la sensibilización a una fuente, familia taxonómica o grupo de alérgenos, como los ácaros; esta amplitud de definición puede dificultar la comprensión de los estudios de sensibilización. En cambio, la polisensibilización es la sensibilización confirmada a

través de pruebas cutáneas intraepidérmica o ensayos de IgE específica a dos o más fuentes, familias taxonómicas o grupos de alérgenos (70). Además la polisensibilización puede ser dividida en, sensibilización/reactividad cruzada y cosensibilización. En la sensibilización/reactividad cruzada la misma molécula de IgE puede unirse a diferentes alérgenos con características estructurales comunes, mientras que en la cosensibilización diferentes moléculas de IgE se unen a grupos de alérgenos que pueden no tener necesariamente características estructurales comunes (71).

Los primeros estudios que intentan definir la monosensibilización y polisensibilización comienzan en la década de los 90. Un estudio realizado en población de 3-74 años diagnosticada de asma y/o rinitis concluye que los pacientes polisensibilizados tienen una edad media inferior que los monosensibilizados (16,69 años frente a 21,89 años) y, además que la sensibilización a ácaros y polen de árboles se asocia más frecuentemente con síntomas asmáticos (72).

En las siguientes décadas, diferentes sociedades y grupos de investigación han seguido estudiando la sensibilización para definirla. En un estudio de la *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS) realizado en población general utilizan pruebas cutáneas y niveles de IgE específica para definir la monosensibilización y polisensibilización. La mediana de edad de la población fue de 34 años y un pequeño porcentaje estaba diagnosticado de asma y/o rinitis. Se estimó que entre el 57 % y un 67,8 % de la población europea no está sensibilizada a ningún alérgeno, del 16,2 % al 19,6 % eran monosensibilizados y del 12,8 % al 25,3 % eran polisensibilizados, llegan a la conclusión de que al aumentar el número de alérgenos utilizados para las pruebas cutáneas aumenta la prevalencia de sujetos sensibilizados y, más concretamente, los polisensibilizados (73).

El tercer estudio de la *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) investigó la sensibilización a 10 alérgenos comunes en los Estados Unidos en población general entre 6 y 59 años. Mediante pruebas cutáneas observaron que el 45,7 % de la población no estaba sensibilizado, el 15,5 % de la población presentaba monosensibilización y el 38,8 %, polisensibilización (74). La mayor prevalencia fue para los ácaros del polvo y el pico de mayor sensibilización se produjo en la 3ª década de la

vida (74). Además la prevalencia es mayor en los varones que en las mujeres al igual que los niveles de IgE total (75).

En otro estudio realizado, en el que se utilizó población militar por su elevada movilidad, se investigó la prevalencia de sensibilización a una batería de 53 alérgenos en pacientes con síntomas de rinitis. Se observó que el 81,6 % de los pacientes estaba sensibilizados, que la sensibilización era ligeramente superior en los varones pero no había diferencias significativas respecto a las mujeres, y que, de todo el conjunto de sensibilizados, el 9,2 % estaba monosensibilizado a un único alérgeno. También se concluyó que la población entre 10-19 años presentaba un número más elevado de pruebas cutáneas positivas, si bien la prevalencia de la atopia fue mayor entre 30-39 años con un 85,5 %. Los alérgenos más comunes de la batería a los que presentaban sensibilización fueron las gramíneas, el cedro y los ácaros del polvo (76).

En otro estudio con pacientes diagnosticados de asma leve o moderada, únicamente no presentaba sensibilización un 5 % de los casos y estaba sensibilizado a 1 o 2 alérgenos el 14 %, y a 3 o más alérgenos el 81 % de los casos. Además, se observó que los niveles de IgE total, el NO exhalado y la PC₂₀ se correlacionaban con la sensibilización a los alérgenos (77). Por lo tanto, la polisensibilización es más prevalente que la monosensibilización (78).

En España se realizó un estudio conjunto entre España y Portugal, en el que se estudió una población diagnosticada con rinitis alérgica en una población con edades comprendidas entre los 10 y 50 años, con una edad media de 27 años. De entre la batería de 20 aeroalérgenos utilizada se observó que los ácaros del polvo (*Dermatophagoides*), el polen de las gramíneas y el olivo eran los aeroalérgenos más prevalentes. En este trabajo se concluyó que los sujetos con asma están sensibilizados significativamente a un mayor número de aeroalérgenos, además de que su nivel de gravedad estaba relacionado con las características de la rinitis alérgica (79).

En estudios efectuados en población general infantil el 39,9 % presentaba sensibilización, el 12,4 % eran monosensibilizados (73 % a aeroalérgenos y 27 % a trofoalérgenos), el 18,9 % estaba sensibilizados a 2-4 alérgenos y el 8,6 % fue sensible a

5 o más alérgenos (80). El alérgeno más común entre los monosensibilizados fueron los ácaros del polvo, seguidos del polen de gramíneas y el polen de árboles. Los valores de IgE total en suero y la cosensibilización entre alérgenos biológicamente no relacionados sugiere que la polisensibilización es la expresión de una clínica distintiva, que podría demostrar que forman parte de un fenotipo más grave de atopia. Además, se demostró que los niveles de IgE se incrementaron con el aumento del número de sensibilizaciones (80).

En un estudio sobre la calidad de vida de los pacientes con asma intermitente se llegó a la conclusión de que la sensibilización a múltiples alérgenos estaba significativamente asociada con una peor calidad de vida, con lo cual concluyen que es debido a que un paciente polisensibilizado con asma presentará durante mayor tiempo inflamación de las vías respiratorias, al estar más tiempo expuesto a aquello que provoca la inflamación (81).

Por último indicar que hay estudios que sugieren que los efectos de los SNP pueden ser diferentes para diferentes antígenos (82,83). Así por ejemplo, en población lituana diagnosticada de rinitis alérgica se ha observado que existen 13 SNP conocidos que fueron asociados con la sensibilización alérgica a aeroalérgenos específicos (84).

1.7.~ GENÉTICA DEL ASMA Y LA RINITIS

A principios del siglo XX, los estudios en familias evidenciaron la asociación entre el asma y un factor familiar, demostrando así que las enfermedades atópicas tenían una base genética (85,86).

En la década de los 80 aparecieron los primeros estudios de segregación familiar y de gemelos monozigóticos y dizigóticos (87), cuyo objetivo era definir el patrón de herencia. El resultado de todos estos estudios fue determinar que el asma no sigue un patrón de herencia mendeliana clásico, típico de trastornos provocados por un solo gen, sino que es un síndrome multifactorial consecuencia de la interacción compleja entre diversos factores genéticos y ambientales (88).

A partir de los 90 empieza a entenderse el asma como una enfermedad compleja y multifactorial, en la que existen gran variedad de fenotipos, que indican que pueden influir gran cantidad de genes.

La complejidad genética del asma se debe a que varios genes están implicados en la patogénesis (la herencia sería poligénica), a que diferentes combinaciones de genes actúan en diferentes familias (heterogeneidad genética), y a que un mismo gen o conjunto de genes influyen en múltiples rasgos (pleiotropía), por ejemplo, en el caso del asma y el eczema.

Por otra parte, las influencias ambientales darían lugar a una complejidad mayor para comprender como se expresa el asma, aunque el principal problema es el hecho de que hay dificultades para estandarizar el diagnóstico del mismo (87).

En la siguiente década, con el desarrollo de la epigenética, que estudia cómo se producen cambios reversibles en el material genético debidos a múltiples factores ambientales (89), comienza a entenderse cómo interacciona el ambiente y qué repercusiones tiene para el desarrollo de la enfermedad.

En cuanto a la rinitis alérgica, al igual que otras enfermedades atópicas, se ha demostrado, en estudios de segregación familiar y estudios gemelares monozigóticos y dizigóticos, la importancia del componente genético para la expresión de la misma. La complejidad de esta enfermedad es similar a la de otras enfermedades atópicas en las que los factores ambientales complican la comprensión de la misma (90,91).

1.7.1~ ESTVDIOS GENÉTICOS

Para estudiar los genes relacionados con el asma y la rinitis alérgica se han realizado distintos tipos de estudios entre los que destacan los estudios de ligamiento y los estudios de asociación de genes candidatos.

ESTVDIOS DE LIGAMIENTO

Los estudios de análisis de ligamiento son la primera aproximación empleada para el estudio de los factores genéticos del asma. Estos estudios tienen como fin determinar en el genoma de enfermos emparentados aquellos factores genéticos que han podido heredar y puedan actuar como marcadores genéticos del desencadenamiento de la enfermedad.

Las regiones del genoma que albergan *loci* de susceptibilidad entre familiares afectados serán compartidas con más frecuencia de lo esperado por el azar; así, entre hermanos se deberán buscar *loci* que se compartan más del 50 % de las veces. De esta forma se obtiene información de genes o regiones que albergan múltiples variantes raras que confieren riesgo para la enfermedad (1).

El uso de estudios de este tipo ha estado motivado por dos consideraciones: permitían identificar nuevos genes y rutas implicadas, ya que no requieren hipótesis *a priori*, y eran ideales para la identificación de alelos con gran efecto fenotípico (92).

ESTVDIOS DE ASOCIACIÓN

Los estudios de asociación de genes candidatos se basan en seleccionar genes que intervienen en una patología. En estos estudios se comparan frecuencias alélicas y genotípicas entre sanos y enfermos sin ningún tipo de lazo familiar. La combinación de marcadores genéticos que tienden a heredarse juntos contenidos en un cromosoma se denomina haplotipo. Estos haplotipos son los que se estudian en población enferma para determinar qué marcadores genéticos comparten o cómo la combinación de dichos marcadores dan lugar a diferentes fenotipos de la enfermedad. A diferencia de los estudios de ligamento, los estudios de asociación tienen más capacidad para detectar polimorfismos que confieren un rasgo moderado para desarrollar la enfermedad (93).

La principal ventaja de los estudios de asociación respecto de los estudios de ligamiento es que se pueden detectar genes con pequeños efectos utilizando el mismo tamaño de muestra usado en un estudio de ligamiento. Además, la obtención de muestras es más sencilla, ya que es más difícil obtener la colaboración de familias que de personas

no emparentadas. Otro problema de los estudios de asociación de casos y controles es la estratificación de la población, que podría incrementar el error de tipo I y generar diferencias en las frecuencias alélicas entre enfermos y sanos que no se debieran a la enfermedad (94)

Los estudios de asociación en genoma completo (GWAS: *Genome Wide Association Studies*) son un tipo de estudios de asociación donde se analizan miles de polimorfismos que se encuentran repartidos por todo el genoma. El objetivo de estos análisis es relacionar algunos de estos polimorfismos con la susceptibilidad a padecer una determinada enfermedad o algún síntoma relacionado con una enfermedad. Este tipo de estudios es posible gracias a que actualmente se comercializan *microarrays*, que permiten genotipar desde 300.000 a más de 1 millón de polimorfismos (1).

Por otra parte, para que los resultados de estos estudios sean fiables hay que ser muy estricto caracterizando a la población en estudio, sobre todo en los controles, además de evitar la estratificación de la población (95). También es necesario que la muestra sea aceptablemente grande para que el poder estadístico sea suficiente como para identificar los alelos de baja frecuencia, ya que el poder estadístico depende del tamaño de la muestra y de la frecuencia de la variante del alelo asociado (96). El tamaño de la muestra hace que el procesamiento de datos por herramientas bioinformáticas sea complicado, a lo cual se suma el hecho de que existen problemas para replicar los resultados (95).

En la actualidad, los estudios de *microarrays* están siendo reemplazados por los estudios de *Next Generation Sequencing* (NGS) en los que mediante secuenciación de alto rendimiento se obtienen millones de secuencias cortas del genoma de una muestra. Actualmente, muchas investigaciones en el campo de la alergia están obteniendo resultados que serán publicados en los próximos años con esta técnica con la que se obtiene ingentes cantidades de información. Así por ejemplo, en el caso del asma con esta técnica, se han encontrado 316 genes que se expresan en asmáticos en un estudio en el que se investigaba la respuesta a glucocorticoides (97).

1.7.2~ PRINCIPALES GENES ASOCIADOS AL ASMA Y LA RINITIS

Se han realizado cientos de estudios genéticos de asma y rinitis en distintas poblaciones y sobre los diferentes fenotipos de los pacientes. El problema principal es que estos estudios muchas veces no son replicables. Esta baja “replicabilidad” puede deberse a tamaños de muestra pequeños o al mal diseño del estudio, por falta de comparabilidad entre casos y controles, aumentando el riesgo a los sesgos por la heterogeneidad en la exposición ambiental y la estratificación poblacional (98).

GENES DESCUBIERTOS MEDIANTE ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Los estudios de ligamiento han descubierto una gran cantidad de regiones cromosómicas ligadas al asma y la atopia; entre las regiones cromosómicas replicadas en varios estudios se encuentran 5q, 6p, 11q, 12q, 13q, 16p, 17q y 20p (99). Las regiones cromosómicas identificadas mediante este tipo de análisis son extensas e incluyen cientos de genes, de los cuales unos pocos estarían relacionados con el asma y la atopia. Por ello, muchos de los análisis de ligamiento se acompañan de clonaje posicional, que consiste en seleccionar marcadores genéticos dentro de una región cromosómica ligada para descubrir cuál es el gen relacionado con la enfermedad (Tabla 3).

Tabla 3.- Genes relacionados con la susceptibilidad al asma identificados mediante clonaje posicional (100).

Gen	Loci Cromosómicos	Gen	Loci Cromosómicos
<i>DPPI0</i>	2q14.1	<i>CYFIP2</i>	5q33.3
<i>GPRA</i>	7p14.3	<i>IRAK3</i>	12q21
<i>HLAG</i>	6p21.33	<i>COL6A5</i>	3q21
<i>ADAM33</i>	20p13	<i>OPN3/CHML</i>	1qter
<i>PHF11</i>	13q14.3		

GENES DESCUBIERTOS MEDIANTE ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN O GWAS

Debido a las ventajas de estos estudios respecto de los análisis de ligamiento se ha multiplicado la cantidad de genes descubiertos mediante esta metodología y relacionados con la susceptibilidad al asma, la rinitis y otras enfermedades alérgicas.

La mayoría de las asociaciones descritas son polimorfismos de genes que codifican proteínas implicadas en rutas relacionadas con la respuesta innata, la diferenciación y funciones efectoras de los linfocitos Th2, con la función pulmonar y la remodelación del epitelio bronquial, o la inmunidad de las mucosas (92).

En la figura 11, se pueden observar una relación de genes en cromosomas autosómicos replicados en varios estudios relacionados con el asma y la atopia.

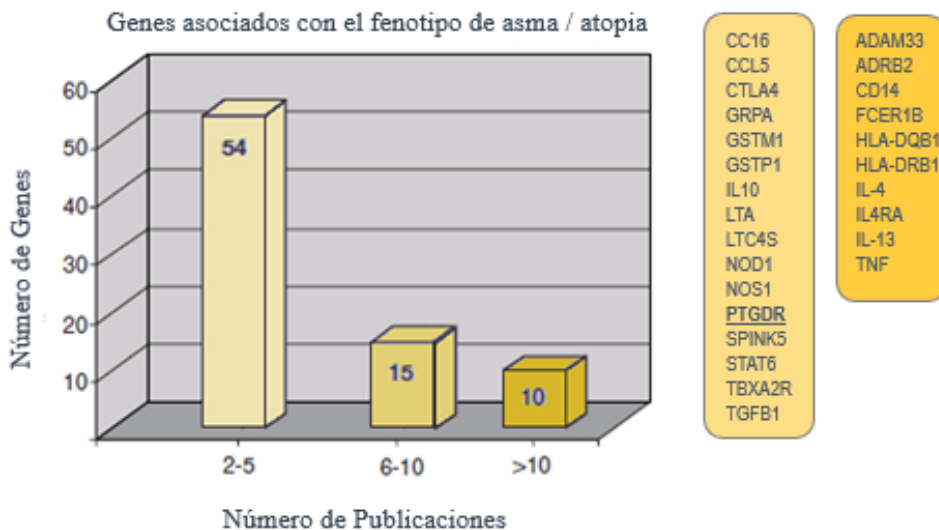


Figura 11.- Relación de genes replicados en el asma y la atopia. Modificado de (94).

1.7.3~ EPIGENÉTICA Y ALERGIA

La epigenética se define como el conjunto de cambios en la expresión génica heredables que se producen sin alterar la secuencia de ADN; intenta explicar la interacción entre genes y factores ambientales (89), en el caso de las enfermedades alérgicas los factores ambientales podrían tener un papel esencial (101).

Estudios realizados en este campo sugieren que los cambios epigenéticos pueden ser responsables de la variedad fenotípica que presentan los pacientes en cuanto a su sintomatología. Los cambios epigenéticos constituyen un conjunto de cambios reversibles en la expresión génica, que se producen sin alterar la secuencia de ADN.

Los mecanismos epigenéticos en humanos son la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los ARN no codificantes.

METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN es el proceso bioquímico por el que se añade un grupo metilo a los nucleótidos que presentan una citosina que precede en el genoma a una guanina. Estas modificaciones se localizan en sitios denominados islas CpG y ejercen un papel fundamental cuando se encuentran en las regiones promotoras de los genes, porque al ser metilados se interrumpe la transcripción génica, ya que los factores de transcripción no pueden interaccionar con la región promotora.

Así por ejemplo, se ha observado que la metilación del ADN de los linfocitos T desempeña un papel importante en el desarrollo, la activación y mantenimiento de la función efectora de estas células (101).

Se han identificado múltiples genes a partir de estudios de asociación de metilación del ADN para el asma, la atopia y exposiciones ambientales relacionadas; estos genes se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.-Genes identificados a partir de los estudios de asociación de metilación del ADN para el asma, la atopia y las exposiciones ambientales relacionadas (102).

Asociación con el fenotipo	
Asma	
Respuesta Inmune	<i>FOXP3, INF-g, STATSA, CRIP1, IL-4R</i>
Síntesis de NO	<i>ARG2</i>
Ruta Lipídica	<i>ALOX12, ASCL3</i>
Receptor Farmacológico	<i>ADRB2</i>
Atopia	
Respuesta Inmune	<i>TLSP</i>
Ruta Lipídica	<i>PTGDR</i>
Xenobióticos	<i>CYP26A1</i>
Asociación con exposición ambiental	
Humo de Tabaco	
Respuesta Inmune	<i>TGFB3</i>
Metabolismo Xenobiótico	<i>AHRR, CYP1A1</i>
Señalización	<i>NPSR1, GF11, PTPRO</i>
Oncogenes	<i>SPDEF, SNCG, AXL, MET, NBL1, KLK11</i>
Agricultura	
Respuesta Inmune	<i>STAT6, RAD50, IL13, IL4, CD14</i>
Síntesis de Esfingolípidos	<i>ORMDL1</i>
Polución	
Respuesta Inmune	<i>FOXP3, IFN-g, CTLA-4, IL-10, IL-1-R2</i>
Síntesis de NO	<i>NOS2A, NOS3, iNOS</i>
Ruta Lipídica	<i>ASCL3</i>
Metabolismo Xenobiótico	<i>CYPBRD1</i>
Señalización	<i>CLK2, MAP3K7, PIK3CG</i>
Unión a DNA	<i>ZNF445, PHF20L1, TRPS1</i>
Mascotas	
Respuesta Inmune	<i>CD14</i>

MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LAS HISTONAS

Las histonas son unas proteínas alcalinas encargadas del empaquetamiento del ADN para formar la cromatina. Las modificaciones químicas de las mismas constituyen el principal mecanismo de regulación de la cromatina. Las principales modificaciones postraduccionales son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación.

Los efectos de tales modificaciones varían desde la activación génica al silenciamiento génico. Así por ejemplo, la modificación de histonas en la cromatina de las células T desempeña un papel importante en la diferenciación de las subpoblaciones de células T, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (101).

ARN NO CÓDIFICANTES

Finalmente, otro mecanismo epigenético de regulación de la expresión lo constituyen los RNA no codificantes entre los que destacan microARN (miARN), pequeños ARN de interferencia (ARNsi), ARN asociados a Piwi (Piwi-ARNs), ARN de inicio de la transcripción (ARNti),... (103). Algunos estudios han demostrado su relación con el asma (104).

1.8.~ PTGDR Y LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

1.8.1~ PROSTAGLANDINA D₂

La prostaglandina D₂ (PGD₂) pertenece a un grupo de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico, con función autocrina y paracrina (105). Es el metabolito más abundante del ácido araquidónico sintetizado por las ciclooxigenasas (COX) y la PGD₂ sintasa (PGDS) en los mastocitos, macrófagos y otras células. En los pacientes que sufren enfermedades alérgicas, la producción de *novo* de PGD₂ aumenta con la exposición a los alérgenos (106). Se ha relacionado la producción de PGD₂ con gran variedad de enfermedades alérgicas, como el asma, la dermatitis atópica, la rinitis

alérgica y la conjuntivitis alérgica y se han detectado niveles en piel, lágrimas y secreción nasal (107).

El ácido araquidónico da lugar a la prostaglandina D₂ tras una serie de reacciones. En primer lugar, el ácido araquidónico, que se encuentra en la membrana plasmática, es hidrolizado por la fosfolipasa A₂, tras lo cual es transformado por las ciclooxygenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) en un endoperóxido cíclico, la PGG₂. Las dos isoformas de COX se encuentran presentes en las vías respiratorias: la COX-1 se corresponde con la prostaglandina H sintasa 1 (PGHS1) y se expresa constitutivamente, mientras que la COX-2 (PGHS2) es inducida durante los procesos inflamatorios. La actividad peroxidasa de estas enzimas transforma la PGG₂ en PGH₂ que es un endoperóxido inestable (106). A partir de la PGH₂, producida por ambas isoformas de COX, una serie de enzimas sintasas producen PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ y TXA₂ (Figura 12). La expresión diferencial de estas sintasas dentro de las células presentes en los focos de inflamación determina el perfil de los prostanoides producidos. Así, por ejemplo, los mastocitos generan predominantemente PGD₂ mientras que los macrófagos producen PGE₂ y TXA₂ (108).

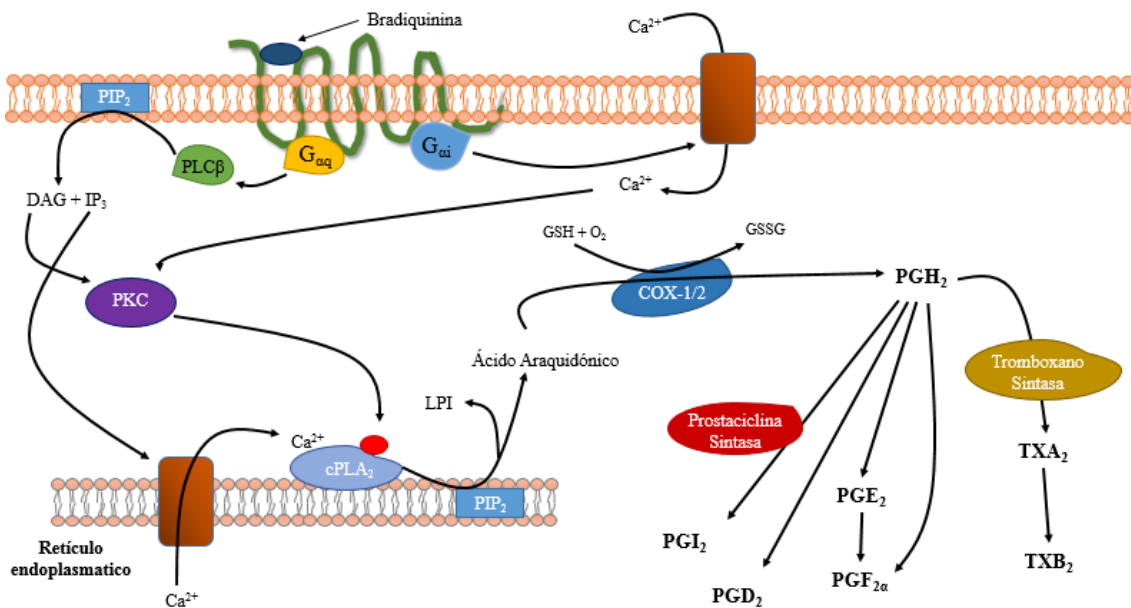


Figura 12.- Ruta del ácido araquidónico hasta la producción de PGD₂.

La PGD₂ lleva a cabo sus funciones a través de sus receptores transmembranales, PTGDR y CRTH₂ que pertenecen a la superfamilia de receptores asociados a proteínas G heterotriméricas (109). Esta prostaglandina también se une al receptor del tromboxano A₂ y a uno de los receptores de la prostaglandina E₂ (106). Los estudios han demostrado ser contradictorios con respecto a si la PGD₂ desempeña una función proinflamatoria o antiinflamatoria.

Para apoyar su función antiinflamatoria, algunos estudios han demostrado que la administración de PGD₂ disminuye la inflamación intestinal en ratas (110), así como en la dermatitis atópica (111) y la inflamación pulmonar aguda en ratones (112). Los agonistas del receptor PTGDR inhiben la migración de eosinófilos (113) y la activación de células dendríticas en modelos murinos de asma (114).

Por otro lado, la acción proinflamatoria de la PGD₂ viene apoyada por el hecho de que al administrar un inhibidor de la H-PGDS mejora la inflamación en las vías respiratorias de ratones (115), el tratamiento con agonistas de CRTH₂ agrava la dermatitis atópica y el asma en ratones, y la administración intratecal de PGD₂ promueve la migración de eosinófilos en ratas (116,117). Por tanto, parece probable que PGD₂ regule la inflamación de forma diferente dependiendo de la enfermedad (118).

1.8.2~ RECEPTOR PTGDR

El receptor de PGD₂ se denomina habitualmente receptor prostanoide D (PTGDR) o receptor prostanoide D1 (PTGDR1), y también se le conoce como DP, DP1, AS1 o ASTR1 (119). Este receptor es codificado por el gen *PTGDR*, localizado en la región 14q22.1 y fue clonado en 1994 (107).

ESTRUCTURA DE PTGDR

PTGDR está compuesto por 359 aminoácidos y su masa molecular es de 40,28 kDa (120). Este receptor posee siete dominios transmembranales, característicos de los receptores asociados a proteínas G heterotriméricas acoplados a rodopsina (107). Además, presenta tres sitios donde se puede producir la N-glicosidación de la asparragina,

en concreto en las posiciones 10, 90 y 297 de la cadena polipeptídica, que se encuentran a nivel estructural en el extremo amino-terminal, en el primer lazo extracelular y en el segundo lazo extracelular, respectivamente. También contiene una serina en la posición 50 y una treonina en la posición 145, que se corresponden con el primer y segundo lazos intracelulares, que pueden ser fosforiladas por la proteína cinasa C (PKC). Además, en el extremo carboxiterminal se encuentran seis serinas y treoninas, susceptibles de ser fosforiladas (120).

Los estudios filogenéticos que relacionan a los miembros de la familia de receptores de prostanoïdes han comprobado que existe un alto grado de homología en la secuencia polipeptídica entre PTGDR e IP, el receptor de la prostaglandina I₂ y con dos de los receptores de la prostaglandina E₂ denominados EP2 y EP4. Todos estos receptores pertenecen al grupo de los denominados receptores relajantes y están acoplados a las denominadas proteínas G estimuladoras (121).

FVNCIONES DE PTGDR

El receptor de la prostaglandina D₂ no es únicamente activado por la PGD₂, cuya vida media en sangre es corta (0,9 minutos) (122), sino que también lo activan delta¹² PGD₂ y PGJ₂ (109), aunque estos metabolitos son escasamente activos (105).

La activación de PTGDR da lugar a la elevación intracelular del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que actúa como segundo mensajero (120). Este mensajero es sintetizado por la enzima adenilato ciclasa (AC), a partir de adenosín trifosfato (ATP).

Esta enzima se encuentra en la membrana celular y es activada por la subunidad α de las proteínas G, a la cual se encuentra acoplada PTGDR. El incremento de AMPC podría activar la proteína cinasa A (PKA), aunque parece ser que para PTGDR no es este el caso, al menos en las células dendríticas y los linfocitos NK (123). Por otro lado, PTGDR puede inducir la activación de la vía de las cinasas MAP y de la PKC, además de otras rutas de transmisión de señales intracelulares (Figura 13) (109).

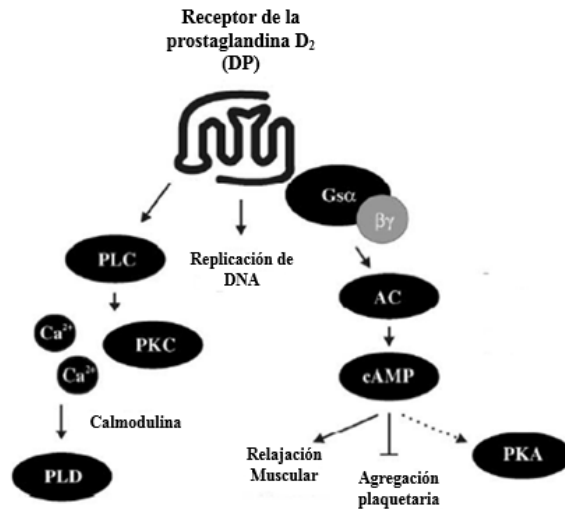


Figura 13.- Transmisión de señales al interior celular inducida por PTGDR (121).

PTGDR, a diferencia de CRTH₂, no está limitado a las células hematopoyéticas e inflamatorias, a pesar de ser un receptor poco abundante. Se expresa en las siguientes células del sistema inmune: linfocitos Th1, Th2 y NK, linfocitos B, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos y basófilos, coexistiendo ambos receptores en algunas de ellas (105,109). También se expresa en la superficie de las plaquetas, en células del sistema nervioso central, en células de músculo liso, células epiteliales ciliadas y no ciliadas de los bronquiolos y células epiteliales alveolares de tipo II y tipo I. En el caso de las células epiteliales alveolares de tipo I la expresión de *PTGDR* es moderada (109,120,124). La activación de PTGDR por la prostaglandina D₂ facilita la relajación del músculo liso, la vasodilatación, inhibe la agregación plaquetaria, disminuye la tensión ocular, contribuye a la regulación de la percepción del dolor y el sueño, y desempeña un papel importante en la respuesta inmune frente a las enfermedades alérgicas (105).

1.8.3- ASOCIACIÓN CON EL ASMA Y LA RINITIS ALÉRGICA

La PGD₂ es el compuesto intermediario derivado del ácido araquidónico más abundante en respuesta a la exposición a alérgenos (124). Se ha comprobado que para que se sintetice y secrete PGD₂ es necesario que se activen los mastocitos, a pesar de que otras

células como linfocitos Th2, macrófagos, células dendríticas, células del músculo liso y células epiteliales también tienen esa capacidad (123). Por este motivo, se ha propuesto como un marcador de la activación de los mastocitos (125).

En relación con el asma se ha observado, mediante lavado broncoalveolar, que los pacientes con ataques de asma producen PGD₂ (125). De hecho, se han contabilizado en el líquido broncoalveolar niveles de PGD₂ de 12 a 22 veces superiores en los asmáticos respecto a los controles sin alergia y sin asma (126). En ratones con asma inducida por sensibilización a la ovoalbúmina (OVA), la deficiencia de PTGDR provocó la inhibición de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias. La pérdida del receptor no afectó a la respuesta inmune primaria; sin embargo, se observó una disminución de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y de los linfocitos y eosinófilos acumulados en el líquido broncoalveolar tras la exposición (124). La sobreexpresión, en ratones transgénicos asmáticos sensibilizados con OVA, de la sintasa de PGD₂, L-PGDS, aumenta la infiltración por eosinófilos y las concentraciones de IL-4 e IL-5 en el lavado broncoalveolar (127). En cobayas, la inhalación del antagonista de PTGDR, S-5751, produce una disminución de la infiltración eosinofílica en el pulmón (128).

En cuanto a la rinitis alérgica, se ha investigado la participación de estas moléculas mediante el estudio con antagonistas de PTGDR, como S-5751 y BWA868C, en cobayas sensibilizadas con OVA. En el modelo de rinitis alérgica se observó que la administración de ambos antagonistas inhibía y suprimía la infiltración de eosinófilos. Además, se demostró que ambos compuestos inhibían la obstrucción nasal inducida por OVA (128). Por otra parte, en humanos, se han observado en el lavado broncoalveolar niveles de PGD₂ hasta 10 veces inferiores en los pacientes sin asma pero con rinitis alérgica en comparación con los pacientes con asma alérgica (126).

También se ha observado, en pacientes con rinitis alérgica, que la exposición al alérgeno aumenta inmediatamente la síntesis de PGD₂ y que la administración intravenosa de dicha prostaglandina en voluntarios sanos desencadena un intenso enrojecimiento facial y congestión nasal sin otros efectos sistémicos o pulmonares (129). En otro modelo animal de rinitis se comprobó que la función promotora de la vasodilatación y formación del edema se producía a través de PTGDR (105).

GENÉTICA DE *PTGDR* EN EL ASMA Y LA RINITIS ALÉRGICA

La relación de *PTGDR* con la alergia se ha investigado a través de estudios de ligamiento y de asociación. A partir de los estudios de ligamiento se propuso una región del cromosoma 14 como candidata a albergar marcadores genéticos ligados al asma o fenotipos relacionados (130,131). En un estudio de ligamiento sobre los niveles de IgE sérica total se determinó un marcador ligado al asma, D14S63, el cual se encuentra muy próximo a *PTGDR* (132). Los trabajos sobre *PTGDR* han generado cierta controversia, ya que los estudios de asociación necesitan ser validados mediante la replicación de los resultados. Esta replicación muchas veces no se produce, debido, quizá, a problemas de definición de variables, caracterización clínica de los grupos en estudio, problemas técnicos o diferencias étnicas. En el caso concreto de las diferencias étnicas, el asma no se asoció con *PTGDR* en población australiana (133), afroamericana, mejicana, puertorriqueña (134), china-Han (135). Por contrapartida sí se asoció en población caucásica (136,137).

Por otra parte, la rinosinusitis crónica con poliposis nasal que se ha asociado con gran cantidad de genes de receptores de las prostaglandinas, entre ellos *PTGD*, el cual se sobreexpresa, al igual que la sintasa de la prostaglandina D2 (*PTGDS*), en dicho tipo de pacientes (138). A pesar de todo, *PTGDR* es uno de los genes cuya asociación se ha replicado en la enfermedades atópicas. Se han detectado asociaciones entre determinados polimorfismos presentes en la región promotora de *PTGDR*, -613C>T, -549T>C, -441C>T y -197T>C con el asma (136,137,139). Dichos polimorfismos se encuentran en sitios de unión de factores de transcripción al promotor que podrían alterar el control que ejercen sobre la transcripción (137). Determinadas combinaciones haplotípicas de estas variantes se pueden asociar a una mayor actividad transcripcional de *PTGDR* (136,137,139,140).

En el caso de presentar una mayor expresión de *PTGDR* esto podría implicar un factor no protector frente a las enfermedades atópicas. El conocimiento sobre estas variables podría ayudar a caracterizar y estratificar diferentes grupos de pacientes a los cuales se les podrían aplicar diferentes estrategias para un manejo más efectivo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

2.~ HIPÓTESIS

La prostaglandina D₂ (PGD₂) es el mediador lipídico derivado del ácido araquidónico, más abundante en los mastocitos y su producción se encuentra aumentada con la exposición a alérgenos. El gen *PTGDR* codifica uno de los receptores de esta prostaglandina. Se han descrito estudios de asociación entre los polimorfismos de la región promotora y la enfermedad alérgica.

Considerando estas premisas la hipótesis principal de este estudio es que podría existir también una asociación entre los niveles de expresión del gen *PTGDR* en sangre periférica y la enfermedad alérgica.

La hipótesis secundaria sería que el gen *PTGDR* podría no solo tener un papel relevante en el mecanismo inflamatorio de la enfermedad alérgica sino que podría constituir un posible biomarcador que contribuyese a una mejor caracterización de la enfermedad.

OBJETIVOS

3.- OBJETIVOS

- 1.- Determinar los niveles de expresión del gen *PTGDR* en una población de pacientes con alergia y analizar la posible correlación con las manifestaciones clínicas.
- 2.- Analizar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de varios polimorfismos de la región promotora de *PTGDR* en los distintos grupos de pacientes alérgicos en comparación con la población control.
- 3.- Estudiar la posible correlación de los niveles de expresión con los distintos polimorfismos de la región promotora del gen *PTGDR* presentes en los distintos grupos de pacientes alérgicos.
- 4.- Analizar la determinación de los niveles de ARNm del gen *PTGDR* para su posible caracterización como biomarcador que pudiera contribuir a la caracterización de la enfermedad alérgica.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.~MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.~ DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, analítico, de tipo caso-control en el que se investiga retrospectivamente la exposición a factores o variables que pudiesen asociarse al desarrollo de la enfermedad en los pacientes.

Todos los participantes recibieron la información de la posibilidad de participar en el estudio y se les solicitó su consentimiento informado; se siguieron las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética de la Investigación del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

4.2.~ SUJETOS

4.2.1.~ MUESTREO

El muestreo es no probabilístico intencional o de conveniencia: procedimiento que permite seleccionar los casos característicos de la población limitando la muestra a estos casos (141). En este caso la muestra proviene de una población de individuos que acudieron a las consultas del Servicio de Alergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca y que cumplieron todos los criterios de inclusión que se detallan a continuación.

4.2.2.~ CRITERIOS DE INCLUSIÓN

CONTROLES

- Ausencia de síntomas o historia clínica compatible con asma o rinitis
- Pruebas cutáneas negativas frente a una batería de aeroalérgenos que se describirá más adelante.

- Ausencia de antecedentes familiares de asma, rinitis o alergia.

PACIENTES

- Presencia de sintomatología respiratoria alérgica, clasificándolos en si presentaban asma o no.
- Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata positivas para algún aeroalérgeno de una batería adaptada al medio local.

4.2.3.~ DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

En este estudio se incluyeron 307 individuos, 195 pacientes y 112 controles. En cuanto al sexo, en el grupo control se incluyeron 48 varones y 64 mujeres, mientras que en el grupo de pacientes, participaron 95 varones y 100 mujeres. El tamaño muestral fue valorado mediante el análisis del poder estadístico.

La media de edad de la muestra fue de 41,54 años (con una desviación estándar (d.s.) de 19,12). Para el grupo control la media de edad fue de 56,70 años (d.s. = 17,37) y, para el grupo de pacientes, de 32,91 años (d.s. = 14,05).

4.3.~ VARIABLES

Se recogieron datos de filiación, como nombre, apellidos, edad, sexo, fecha de nacimiento, así como número de historia clínica, fecha de la consulta y los datos del facultativo que la llevo a cabo. Salvo el sexo y la edad, el resto de datos sólo se emplearon en la identificación inicial de cada individuo y para la correcta recogida de las muestras, después de lo cual, los datos se disociaron, de modo que los datos de identificación no se vieran reflejados en ningún otro momento a lo largo del estudio. Las variables que se han incluido se reflejan en un cuestionario (Figura 14).

REMITIR TUBO (10 ml. EDTA - tapón morado) Y PETICIÓN AL LABORATORIO DE ALERGIA

Nº LABORATORIO:

Nº SUERO:

FECHA:

DOCTOR:

CONTROL: SI
 NO

ESTUDIO: β-Lactámicos
 POLIPOSIS

PRUEBAS CUTÁNEAS:

Negativas Ácaros
 Pendientes Epitelios

NOMBRE y APELLIDOS:

Nº HISTORIA:

EDAD:

SEXO: V / M

ASMA

OTROS

ASMA: NO SI

Intermitente

Persistente Leve
Moderada
Grave

RINITIS: NO SI

Intermitente

Persistente Leve
Moderada
Grave

EDAD DE APARICIÓN DEL ASMA:.....años EDAD DE APARICIÓN DE LA ALERGIA:.....años

ANTECEDENTES Atopia 1er grado 2 grado Asma 1er grado 2 grado Rinitis 1er grado 2 grado Poliposis 1er grado 2 grado

FAMILIARES: Sin AF MADRE ATOPIA MADRE ASMA

INTOLERANCIA AINES: NO

SI: Respiratoria
 Cutánea

POLIPOSIS: SI
 NO

INMUNOTERAPIA: SI NO Especificar:

TRATAMIENTO CON CORTICOIDES: SI NO CORTICOIDE ORAL:

IgE TOTAL: SI NO CORTICOIDE INHALADO:

OBSERVACIONES:

Figura 14.- Variables recogidas en el cuestionario.

4.3.1.- DIAGNÓSTICO DE ASMA

Los criterios para el diagnóstico de asma fueron:

- Al menos 2 síntomas consistentes con asma (tos, disnea, sibilancias, opresión torácica).
- Ausencia de otras enfermedades pulmonares.

- Prueba de broncodilatación positiva o prueba de metacolina positiva: según las normas de la ATS (*American Thoracic Society*) (142) se realizó una espirometría basal. A todos los pacientes con $FEV_1/FVC < 0,7$ se les realizó una prueba de broncodilatación; si ésta fue negativa, se continuó con una prueba de hiperreactividad bronquial con metacolina (143). La prueba broncodilatadora se consideró positiva cuando se observó una mejoría del $FEV_1 > 12\%$ y más de 200 ml. Se consideró positiva una PC_{20} metacolina < 16 mg/ml.

4.3.2.~ GRAVEDAD DEL ASMA

La gravedad de asma se determinó, cuando fue posible, en condiciones basales, es decir sin tratamiento, y se clasificó en una de las cuatro categorías establecidas por la GINA (*Global Initiative for Asthma*) (32). Si el paciente estaba recibiendo tratamiento, la gravedad se estableció de acuerdo con el escalón de tratamiento

ASMA INTERMITENTE

- Aparición de síntomas con una frecuencia menor de una vez por semana.
- Crisis de corta duración.
- Síntomas nocturnos con una frecuencia menor de dos veces al mes.
- FEV_1 o PEF $\geq 80\%$.
- Variabilidad del PEF o $FEV_1 < 20\%$.

ASMA PERSISTENTE LEVE

- Aparición de síntomas más de una vez a la semana pero no diariamente.
- Episodios nocturnos más de dos veces al mes.

- FEV_1 o PEF \geq 80%.
- Variabilidad del PEF o $FEV_1 < 20\% - 30\%$.

ASMA PERSISTENTE MODERADA

- Síntomas diarios.
- Las crisis pueden afectar la actividad diaria y el sueño.
- Uso diario de β -2 agonistas inhalados.
- FEV_1 o PEF entre 60-80%.
- Variabilidad del PEF o $FEV_1 > 30\%$.

ASMA PERSISTENTE GRAVE

- Síntomas diarios.
- Crisis frecuentes.
- Episodios asmáticos nocturnos frecuentes.
- Limitación en las actividades físicas.
- FEV_1 o PEF $< 60\%$.
- Variabilidad del FEV_1 o PEF $> 30\%$.

En aquellos pacientes con tratamiento para el asma se utilizó una clasificación adaptada de acuerdo al mismo y siguiendo igualmente las recomendaciones de la GINA (32).

4.3.3.~ DIAGNÓSTICO DE RINITIS

Se siguió la definición de la guía ARIA sobre la rinitis alérgica:

Los síntomas de la rinitis alérgica incluyen: rinorrea, obstrucción nasal, picazón nasal y estornudos, que son reversibles espontáneamente o con tratamiento. El goteo postnasal se produce principalmente con rinorrea anterior profusa en la rinitis alérgica o sin rinorrea anterior significativa en la rinosinusitis crónica. Los niños preescolares pueden presentar sólo obstrucción nasal. Sin embargo, cuando la obstrucción nasal es el único síntoma, es muy raro que se asocie con alergia.

Además, se exigió:

- Relación de los síntomas con la exposición a un aeroalérgeno (ácaros, polen, epitelios y/o hongos)
- Pruebas intraepidérmicas positivas o IgE específica positivas frente a los aeroalérgenos sospechosos.

4.3.4.~ GRAVEDAD DE LA RINITIS

La gravedad de rinitis se determinó, cuando fue posible, en condiciones basales, es decir sin tratamiento, y se clasificó de acuerdo con la guía ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) (16,144). Se clasificó de la siguiente manera:

RINITIS INTERMITENTE

- Presenta síntomas menos de 4 días a la semana Y
- Los síntomas aparecen menos de 4 semanas consecutivas

RINITIS PERSISTENTE

- Presenta síntomas más de 4 días a la semana O

- Los síntomas aparecen durante más de 4 semanas consecutivas

RINITIS LEVE

Ninguno de los siguientes ítems está presente:

- Alteraciones del sueño
- Afectación de actividades diarias, de ocio y/o deporte
- Afectación de actividades en trabajo o escuela
- Síntomas presentes pero no problemáticos

RINITIS MODERADA/GRAVE

Uno o más de estos ítems están presentes:

- Alteraciones del sueño
- Deterioro de actividades diarias, de ocio y/o deporte
- Deterioro de actividades en trabajo o escuela
- Síntomas problemáticos

4.3.5.~ DIAGNÓSTICO DE ATOPIA

La presencia de atopia se determinó mediante pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata. Las pruebas se realizaron siguiendo las recomendaciones para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la EAACI (145) con una batería de aeroalérgenos adaptada a la exposición local (ALK-Abelló, Madrid; Bial-Aristegui, Bilbao; CBF-Leti, Barcelona), que incluía ácaros: *Dermatophagoides pteronissynuss*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro*, pólenes de

gramíneas, malezas y árboles: *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Olea europaea*, *Cupressus arizonica*, *Platanus hispanicus*, *Quercus ilex*; hongos: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, y epitelios: *Canis lupus*, *Felis domesticus*, *Mesocricetus auratus*, *Equus ferus caballus* y *Oryctolagus cuniculus*, así como los correspondientes controles negativo (suero fisiológico) y positivo (dihidrocloruro de histamina, 10 mg/ml).

Antes de realizar la prueba, se retiraron los antihistamínicos y otros fármacos capaces de interferir con el resultado que el paciente pudiera estar tomando, según las indicaciones de la EAACI (145).

La prueba consiste en una punción perpendicular a la epidermis, que se realizó mediante una lanceta de tipo Morrow-Brown (Stallergenes, Antony, Francia), con una punta estandarizada de 1 mm.

La reacción se consideró positiva frente al antígeno si se producía una pápula igual o mayor a 3 mm de diámetro, siempre que el control negativo no indujera pápula. El paciente se consideró atópico si presentaba al menos una prueba positiva frente a uno de los aeroalérgenos de la batería. Se consideró que el paciente presentaba alergia frente a un determinado alérgeno si existían manifestaciones clínicas en relación con la exposición a dicho alérgeno, además de una prueba intraepidérmica positiva.

A efectos de este estudio, se consideraron las sensibilizaciones a grupos de alérgenos que presentaban los pacientes. Se establecieron los siguientes grupos: ácaros, pólenes, hongos y epitelios. Los pacientes se categorizaron en monosensibilizados (a un único grupo, sensibilizados a dos grupos (cualesquiera), sensibilizados a tres grupos (cualesquiera) y sensibilizados a cuatro grupos. Se consideraron polisensibilizados los que presentaron dos o más sensibilizaciones.

4.3.6.~ ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA O ENFERMEDAD ALÉRGICA

El especialista en Alergología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca recogió la información sobre los antecedentes familiares de atopia o de enfermedades alérgicas, particularmente asma y rinitis.

4.3.7.~ UTILIZACIÓN DE INMUNOTERAPIA

Este dato se recogió a través del cuestionario por el especialista de Alergología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

4.3.8.~ NIVELES DE INMUNOGLOBULINA E TOTAL (IGE TOTAL)

Se realizó una extracción de suero por veno-punción a todos los individuos, a fin de determinar los niveles de IgE total mediante la técnica denominada ImmunoCAP Total IgE, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU). Dicha prueba consiste en un enzimoimmunoanálisis en sándwich, Básicamente, en esta prueba los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los pocillos del ImmunoCAP, se fijan a la IgE del suero del paciente. Se añaden anticuerpos anti-IgE marcados enzimáticamente (β -galactosidasa-anti-IgE, anticuerpos monoclonales de ratón, 1 μ g/ml), formándose un inmunocomplejo de tipo sándwich (figura 15).

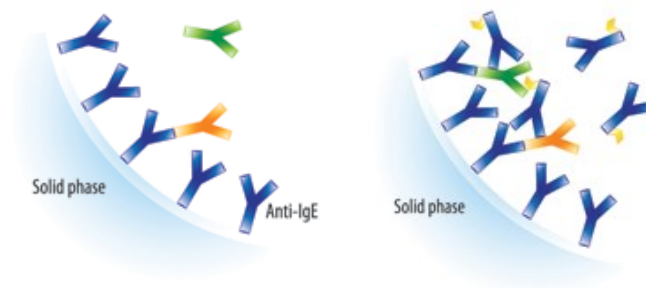


Figura 15.- Cebador y segundo paso del ensayo para determinar IgE total (146).

El exceso de anticuerpo unido a la enzima se elimina con una serie de lavados tras lo cual se incuba con la solución que contiene el sustrato de dicha enzima. Se detiene la reacción, y se mide la fluorescencia del eluido originado en la misma.

La fluorescencia será directamente proporcional a la concentración de IgE (Figura 16). Se realizó una curva patrón para interpolar las unidades y obtener las concentraciones de IgE total.

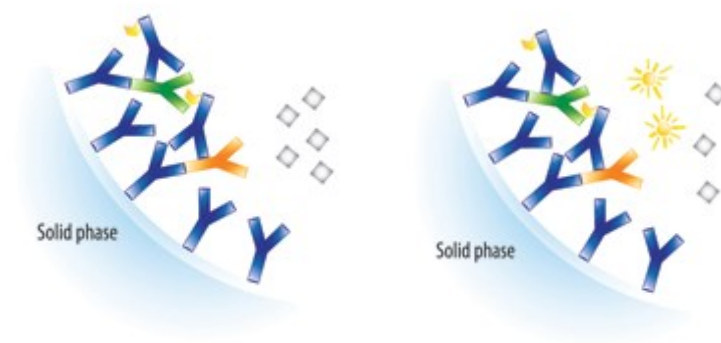


Figura 16.- Tercer y cuarto paso del ensayo para determinar IgE total (146).

En los sujetos en los que el resultado de las pruebas cutáneas no fue concluyente se realizó una determinación de IgE específica (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU) mediante la técnica denominada ImmunoCAP Specific IgE.

Dicha prueba es un ensayo de inmunoenzimático en sándwich. Fundamentalmente, la fase sólida contiene los alérgenos específicos unidos de forma covalente. Estos alérgenos específicos son los que reaccionan con la IgE específica de la muestra sérica del paciente. Después de eliminar la IgE no específica, se añaden anticuerpos marcados con enzima contra la IgE (Figura 17).

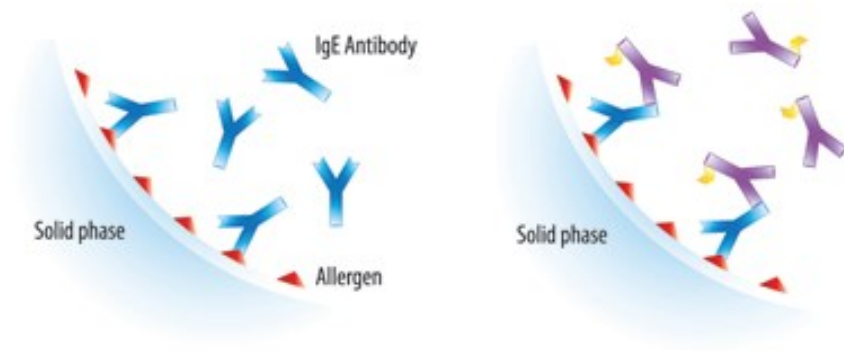


Figura 17.- Primer y segundo paso del ensayo para determinar IgE específica (146).

Tras la incubación el exceso de anticuerpo unido al enzima se elimina con una serie de lavados tras lo cual la mezcla de unión se incuba con el sustrato del enzima. Después de detener la reacción enzimática, se mide la fluorescencia del eluido. La fluorescencia observada será directamente proporcional a la concentración de IgE específica (Figura 18).

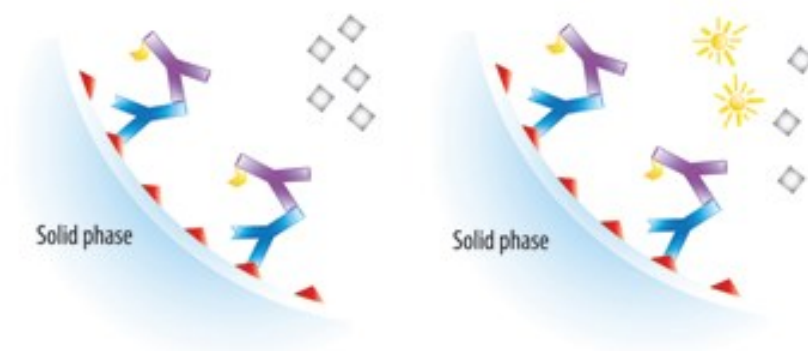


Figura 18.-Tercer y cuarto paso del ensayo para determinar IgE específica (146).

4.3.9.~ NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA PROSTAGLANDINA D2 (*PTGDR*)

La expresión del gen *PTGDR* (NM_000953) se cuantificó en todos los individuos según la metodología que se presenta más adelante.

4.3.10.~ POLIMORFISMOS O SNP DE *PTGDR*

Se ha analizado un fragmento de 1729 de pares de bases (pb) de la región promotora de *PTGDR* en un total de 307 individuos, con el fin de determinar 9 polimorfismos localizados en dicha región.

Estos 9 polimorfismos están descritos en la base de datos del ds *SNP* del NCBI y se les asigna un *SNP ID number* o *ref SNP cluster* (rs) (Tabla 5).

Tabla 5.- Se indican los rs de los polimorfismos de este estudio en la base de datos del ds SNP del NCBI

Polimorfismo	rs	Polimorfismo	rs	Polimorfismo	rs
PTGDR		PTGDR		PTGDR	
-1289 G>A	35595004	-834 C>T	803011	-441 C>T	803010
-1122 T>C	8019916	-613 C>T	34236606	-197 T>C	11157907
-881 C>T	33998702	-549 T>C	8004654	-95 G>T	41311438

4.4.~ANÁLISIS MOLECULAR

4.4.1.~ ESTUDIO DE GENOTIPADO

EXTRACCIÓN DEL ADN

Todas las muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa fueron recogidas en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante y almacenadas a -20°C hasta su uso. La extracción del ADN se realizó mediante el sistema automatizado *MagNA Pure Compact* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU).

El *MagNA Pure Compact* es un robot automático diseñado para la extracción de ácidos nucleicos a partir de una amplia variedad de muestras (sangre total, plasma, suero, líquidos biológicos, células sanguíneas, tejidos y cultivos celulares). El equipo se basa en un sistema de partículas magnéticas contenidas en un cartucho que cuenta con una serie de reactivos dispuestos en pocillos y necesarios para la extracción de ADN genómico.

Las alícuotas de 1ml de sangre total almacenada a -20°C se descongelaron a temperatura ambiente antes de introducirlas en el equipo con los cartuchos, el rack de puntas de pipetas estériles con filtro y los tubos de elución, en los cuales, a partir de 1ml de sangre total, se eluye el ADN en un volumen final de 200 µL. Todo este material empleado corresponde con el *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume*.

Una vez identificados, los componentes se introdujeron en el aparato y se inició la extracción automática. El robot presenta un sensor especializado para detectar coágulos en la muestra, que indicará un menor rendimiento en la extracción al final del proceso si dicha incidencia sucediese.

La extracción de ADN usando el *MagNA Pure Compact* consta de (Figura 19):

- Lisis celular mediante Tritón X-100 y digestión proteica por la adición del tampón de lisis y proteinasa K.

- Unión del ADN a la superficie de las partículas de vidrio magnéticas en una solución con isopropanol.
- Separación del complejo ADN-partícula magnética.
- Eliminación de los restos celulares por sucesivos lavados.
- Separación del complejo ADN-partícula magnética.
- Elución del ADN en Tris-EDTA a elevadas temperaturas mientras que tiene lugar la eliminación de las partículas de vidrio magnéticas.

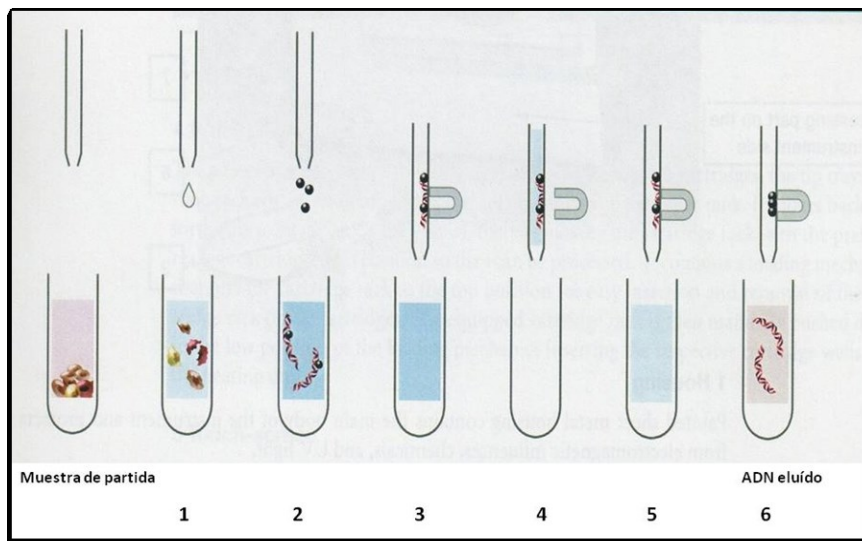


Figura 19.- Fundamento del procedimiento llevado a cabo por el *MagNA Pure Compact* (Roche) tomado del *MagNA Pure Compact Operator's Manual*.

CVANTIFICACIÓN Y PVREZA DEL ADN

El ADN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 260 nm. El ADN tiene un buen grado de pureza si la ratio 260nm/280nm está entre 1,8-2,0 y la ratio 260nm/230nm está entre 2,0-2,2.

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En las muestras de ADN obtenidas se amplificó mediante PCR la región correspondiente al promotor del gen *PTGDR* utilizando para ello cebadores específicos que flanquean dicha región. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l. Para cada reacción se añadieron 12,5 μ l de PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EEUU) (22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, 220 μ M dNTP, 22U Taq ADN polimerasa), 9,5 μ l de agua libre de nucleasas, 80 ng de ADN genómico y 400 nMol de cada cebador (sentido y antisentido). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador modelo *Primus 25* de MWG-BIOTECH (Biothech, Ebersberg, Alemania) y en un termociclador modelo *Multi Gene Opti Max* de LABNET INC (Labnet, Edison, NJ, EEUU). Los cebadores utilizados en la reacción se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Cebadores utilizados para genotipar *PTGDR*

	Secuencia	Complementario
Cebador Sentido	5'-GGCATGAGGCCTAAAAATGAG-3'	Hebra 3' → 5'
<i>PTGDR-I</i>		
Cebador Antisentido	5'- GAAGAAGGCGAAGGCTTGG-3'	Hebra 5' → 3'
<i>PTGDR-V</i>		

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del promotor del gen de *PTGDR* depositada en la base de datos GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) y se suministraron como un liofilizado. Posteriormente fueron reconstituidos con agua de PCR libre de nucleasas (Roche Applied Sciences, Indianapolis, EEUU) y almacenados en alícuotas a -20°C. El programa que fue empleado para la amplificación del promotor de *PTGDR* se muestra en la tabla 7.

Tabla 7.- Programa de Amplificación de *PTGDR*

Programa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Anillamiento	62°C	1 min
Extensión	72°C	1 min
Extensión final	72°C	10 min

40 ciclos

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Tras la amplificación los productos de PCR se separaron por tamaño molecular en un gel de agarosa al 2 % con tampón TBE al 0.5%. Para su preparación se utilizó agarosa Biotools Mb Agarose (Biotools B&M Labs, Madrid, España) y tampón TBE al 10X (Promega, Madison, WI, EEUU), compuesto por 890 mM de Tris-borato, 890 mM de ácido bórico y 20 mM de EDTA a pH 8,2-8,4 a 25°C; que se diluyó al 0,5X con agua destilada. La agarosa se disolvió en TBE 0,5X calentando en un microondas, se dejó enfriar 2-3 minutos antes de añadirle 3µL de RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution [20,000X] por cada 100 mL de gel. El RedSafe actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia a 537 nm al ser iluminado con luz ultravioleta, de manera que a través de este producto se visualiza los fragmentos de ADN y el exceso de cebadores de la muestra.

Tras 45 minutos de solidificación del gel en una cubeta con TBE 0,5X se procedió a cargar 5 µL de cada PCR con 1 µL de tampón de carga *DNA Loading Buffer* (Lonza, Basilea, Suiza). En todos los geles se cargó un marcador de peso molecular, como el *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) o *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Estos marcadores se utilizaron para comprobar el tamaño de los fragmentos. Se aplicó al

gel una corriente de 120 Voltios durante 20 minutos y se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta VisiDoc-It™ Imaging System (Upland, CA, EEUU).

PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Se realizó mediante el sistema de purificación ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, EEUU). Es un sistema enzimático que elimina el exceso de cebadores y desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP) no utilizados en la amplificación. Para ello se añade un tampón con dos enzimas hidrolíticas que actúan a 37°C en 15 minutos, Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de camarón. La Exonucleasa I elimina el exceso de cebadores y los ADN de hebra única de la PCR, mientras la Fosfatasa Alcalina de camarón elimina los dNTP. Después de la incubación se inactivan ambas enzimas a 80°C durante 15 minutos (Figura 20).

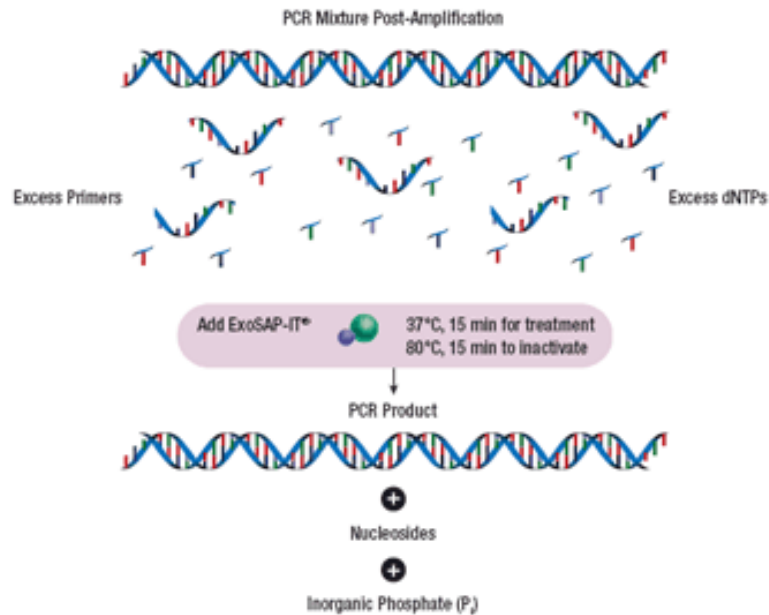


Figura 20.- Principio de purificación del sistema ExoSAP-IT.

La purificación se llevó a cabo en un volumen final de 6 μ L. En cada reacción se añadieron 1 μ L de ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, EEUU) y 5 μ L de la reacción de PCR obtenida. Las reacciones de hidrólisis e inactivación se llevaron a cabo en un *Termomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

La secuenciación automática de los fragmentos de ADN amplificados por PCR a partir del ADN genómico se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Life Technologies, NY, EEUU) usando el cebador específico correspondiente, así como terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer, Massachusetts, EEUU), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Las muestras para secuenciación se preparan con cada uno de los cebadores para secuenciar el amplicón de 1416 pb a un volumen final de 8 μ L. Se añade 3 μ L de cebador sentido (PTGDR-I) o del cebador antisentido (PTGDR-R) a una concentración de 1 μ M (Tabla 8) a 5 μ L de muestra de PCR purificada.

Tabla 8.- Se muestran los cebadores utilizados para secuenciar los polimorfismos en estudio

	Secuencia	Complementario
Cebador Sentido	5'-GGCATGAGGCCTAAAAATGAG-3'	Hebra 3' → 5'
<i>PTGDR-I</i>		
Cebador Antisentido	5'- GGAGTGAAGGCTGCGGAAG-3'	Hebra 5' → 3'
<i>PTGDR-R</i>		

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

CHROMAS PRO

El análisis del amplicón se realizó en el *Chromas Pro 1.49* (Technelysium Ptv. Ltd, Tewantin, Australia). Por otro lado, se comprobó si existía homología del amplicón con otras secuencias del genoma mediante el programa BLAST de los servidores www2.ebi.ac.uk/fasta3 y www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html.

SHESIS

Se trata de un programa *online* cuyo objetivo es el análisis de la distribución alélica y genotípica, así como el estudio de haplotipos y del equilibrio de Hardy-Weinberg. Está disponible en <http://www.nhgg.org/analysis>.

SNP ANALYZER

Programa que permite el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg, la estimación haplotípica, y el análisis de los rasgos cuantitativos de cada locus. El *SNP ANALYZER* permite realizar los cálculos por medio de distintos algoritmos, *Clark*, *EM* y el *PseudoGibbs Sampler algorithm*. Estos algoritmos posibilitan la predicción de los haplotipos y diplotipos. Se encuentra disponible en la siguiente dirección: http://www.istech.info/istech/board/login_form.jsp.

PODER ESTADÍSTICO

El poder estadístico se ha analizado mediante los programas disponibles en los enlaces http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size_a2.asp y <http://statpages.org/proppowr.html>. Estas herramientas permiten calcular el tamaño de las poblaciones necesarias para detectar diferencias estadísticamente significativas entre ellas conociendo la frecuencia de cada uno de los grupos.

FPRP

El cálculo de probabilidad de obtener un falso positivo (FPRP: *False Positive Report Probability*) se utilizó para discernir si existe una verdadera asociación entre una variante genética y la enfermedad dado un resultado estadísticamente significativo. Esto depende del valor de p observado y de la probabilidad anterior de la asociación entre la variante genética y la enfermedad sea real, y del test de poder estadístico.

De esta forma se pueden interpretar correctamente los resultados estadísticamente significativos. La herramienta necesaria para el cálculo de FPRP se obtuvo del siguiente enlace web:

<http://jnci.oxfordjournals.org/content/96/6/434/suppl/DC1>.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se ha utilizado el programa estadístico SPSS versión 17.0. (Chicago, IL, EEUU). El programa, ampliamente utilizado, es una potente herramienta para realizar análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas que se han realizado con este programa se muestran a continuación:

- *Prueba de χ^2* : Las variables dicotómicas se analizaron mediante el test χ^2 , en tablas de contingencia para comparar la distribución de las variables categóricas.
- *Prueba exacta de Fisher*: consiste en un ajuste para calcular la probabilidad exacta de obtener el resultado observado.
- *Simulación de MonteCarlo*: este procedimiento agrupa una serie de procedimientos que analizan distribuciones de variables aleatorias usando simulación de números aleatorios.

4.4.2.~ ESTUDIO DE EXPRESIÓN

GUÍA MIQE

La guía MIQE es una revisión de la información mínima necesaria para publicar los resultados de experimentos de PCR cuantitativa (qPCR). Todos los experimentos de este trabajo en todas sus fases se ajustan a todas las reglas y todos los estándares esenciales mínimos para considerar los resultados de suficiente calidad como para publicarlos (147). La relación de reglas esenciales seguidas en el presente estudio se muestran en la tabla 9 y 10.

Tabla 9.- Relación de los ítems que hay que controlar en publicaciones de qPCR. Los ítems con asterisco forman parte del grupo de ítems no esenciales, pero recomendables.

Diseño Experimental	Extracción de ácidos nucleicos
Definición de grupo control y experimental	Procedimiento y/o instrumentación
Número dentro de cada grupo	Nombre del kit y detalles de algunas modificaciones
Muestra	Detalles del tratamiento de ADNasa o ARNasa
Descripción	Medición de la contaminación de ADN o ARN
Volumen/Masa de muestra procesada *	Cuantificación de ácidos nucleicos
Procedimiento de procesado	Instrumento y método
Como se congela y como de rápido	Pureza (A_{260}/A_{280}) *
Condiciones de almacenamiento de muestras y duración	Rendimiento *
Cebadores de la qPCR	Integridad ARN : método/instrumento
Secuencia de los cebadores	RIN/RQI o Ct de 3' y 5' del transcrito
Localización e identificación de alguna modificación	Test de inhibición (Diluciones de Ct)
Fabricante de los cebadores*	
Método de Purificación *	

Tabla 10.- Relación de los ítems que hay que controlar en publicaciones de qPCR. Los ítems con asterisco forman parte del grupo de ítems no esenciales, pero recomendables.

Transcripción Inversa	Preparación de la reacción (manual/robotizado) *
Condiciones de Reacción	Fabricante del instrumento para qPCR
Cantidad de ARN y Volumen de Reacción	Validación de la qPCR
Cebado de oligonucleótidos y concentración	Especificidad (gel, curva de fusión,...)
Transcriptasa inversa y concentración	Para el SYBR Green I, Ct de los NTC
Temperatura y tiempo	Curva de calibración: pendiente e intersección en eje Y
Fabricante y numero de catálogo de reactivos	Eficiencia de la PCR calculada por la pendiente
Condiciones de almacenaje de ADNc*	R ² de la curva de calibrado
Información del gen a estudiar por qPCR	Rango dinámico lineal
Símbolo del gen	Variación de Ct al límite de detección
Numero de acceso a la secuencia	Evidenciar el límite de detección
Localización del amplicón *	Análisis de Datos
Tamaño del Amplicón	Programa de análisis de qPCR (versión)
Especificidad <i>in Silico</i> (BLAST)	Método de determinación del Ct
Localización de <i>cebador</i> en exón-intrón (si es aplicable)	Identificación de Outliers
A que variantes del splicing están dirigidas	Resultados de los NTC
Protocolo de qPCR	Justificación del número y elección de los genes de referencia
Condiciones de reacción	Descripción del método de normalización
Volumen de reacción y cantidad de ADNc/ADN	Número de replicas
Cebadores, (sonda), Mg ²⁺ , Concentración de dNTP	Repetitividad (variación intraensayo)
Identificación de la polimerasa y concentración	Reproducibilidad (variación intersensayo, CV)*
Fabricante e identificación del kit/tampón	Análisis de Poder*
Aditivos (SYBRGreen)	Método estadística para significancia de resultados
Fabricante de placas y número de catálogo *	Software (versión)
Parámetros completo del termociclador	

ESTUDIO PARA LA SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA

SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO

Se analizó un grupo representativo de muestras de sangre total de 12 controles y de 12 pacientes diagnosticados de asma alérgica por el servicio de Alergia del Complejo Asistencial de Salamanca para llevar a cabo la selección de los genes de referencia, que cumplieran los mismos criterios de inclusión que el resto de los pacientes.

EXTRACCIÓN DEL ARN

Todas las muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa, fueron recogidas en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante y procesadas inmediatamente. La extracción de ARN se realizó mediante el sistema automatizado *MagNA Pure Compact* con el *RNA Isolation Kit* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU).

El sistema *MagNA Pure Compact* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU) consiste en un robot automático diseñado para la extracción de ácidos nucleicos que permite la extracción de ARN a partir de sangre total.

En el equipo se incluye una alícuota de 200 μ L de sangre total anticoagulada con EDTA junto con los cartuchos del *RNA Isolation kit*, el rack de puntas de pipetas estériles con filtro y los tubos de elución donde se eluyó el ARN en un volumen final de 50 μ L. Identificados los componentes se introdujeron en el aparato y se inició la extracción automática.

La extracción del ARN a partir del *MagNA Pure Compact* consta de los siguientes pasos:

- Homogeneizado de la muestra con el tampón de lisis y proteinasa K.
- Unión de los ácidos nucleicos a la superficie de las partículas de vidrio magnéticas.
- Eliminación de los restos celulares por sucesivos lavados.

- Tratamiento de la muestra con ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico de la misma.
- Elución del ARN.

TRATAMIENTO CON ADNASA

El *RNA Isolation kit* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU) incluye opcionalmente un tratamiento de ADNasa (Ácido Desoxirribonucleasa) para evitar contaminaciones con ADN genómico residual que puede quedar tras la extracción del ARN. En uno de los pocillos del cartucho se añade 1 μ L de la misma para que el equipo la utilice al final del programa de extracción de ARN.

CVANTIFICACIÓN DEL ARN

El ARN fue cuantificado mediante un *NanoDrop® ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) a 260 nm. El ARN debe de tener una ratio de absorbancia a 260nm/280nm entre 1,8-2,0.

La calidad del ARN se midió mediante el bioanalizador, *2100 Bioanalyzer de Agilent* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) que proporciona análisis del *RNA Integrity Number* (RIN), un ARN de buena calidad debe tener un RIN > 7. En nuestro estudio se cumplieron estos criterios de calidad.

SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

La retrotranscripción (RT) se realizó con el sistema *Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Calsbad, CA, USA). Este sistema detecta los ARN que tienen un tamaño entre 100 pb a 12 kb y la cantidad del material de partida puede variar entre 1 pg y 5 μ g de ARN total. Como indica el manual del sistema, la transcriptasa *SuperScript™ III* sintetiza ADNc a una temperatura entre 42 y 55°C, proporcionando un incremento de la especificidad.

En el estudio de genes constitutivos que se tomaron como genes de referencia se emplearon 80 ng de ARN por cada muestra para realizar la síntesis del ADNc, que se realizó utilizando hexámeros, según el protocolo de Invitrogen (Figura 21). Para el estudio de expresión de *PTGDR* se emplearon 250 ng de ARN por cada muestra para la síntesis de ADNc.

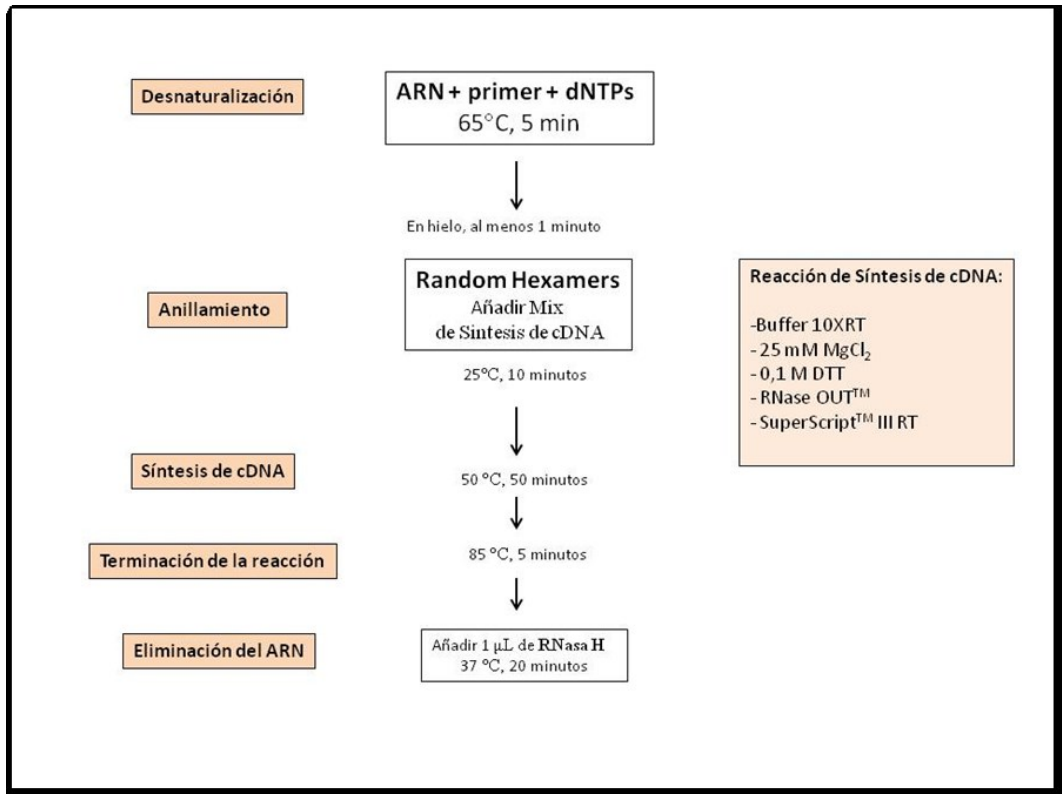


Figura 21.- Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de ADNc total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

SÍNTESIS DE CEBADORES PARA QPCR Y ESTUDIO DE EFICIENCIA.

Los cebadores utilizados en el caso de los dos genes de referencia fueron recomendados por el proveedor (tabla 11) del panel *The Real Time ready Human Reference Gene* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

Tabla 11.- Cebadores de los genes *GAPDH* y *TBP* utilizados para el análisis de expresión mediante PCR a tiempo real.

	Secuencia	Complementario
Cebador Sentido <i>GAPDH</i>	5'- CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC -3'	Hebra 3'→ 5'
Cebador Antisentido <i>GAPDH</i>	5'- ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	Hebra 5'→ 3'
Cebador Sentido <i>TBP</i>	5'- GAACATCATGGATCAGAACAACA-3'	Hebra 3'→ 5'
Cebador Antisentido <i>TBP</i>	5'-ATAGGGATTCCGGGAGTCAT-3'	Hebra 5'→ 3'

REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (QPCR)

Los 12 Controles y 12 pacientes se analizaron por duplicado utilizando el Panel *The Real Time ready Human Reference Gene* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU), que contiene 19 genes constitutivos, 3 controles positivos y 2 controles negativos de la reacción de transcripción inversa (Tabla 12). Este panel está diseñado para detectar una concentración que varía de 50 pg/reacción a 50 ng/reacción por pocillo.

El panel *The Real Time ready Human Reference Gene* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU) incluyó por pocillo la siguiente mezcla de reacción liofilizada: 200 nM de cada cebador, 200 µM de dNTP y 1U de Taq polimerasa, a la cual se le añadió lo siguiente: 14 µL de agua de PCR por pocillo, 4 µL de *LightCycler® DNA Probes Máster 5X* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU), 2 µL del ADNc a todos los pocillos correspondientes a los 19 genes constitutivos, a los controles positivos y al control negativo de ADNc. Se añadieron 2µL de ARN a los controles negativos de ARN. La mezcla de la reacción de cada pocillo tuvo un volumen final de 20 µL y una concentración de 0,8 ng de ADNc. El control positivo permite obtener información de la calidad del ARN inicial y de la eficiencia de la retrotranscripción. El control negativo

permite detectar posibles contaminaciones de ADN genómico residual en las muestras. Para ello, se emplearon dos pocillos: en el primer pocillo se añadió ADNc y en el segundo se añadió ARN. Cuando los valores de *Cycle threshold* (Ct) de estos 2 ensayos difieren en más de 10 ciclos o el valor absoluto del Ct del pocillo con ARN es mayor de 32, se considera que no hay contaminación de ADN genómico.

Tabla 12.- Relación de genes constitutivos estudiados en el Panel *The Real Time ready Human Reference Gene* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)

Abreviatura	Nombre Completo
<i>18S</i>	Subunidad 18S del ribosoma
<i>ACTB</i>	Beta-actina
<i>ALAS</i>	Ácido 5-aminolevulínico sintasa
<i>β-2M</i>	Beta-2-microglobulina
<i>β-Globina</i>	Beta-globina
<i>G6PDH</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<i>GUSB</i>	Beta-glucuronidasa
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1
<i>IPO8</i>	Proteína importina 8
<i>PBGD</i>	Porfobilinógeno deaminasa
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato kinasa 1
<i>PPIA</i>	Peptidil-Proilicis-trans isomerase A
<i>RPL13A</i>	Proteína L13a de subunidad ribosomal 60S
<i>RPLP0</i>	Proteína P0 de la subunidad ribosomal 60S
<i>SDHA</i>	Complejo succinato deshidrogenasa
<i>TBP</i>	Proteína de unión a la caja TATA
<i>TFRC</i>	Receptor de la transferrina
<i>YWHAZ</i>	Proteína 14-3-3 zeta/alfa o proteína de activación

El equipo empleado para llevar a cabo los estudios de expresión génica mediante PCR a tiempo real fue el *LightCycler® 480 System II* (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, USA). El protocolo seguido se muestra en la tabla 13.

Tabla 13.- Programa de amplificación para la qPCR del panel *The Real Time ready Human Reference Gene* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

Programa	Temperatura	Tiempo	Rampa T ^a	
Activación Taq Polimerasa	95°C	10 min	4,4°C/sg	
Amplificación				
Desnaturalización	95°C	10 sg	4,4°C/sg	45 ciclos
Anillamiento	60°C	30 sg	2,2°C/sg	
Polimerización	72°C	1 sg	4,4°C/sg	
Enfriamiento	40°C	30 sg	2,2°C/sg	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó el Ct medio y su desviación estándar (ds) para los controles y pacientes para cada uno de los 19 genes constitutivos del panel. Para evaluar la variabilidad se calculó el coeficiente de variación (CV) medio de los Ct medios entre ambas poblaciones.

Por último, se realizó un ANOVA tras comprobar la normalidad con un test de Kolgomorov-Smirnov y la igualdad entre varianzas con un test de Levene. Este análisis permite ver si en algún gen constitutivo existieron diferencias significativas entre el grupo de controles y el grupo de pacientes diagnosticados de asma alérgica.

ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PTGDR

SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO

Se analizaron muestras de sangre total de 112 controles y 195 pacientes diagnosticados de asma y/o rinitis alérgica por el servicio de Alergia del Complejo Asistencial de Salamanca.

EXTRACCIÓN DEL ARN

Todas las muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa, fueron recogidas en tubos de vacío que llevaban EDTA como anticoagulante y se mezclaron con el conservante *RNAlater*[®] (Ambion Life Technologies[™], Calsbad, CA, EEUU).

El conservante *RNAlater*[®] se utiliza para desactivar las RNasas y conservar el ARN de la sangre a -20°C en perfectas condiciones. Para la conservación de las muestras se mezclaron 450 µl de sangre total con 1300 µl de *RNAlater*[®].

Antes de utilizar la muestra para la extracción del ARN, se dejó descongelar a temperatura ambiente. Tras descongelarse, la muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto y se retiró el conservante antes de utilizar el *RiboPure*[™]-*Blood Kit* (Ambion, Life Technologies, Calsbad, CA, EEUU).

El protocolo *RiboPure*[™]-*Blood Kit* de aislamiento de ARN en sangre total está dividido en dos partes:

- Lisis celular en una solución basada en guanidina y una purificación inicial de ARN por extracción de fenol/cloroformo (Figura 22).

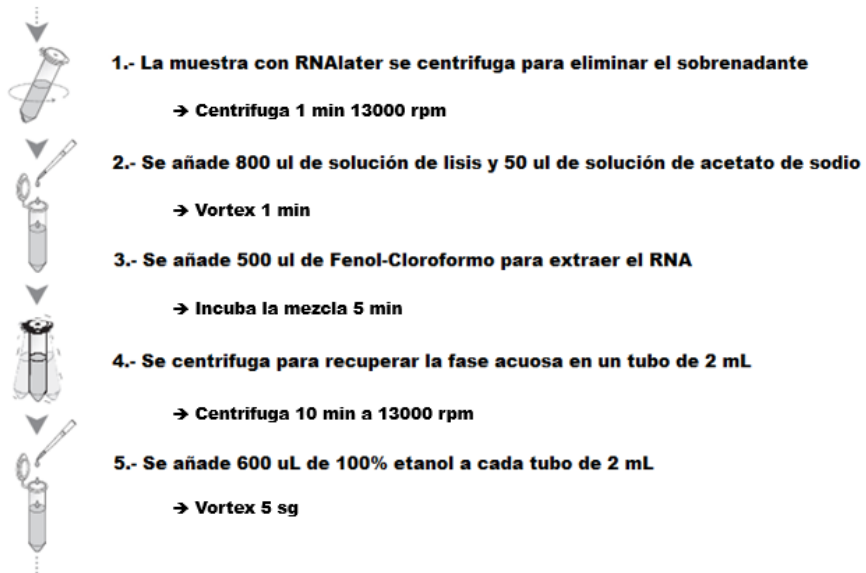


Figura 22.- Procedimiento para lisar las células y purificar el ARN

- Purificación final de ARN mediante extracción en fase sólida en un filtro de fibra de vidrio (Figura 23).

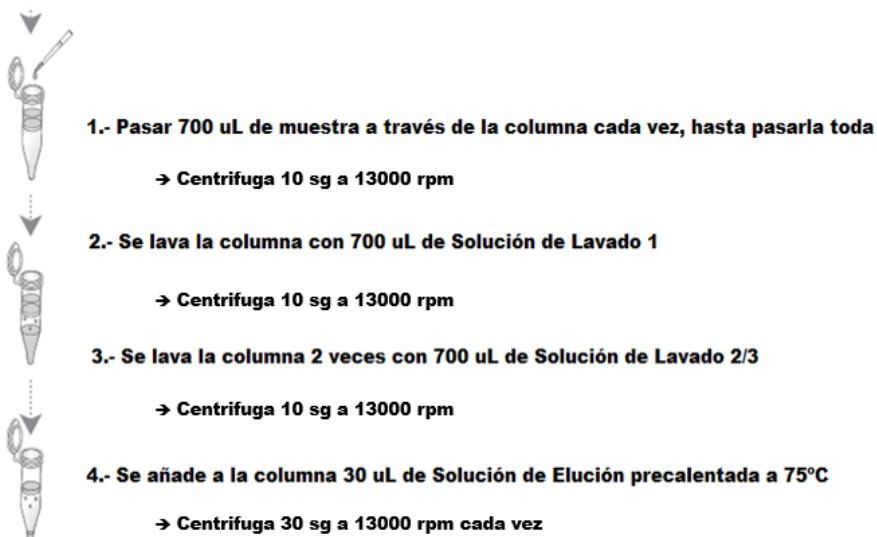


Figura 23.- Purificación final del ARN y elución

TRATAMIENTO CON ADNASA

El kit *RiboPureTM-Blood* (Ambion, Life Technologies, Calsbad, CA, EEUU) incluye un tratamiento con ADNasa I para eliminar el ADN genómico del eluido del ARN. El tratamiento consiste en añadir un tampón 20X y 1 μ L de ADNasa I (8U/ μ l) al eluido de ARN. La mezcla se incuba 30 minutos a 37°C, tras lo cual se añade un 20 % volumen de reactivo de inactivación de ADNasa durante 2 minutos, se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto y se pasa el eluido libre de la resina del reactivo de inactivación a un nuevo tubo.

CVANTIFICACIÓN DEL ARN

El ARN fue cuantificado mediante un *NanoDrop[®] ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) a 260 nm. El ARN debe de tener una ratio de absorbancia a 260 nm/280 nm entre 1,8-2,0. La calidad del ARN se midió mediante el bioanalizador, *2100 Bioanalyzer de Agilent* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) que proporciona análisis del *RNA Integrity Number* (RIN), un ARN de buena calidad debe tener un RIN > 7. En nuestro estudio se cumplieron estos criterios de calidad.

SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

La retrotranscripción (RT) se realizó con el sistema *SuperscriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Calsbad, CA, USA). Este sistema detecta los ARN que tienen un tamaño entre 100 pb a 12 kb y la cantidad del material de partida puede variar entre 1 pg y 5 μ g de ARN total. Como indica el manual del sistema, la transcriptasa *SuperScriptTM III* sintetiza ADNc a una temperatura entre 42°C y 55°C, proporcionando un incremento de la especificidad.

En el estudio de genes constitutivos que se tomaron como genes de referencia se emplearon 80 ng de ARN por cada muestra para realizar la síntesis del ADNc, que se realizó utilizando hexámeros, según el protocolo de Invitrogen (Figura 24). Para el estudio de expresión de *PTGDR* se emplearon 250 ng de ARN por cada muestra para la síntesis de ADNc.

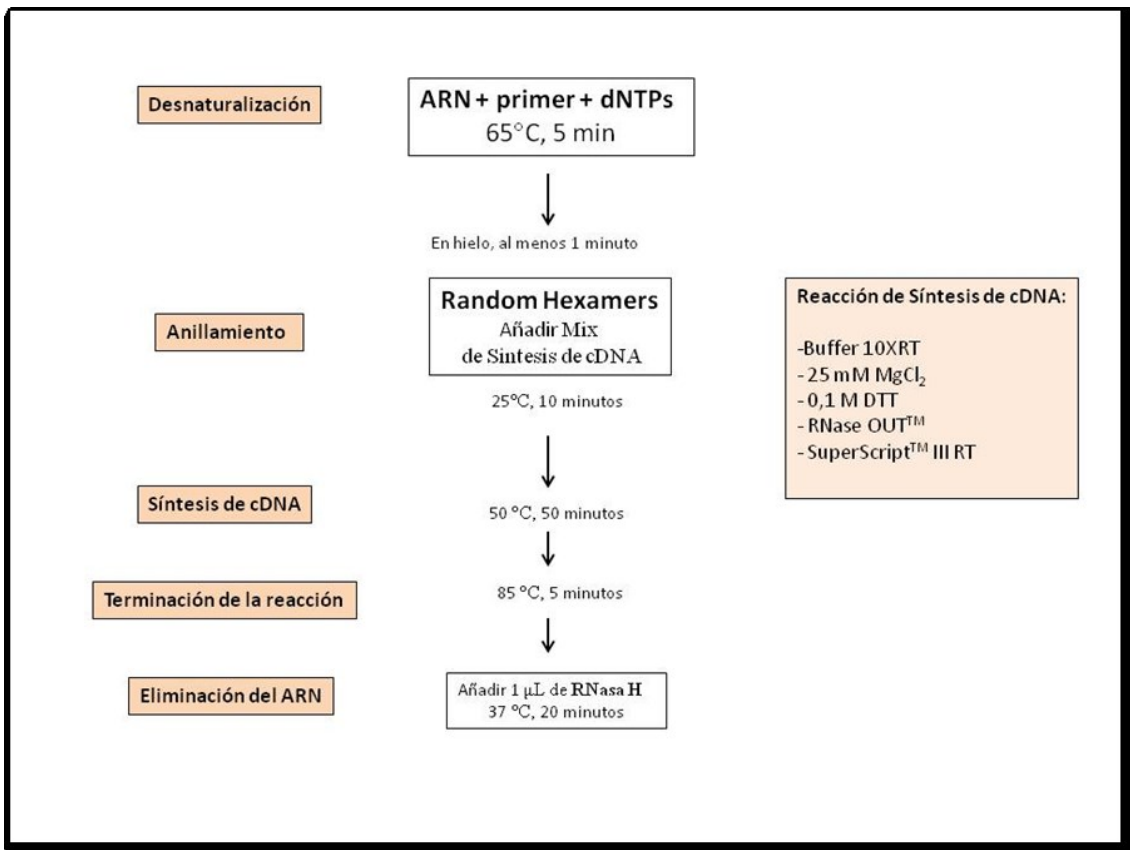


Figura 24.- Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de ADNc total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

SÍNTESIS DE CEBADORES PARA QPCR Y ESTUDIO DE EFICIENCIA.

Los cebadores se diseñaron mediante el programa cebador 3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/cebador3plus/cebador3plus.cgi>). Para que la amplificación funcione correctamente es necesario que los cebadores se unan específicamente a la secuencia problema; esta especificidad depende de determinadas propiedades del cebador, como el contenido GC y la temperatura de fusión.

El amplicón de *PTGDR* a amplificar tenía un tamaño de 82 nucleótidos y los cebadores utilizados son los que se muestran en la tabla 14. Se comprobó que los cebadores elegidos no presentasen ningún polimorfismo conocido en su secuencia en el

momento del diseño, para evitar de este modo una posible variación en la especificidad de unión de los cebadores en las distintas muestras de ADNc.

Tabla 14.- Cebadores de *PTGDR* utilizados para la qPCR

	Secuencia	Complementario
Cebador Sentido <i>PTGDR</i>	5'- GGCATGAGGCCTAAAAATGAG-3'	Hebra 3' → 5'
Cebador Antisentido <i>PTGDR</i>	5'- CCTTGACATCCTTAAATGCTCC-3'	Hebra 5' → 3'

EFICIENCIA DE LOS CEBADORES

Se realizó un estudio de la eficiencia de la amplificación de los cebadores mediante el cálculo de la pendiente en fase logarítmica en una qPCR. Para ello, se utilizaron diluciones seriadas (1:4) de una muestra de ADNc de concentración conocida, con un rango de concentraciones entre 100 ng/μL y 0,39 ng/μL. La eficiencia de la reacción se calculó con la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = 10^{(-1/pendiente)}$$

La eficiencia de la PCR debe estar comprendida entre 90-100%, y puede verse afectada por numerosas variables (148,149,150). Una vez comprobado el buen funcionamiento de los cebadores se inició el estudio de expresión de *PTGDR*.

REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (QPCR)

Para evitar sesgos en el análisis, en cada experimento de qPCR se emplearon tanto muestras de controles como muestras de pacientes, controles negativos sin muestra y un calibrador. El calibrador consiste en una muestra de concentración conocida que permite detectar y compensar posibles variaciones interensayo. La mezcla de la reacción de cada

pocillo fue la siguiente: 7,5 μ L de Master Mix *SYBR Green I* (2X) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), 600nM de cada cebador y 25 ng de ADNc. El volumen total de la reacción fue de 15 μ L.

A continuación se empleó un equipo *LightCycler*[®] 480 *System II* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) para amplificar las secuencias. El protocolo utilizado para el uso del *SYBR Green I* se describe en la tabla 15.

Tabla 15.- Programa de amplificación empleado para el análisis de expresión génica de *PTGDR* mediante PCR a tiempo real con *SYBR Green I* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

Programa	Temperatura	Tiempo	Rampa T ^a
Activación Taq Polimerasa	95°C	10 min	4,4°C/sg
Amplificación			
Desnaturalización	95°C	10 sg	4,4°C/sg
Anillamiento	60°C	10 sg	2,2°C/sg
Polimerización	72°C	10 sg	4,4°C/sg
<i>Melting curve</i>	97°C		0,11°C/sg
Enfriamiento	40°C	30 sg	2,2°C/sg

La curva de fusión permite salvar la inespecificidad del *SYBRGreen I* y detectar los posibles dímeros de cebador que podrían provocar una sobreestimación de la cantidad real de ADNc o, lo que es lo mismo, del grado de expresión génica.

ANÁLISIS DE DATOS

Para cada muestra las reacciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Para el cálculo del $\Delta\Delta Ct$ se necesitó la media de los valores Ct y las desviaciones estándar correspondientes, para el cálculo de ΔCt . Para el cálculo del $\Delta\Delta Ct$ es necesario calcular previamente el valor ΔCt con la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ objetivo} - Ct \text{ referencia}$$

Como objetivo tuvimos el gen problema (*PTGDR*) y como referencia al gen constitutivo o de referencia.

Tras lo cual podemos calcular el valor $\Delta\Delta Ct$ mediante la fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra calibrador}$$

* *Muestra problema*: muestras provenientes de pacientes y controles a estudio

* *Muestra calibrador*: muestra obtenida de una mezcla de controles bien caracterizados

Finalmente obtenemos el dato de expresión relativa respecto de un gen referencia utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para realizar los cálculos se utilizó el programa *Excel* de Microsoft Office 2013 (Redmond, WA, EEUU), introduciendo los valores Ct y creando una plantilla de cálculo.

Se siguieron las recomendaciones de acuerdo con las instrucciones del manual “*Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*” (151,152).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En este estudio se ha utilizado el programa estadístico SPSS versión 17.0. (Chicago, IL, EEUU). Las pruebas estadísticas que se han realizado con este programa se muestran a continuación:

- *Análisis de la Z de Kolmogorov-Smirnov*: se utiliza para analizar la normalidad de la distribución de una muestra.
- *Test de Levene*: estudio de la homogeneidad de varianzas.
- *t de Student*: se utiliza en poblaciones que siguen una distribución normal y sirve para comparar si las medias de 2 poblaciones son iguales.
- *U-Mann Whitney*: se utiliza cuando la población estudiada no sigue una distribución normal y el tamaño muestral es pequeño. Es la versión no paramétrica de la *prueba t de Student*.
- *ANOVA*: se utiliza en poblaciones que siguen una distribución normal y se utiliza para comparar si las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales.
- *Kruskal-Wallis*: se utiliza en poblaciones que no siguen una distribución normal y se utiliza para comparar si las medias de $K > 2$ poblaciones son iguales.

RESULTADOS

5.~ RESULTADOS

5.1.~ CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

En este estudio se han analizado un total de 307 individuos, 112 controles y 195 pacientes diagnosticados de asma y/o rinitis alérgica (Tabla 16).

Tabla 16.- Características de la población en estudio

	Total N=307	Controles N=112	Pacientes N=195	Significación p
Edad (años)	42±19	57±17	33±14	< 0.001
Sexo (Varones) (%)	143 (46,6 %)	48 (42,9 %)	95 (48,7 %)	0.32

La proporción por sexos estuvo ligeramente desplazada hacia el sexo femenino que supuso el 53,4% de los participantes (Figura 25).

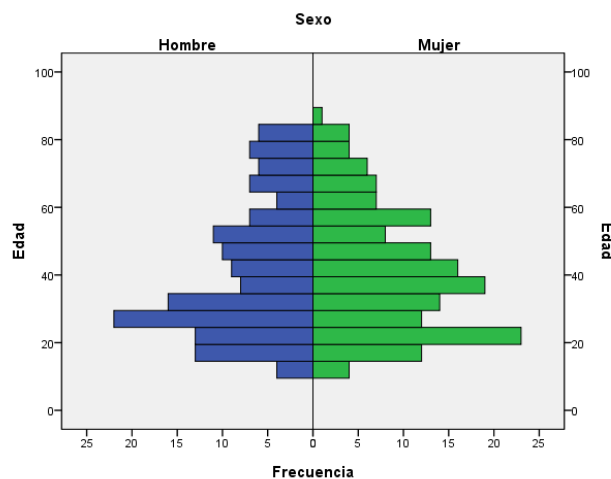


Figura 25.- Distribución de los sujetos participantes en el estudio por edades y sexo.

Además, se observa una media de edad significativamente menor en el grupo de pacientes (Figura 26).

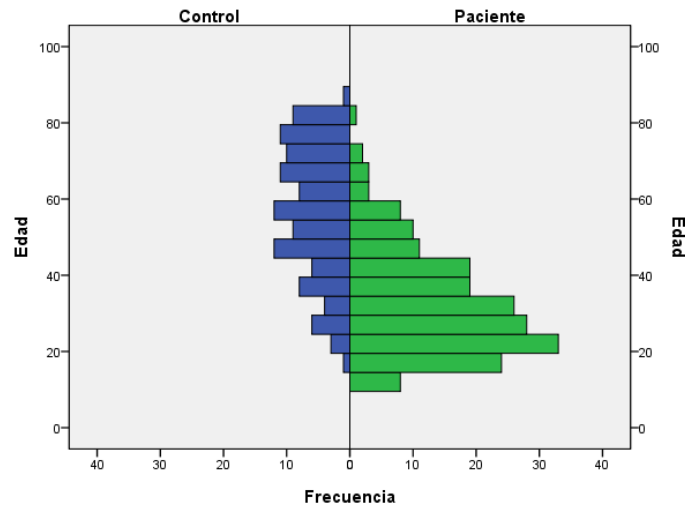


Figura 26.- Distribución por edades del grupo control y del grupo de pacientes con alergia.

5.1.1.~ GRUPO CONTROL

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

El grupo control estuvo constituido por 112 individuos, caracterizados tras una evaluación clínica por el servicio de Alergología del Complejo Asistencial de Salamanca. Ninguno de estos individuos presentaba enfermedades alérgicas ni respiratorias ni antecedentes familiares de las mismas. Todos ellos presentaron pruebas cutáneas negativas en la batería de aeroalérgenos locales. La proporción de sexos se desplazó ligeramente hacia el sexo femenino, que supuso el 57,1 % de los controles. La mediana de la edad del grupo control fue de 57 años (R.I.= 27). La media de los niveles de IgE sérica fue de 99 kU/L (d.s.= 178 kU/l) (Tabla 18).

5.1.2.~ GRUPO PACIENTES

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

El grupo Pacientes estuvo constituido por 195 individuos caracterizados tras una evaluación clínica por el servicio de Alergología del Complejo Asistencial de Salamanca. El 51,3% de los pacientes fueron mujeres. La mediana de la edad del grupo de pacientes fue de 30 años (R.I.= 19). La media de los niveles de IgE en suero de estos individuos fue de 362 kU/L (d.s.= 429 kU/l) (Tabla 17).

Tabla 17.- Niveles de IgE de los individuos incluidos en el estudio

	Medias	ds	Significación
Controles (n:112)	99 kU/l	178 kU/l	* p<0.05
Pacientes (n:195)	362 kU/l	429 kU/l	
Varones (n:143)	281 kU/l	359 kU/l	p = 0,627
Mujeres (n:164)	259 kU/l	403 kU/l	
Asma + Rinitis (n:131)	416 kU/l	466 kU/l	* p<0.05
Rinitis (n:58)	258 kU/l	328 kU/l	
Antecedentes (n:75)	417 kU/l	469 kU/l	p = 0,151
No Antecedentes (n:110)	324 kU/l	397 kU/l	

DATOS CLÍNICOS

DIAGNÓSTICO Y GRAVEDAD

En la figura 27, se muestra la distribución de los pacientes según el diagnóstico. El más frecuente fue la asociación asma-rinitis, presente en 2/3 de los pacientes, seguido por los pacientes diagnosticados exclusivamente de rinitis.

Diagnóstico de enfermedad alérgica

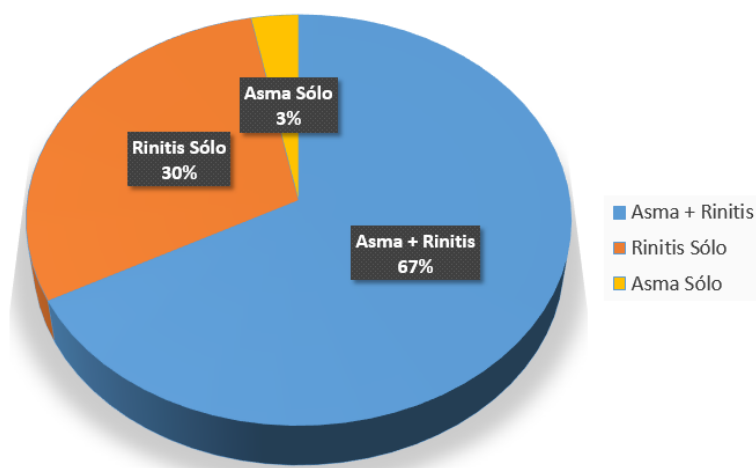


Figura 27.- Distribución de los pacientes basada en el diagnóstico.

La gravedad del asma se valoró mediante las categorías establecidas por la guía GINA (32) (figura 28). La más frecuente fue el asma intermitente, seguida del asma persistente moderada.

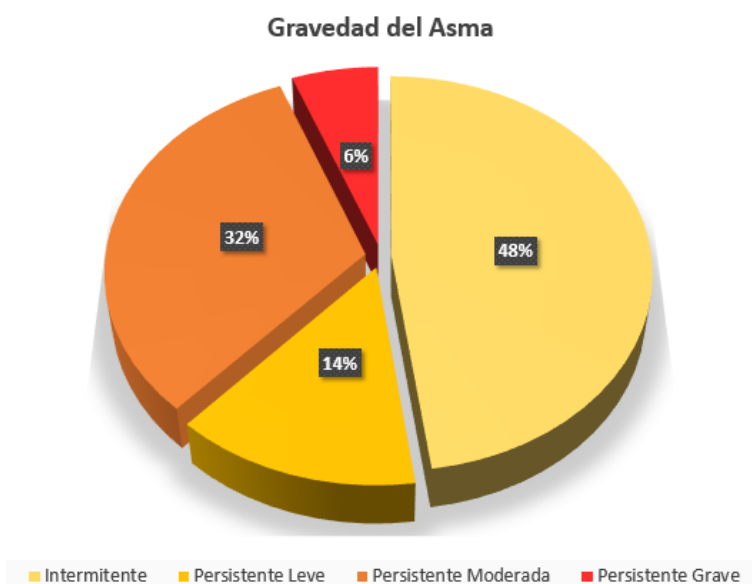


Figura 28.- Distribución de los pacientes según la gravedad del asma.

La gravedad de la rinitis se valoró mediante las categorías establecidas por la guía ARIA (16,144) (figura 29). La forma más frecuente de rinitis fue la persistente moderada seguida de la rinitis intermitente moderada.

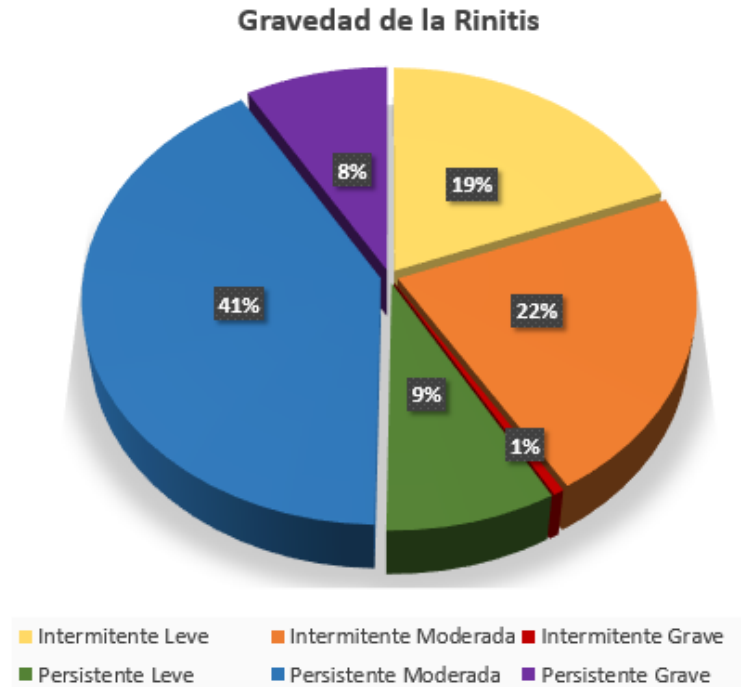


Figura 29.- Distribución de los pacientes basada en la gravedad de la rinitis. Basada en la modificación de la ARIA por Valero (153)

SENSIBILIZACIÓN DE LOS PACIENTES

Todos los individuos diagnosticados presentaron algún tipo de sensibilización y el 63 % presentaba polisensibilización a varios grupos de aeroalérgenos (Figura 30). Entre los polisensibilizados los más habituales fueron los sensibilizados a dos grupos de aeroalérgenos como era de esperar los menos habituales fueron los individuos sensibles a los cuatro grupos de aeroalérgenos. En el grupo de pacientes monosensibilizados predominó la monosensibilización al grupo de ácaros (52%) sobre la monosensibilización al grupo de pólenes.

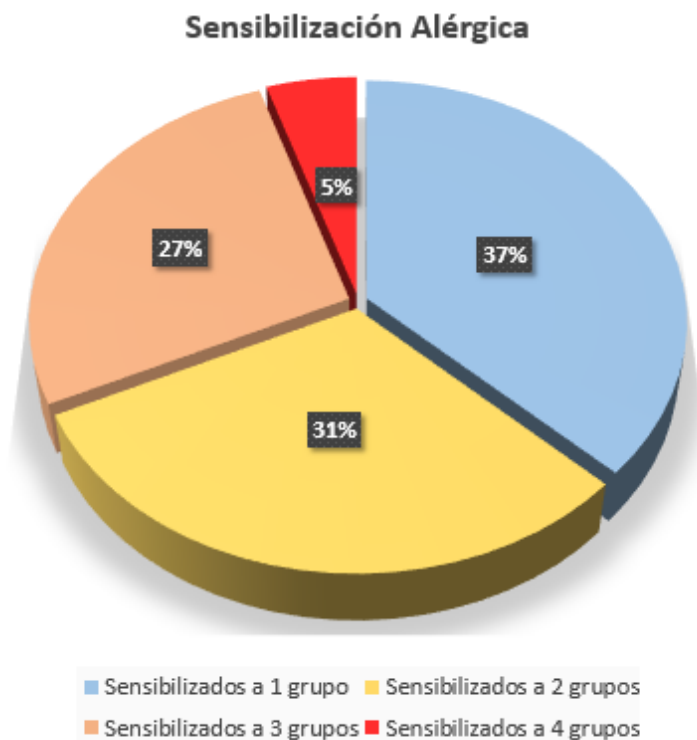


Figura 30.- Distribución de los pacientes basada en la sensibilización.

El grupo de aeroalérgenos al que más frecuentemente presentaban sensibilización nuestros pacientes fue el de los pólenes (74,9%) seguido por el grupo de ácaros (71,3%), epitelios (42,6%) y hongos (9,7%).

ANTECEDENTES DE LOS PACIENTES

Se recogieron los antecedentes familiares de asma, rinitis y atopia, así como, los antecedentes maternos de las mismas (figura 31). Se observó que al menos el 40% de los pacientes presentaba algún tipo de antecedente relacionado con la alergia.

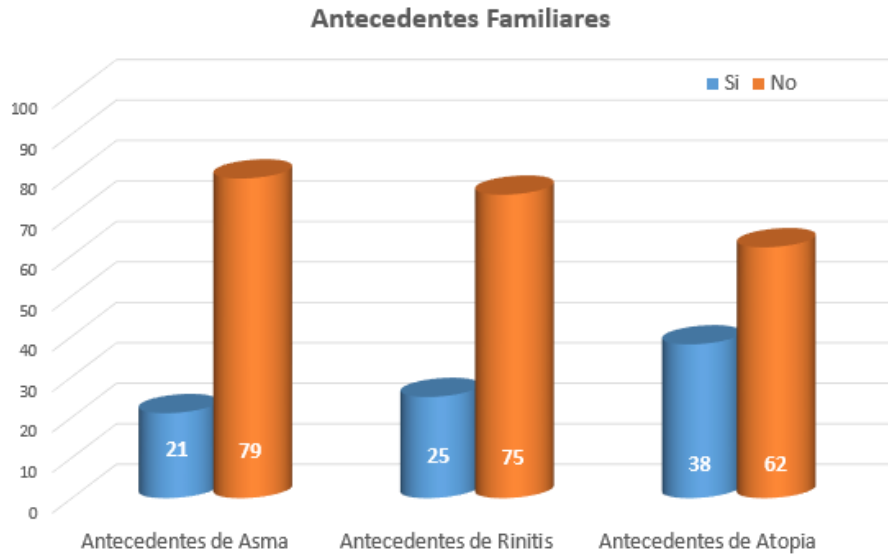


Figura 31.- Antecedentes familiares de asma, rinitis y atopia en pacientes diagnosticados de asma y rinitis alérgica.

5.2.- ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y LAS VARIABLES CLÍNICAS.

5.2.1.- SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA O CONSTITUTIVOS

La recomendación general es elegir genes de referencia que tengan un nivel de expresión similar al del gen problema, en nuestro caso *PTGDR* (154). Consecuentemente, se seleccionaron genes de referencia cuyo Ct se encontrase alrededor del Ct = 30, ya que, en una prueba preliminar de expresión, a la misma concentración de ARN, *PTGDR* se expresaba cerca de este ciclo.

En la figura 32 se observa las medias y las desviaciones estándar de todos los genes de referencia analizados.

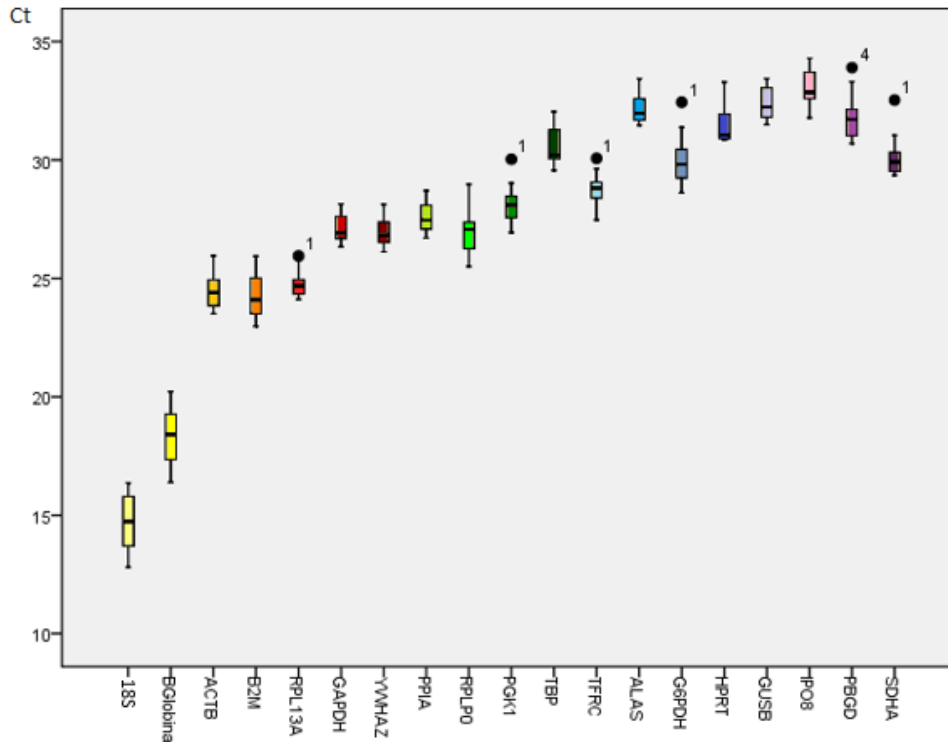


Figura 32.- Diagrama de cajas (*box-plot*) donde se observan medias y desviaciones estándar de los Ct de los genes constitutivos

Seleccionamos los genes que, expresándose cerca del ciclo Ct = 30, mostraban una expresión más estable (no presentaron valores extremos).

Los genes candidatos fueron: *TFRC* (*transferrin receptor*), *TBP* (*tata binding protein*), *ALAS* (*Delta-aminolevulinate synthase*), *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase*), *GUSB* (*glucuronidase beta*).

Seleccionamos el gen de referencia con menor variación; para ello, calculamos la media de las desviaciones estándar y la media de los coeficientes de variación de los Ct medios ($cv = ds / media$) de los pacientes sensibilizados a diferentes alérgenos con diagnóstico de alergia (Figura 33).

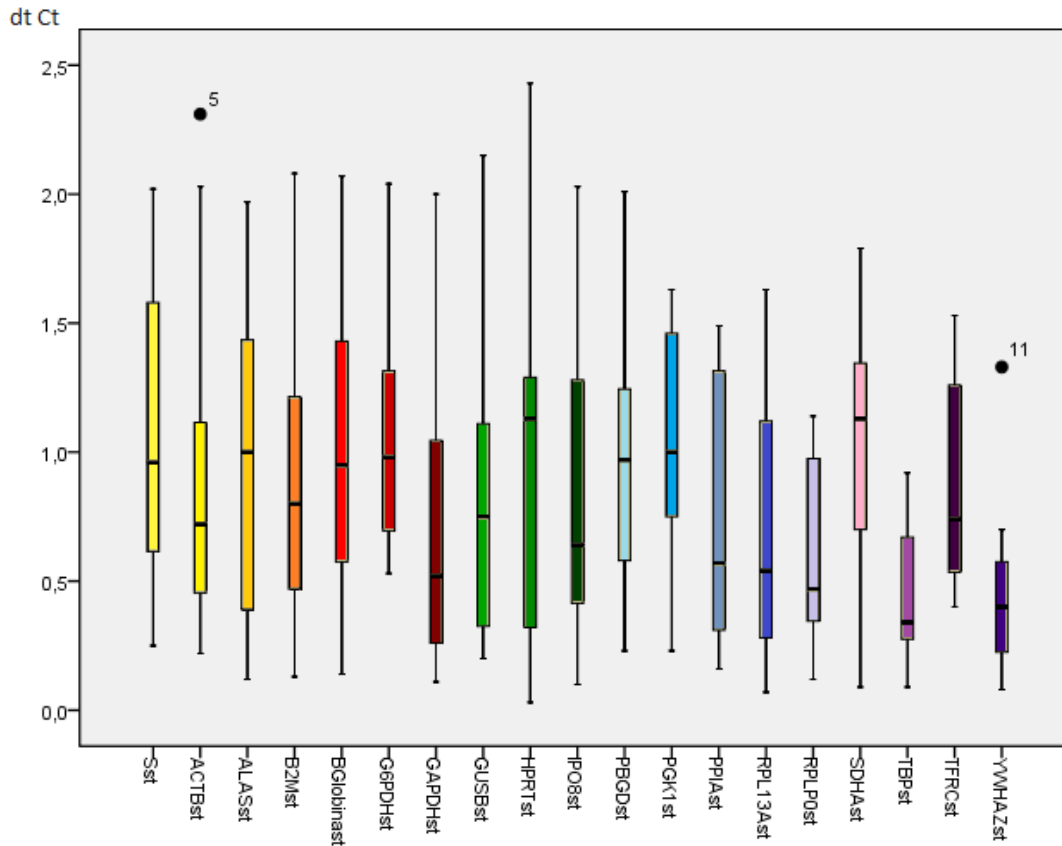


Figura 33.- Diagrama de cajas (*box-plot*) donde se observan la media de las desviaciones estándar de los Ct.

El gen que varió en menor medida y sin valores extremos (Tabla 18), con un nivel de expresión similar a *PTGDR*, fue el gen constitutivo *TBP*, que presentó menos de 0,5 ciclos (Ct) de variación de expresión respecto de la media de las desviaciones estándar de los duplicados.

El segundo gen constitutivo seleccionado fue *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), ya que se ha utilizado con anterioridad en estudios relacionados con pacientes asmáticos.

Tabla 18.- Valores Ct de los Genes constitutivos analizados

Gen Constitutivo	Ct medio \pm desviación estándar		CV de los Ct medios Entre ambas poblaciones
	Controles	Pacientes	
<i>18S</i>	14,40 \pm 0,73	15,03 \pm 0,36	0,081
<i>ACTB</i>	24,48 \pm 0,90	24,52 \pm 0,37	0,038
<i>ALAS</i>	32,19 \pm 0,69	32,35 \pm 0,35	0,030
<i>β-2M</i>	24,23 \pm 0,72	24,41 \pm 0,31	0,039
<i>β-Globina</i>	18,02 \pm 0,69	18,54 \pm 0,26	0,059
<i>G6PDH</i>	29,76 \pm 0,72	30,34 \pm 0,29	0,036
<i>GAPDH</i>	27,17 \pm 0,66	27,02 \pm 0,25	0,027
<i>GUSB</i>	32,35 \pm 0,71	32,48 \pm 0,36	0,027
<i>HPRT1</i>	31,48 \pm 0,69	31,63 \pm 0,47	0,030
<i>IPO8</i>	33,09 \pm 0,66	33,04 \pm 0,32	0,026
<i>PBGD</i>	31,57 \pm 0,67	32,02 \pm 0,52	0,032
<i>PGK1</i>	27,79 \pm 0,57	28,56 \pm 0,40	0,038
<i>PPIA</i>	27,66 \pm 0,45	27,57 \pm 0,27	0,028
<i>RPL13A</i>	24,93 \pm 0,47	24,68 \pm 0,12	0,029
<i>RPLP0</i>	27,07 \pm 0,35	26,99 \pm 0,21	0,024
<i>SDHA</i>	29,61 \pm 0,35	30,34 \pm 0,48	0,035
<i>TBP</i>	30,49 \pm 0,27	30,67 \pm 0,14	0,015
<i>TFRC</i>	28,47 \pm 0,44	29,29 \pm 0,39	0,031
<i>YWHAZ</i>	27,02 \pm 0,46	26,97 \pm 0,18	0,017

5.2.2.~ EXPRESIÓN DE *PTGDR*

EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA

Se observó un claro incremento en los niveles de expresión de *PTGDR* en los pacientes alérgicos ($p < 0,001$; PE = 95,4 %); así, se observó una media de $0,68 \pm 0,52$ en los niveles de expresión de *PTGDR* en los controles, frente a $0,91 \pm 0,52$ en los pacientes con pruebas cutáneas positivas. Estas diferencias se mantenían tanto para el caso de la monosensibilización ($p < 0,001$; PE = 92,7 %) como de la polisensibilización ($p < 0,001$; PE = 83,3 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,96 \pm 0,53$ en los pacientes monosensibilizados y frente a $0,89 \pm 0,52$ en los pacientes polisensibilizados. Todos estos datos se muestran en la tabla 19.

Tabla 19.- Niveles de expresión de *PTGDR* y sensibilización respecto a los controles

	n	Media \pm ds	Significación	PE
Controles	104	0,682 \pm 0,521		
PC Positivas	188	0,915 \pm 0,523	$p < 0,001$	95,4 %
MS	71	0,960 \pm 0,533	$p < 0,001$	92,7 %
PS	117	0,887 \pm 0,517	$p < 0,001$	83,3 %
PC (+) ácaros	133	0,870 \pm 0,493	$p < 0,001$	80,6 %
PC (+) pólenes	140	0,921 \pm 0,507	$p < 0,001$	94,7%
PC (+) a epitelios	81	0,870 \pm 0,426	$p < 0,001$	77,0 %
PC (+) hongos	19	1,001 \pm 0,844	$p = 0,03$	35,5 %
MS a Ácaros	37	0,939 \pm 0,627	$p = 0,016$	72,2 %
MS a Pólenes	34	0,983 \pm 0,416	$p = 0,03$	96,2 %

MS: Monosensibilizados; PS: Polisensibilizados; PE: Poder Estadístico; PC: pruebas cutáneas

SENSIBILIZACIONES A GRUPOS DE AEROALÉRGENOS

ÁCAROS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y sensibilizados a los ácaros presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p < 0,001$; PE = 80,6 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,87 \pm 0,49$ en los pacientes sensibilizados a los ácaros.

PÓLENES

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y sensibilizados a los pólenes presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p < 0,001$; PE = 94,7 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,92 \pm 0,51$ en los pacientes sensibilizados a los pólenes.

EPITELIOS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y sensibilizados a los epitelios presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p < 0,001$; PE = 77 %), con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,87 \pm 0,43$ en los pacientes sensibilizados a los epitelios.

HONGOS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y sensibilizados a los hongos presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p = 0,03$; PE = 35,5 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $1,00 \pm 0,84$ en los pacientes sensibilizados a los hongos.

MONOSENSIBILIZADOS A LOS ÁCAROS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y monosensibilizados a los ácaros presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p = 0,011$; PE = 60,8 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,94 \pm 0,63$ en los pacientes monosensibilizados a los ácaros.

MONOSENSIBILIZADOS A PÓLENES

El grupo control y el de pacientes diagnosticados de alergia y monosensibilizados a los pólenes presentaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* ($p < 0,001$; PE = 92,8 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,98 \pm 0,42$ en los pacientes monosensibilizados a los pólenes.

SENSIBILIZADO AL MENOS A ÁCAROS Y PÓLENES

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de alergia y sensibilizados al menos a ácaros y pólenes simultáneamente presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,002$; PE = 69 %) con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,85 \pm 0,44$ en los pacientes sensibilizados como mínimo a ácaros y pólenes.

POLISENSIBILIZADOS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados y polisensibilizados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$; PE = 83,3 %) con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,89 \pm 0,52$ en los pacientes polisensibilizados.

EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y NIVELES DE IGE TOTAL

Se observaron diferencias significativas en los niveles de IgE total, que fueron superiores a medida que aumentaba el número de grupos a los que los pacientes estaban sensibilizados, si bien no se observaron estas diferencias con los niveles de expresión de *PTGDR* entre esos mismos grupos (Tabla 20, Figura 34).

Tabla 20.- Valores de IgE y niveles de expresión de *PTGDR* según el número de grupos de aeroalérgenos a los que los pacientes estaban sensibilizados.

N° Sensibilizaciones	IgE	<i>PTGDR</i>
	Media ± ds	Media ± ds
1 (n=71)	246 ± 314	0,960 ± 0,533
2 (n=58)	363 ± 446	0,889 ± 0,572
3 (n= 50)	467 ± 475	0,922 ± 0,483
4 (n=9)	626 ± 584	0,680 ± 0,237
Significación	p = 0,003	p = 0,290

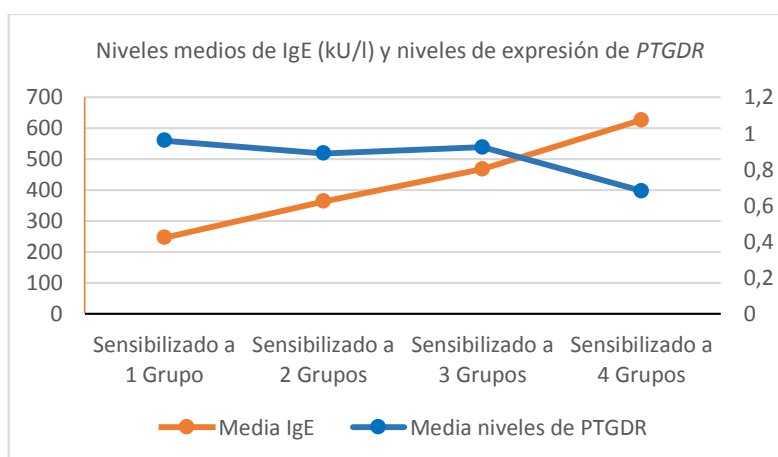


Figura 34.- Representación de los niveles de *PTGDR* y niveles de IgE total.

EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

ASMA

Se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de *PTGDR* en el grupo de pacientes con asma ($p < 0,001$; PE = 92,2 %) con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,92 \pm 0,55$ en los pacientes diagnosticados de asma alérgica.

ASMÁTICOS MONOSENSIBILIZADOS

En el caso de los pacientes diagnosticados de asma con monosensibilización, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos y los controles ($p = 0,044$; PE = 38,6 %) con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,95 \pm 0,70$ en los pacientes diagnosticados de asma alérgica y monosensibilizados a los ácaros.

Los pacientes asmáticos monosensibilizados a pólenes también presentan diferencias significativas con una $p = 0,003$ (PE = 75,10 %) con una media en los niveles de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,96 \pm 0,43$ en los pacientes.

No hubo pacientes monosensibilizados a los epitelios y hongos, por lo que no se presentan datos sobre este tipo de pacientes.

ASMÁTICOS POLISENSIBILIZADOS

Por otra parte, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes diagnosticados de asma alérgica y polisensibilizados ($p < 0,001$; PE = 81,3 %). La media en los niveles de expresión de *PTGDR* en los controles fue de $0,68 \pm 0,52$ frente a los niveles de los asmáticos polisensibilizados, que fueron de $0,90 \pm 0,54$.

El resumen de los resultados anteriormente expuestos con respecto a la variable clínica asma, se muestra en la tabla 21.

Tabla 21.- Resumen de los niveles de expresión de *PTGDR* con respecto a la variable clínica asma.

	n	Pacientes Media ds	p*	P.E.
Controles	104	0,682 ± 0,521		
PC+	188	0,915 ± 0,523	0,001	95,4 %
Asma Alérgica	131	0,918±0,546	0,001	92,2 %
Asmáticos polisensibilizados	89	0,900±0,536	0,001	81,3 %
Asmáticos monosensibilizados a ácaros	21	0,952 ± 0,701	0,044	38,6 %
Asmáticos monosensibilizados a pólenes	21	0,964±0,428	0,003	75,1 %

PE: Poder estadístico

RINITIS

El grupo control y el de los pacientes diagnosticados de rinitis alérgica presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$; PE = 94,4 %) con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,91 \pm 0,50$ en los pacientes diagnosticados de rinitis alérgica.

PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA Y MONOSENSIBILIZACIÓN

En el caso de los pacientes diagnosticados de rinitis y monosensibilizados, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes con rinitis monosensibilizados a ácaros ($p = 0,016$; PE = 46,5 %), con una media en los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,87 \pm 0,50$ en los

pacientes. Los pacientes con rinitis alérgica monosensibilizados a los pólenes también presentaron diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0,001$; PE = 92,8 %) con una media de los niveles de expresión de *PTGDR* de $0,68 \pm 0,52$ en los controles frente a $0,98 \pm 0,42$ en los pacientes.

PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA Y POLISENSIBILIZACIÓN

Por otra parte, también existieron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes diagnosticados de rinitis alérgica y polisensibilizados ($p < 0,001$; PE = 84,9 %). La media de los niveles de expresión de *PTGDR* en los controles fue de $0,68 \pm 0,52$ frente a unos niveles en los asmáticos polisensibilizados de $0,89 \pm 0,52$. Estos resultados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22.- Tabla resumen de niveles de expresión de *PTGDR* con respecto a la variable clínica rinitis.

	n	Pacientes Media ds	p*	P.E.
Controles	104	$0,682 \pm 0,521$		
PC+	188	$0,915 \pm 0,523$	0,001	95,4 %
Rinitis alérgica	182	$0,906 \pm 0,499$	0,001	94,4 %
Rinitis alérgica polisensibilizados	114	$0,894 \pm 0,522$	0,001	84,9 %
Rinitis monosensibilizados ácaros	34	$0,870 \pm 0,503$	0,016	46,5 %
Rinitis monosensibilizados a pólenes	34	$0,983 \pm 0,416$	0,001	92,8 %

PE: Poder estadístico

5.3.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *PTGDR* CON LAS VARIABLES CLÍNICAS

5.3.1.~ POLIMORFISMOS DE *PTGDR* Y SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA

En este estudio se han analizado 9 polimorfismos ubicados en la región promotora del gen *PTGDR*. En la tabla 23 se muestran las frecuencias alélicas (modelo aditivo) y genotípicas en nuestra muestra. El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió en todos los casos, salvo en el caso del grupo control para el polimorfismo -441 C>T.

Tabla 23.- Frecuencias alélicas y genotípicas de los distintos SNP

Polimorfismo	Alélica			Genotípica		
	Controles	Pacientes	p	Controles	Pacientes	p
-1289 G>A	A:0,36	A:0,273	0,027	AA: 0,100 GA: 0,518	AA: 0,077 GA: 0,392	0,044
-1122 T>C	C:0,359	C: 0,278	0,038	CC: 0,100 TC: 0,518	CC: 0,082 TC: 0,392	0,05
-881 C>T	T: 0,100	T: 0,116	0,54	TT: 0 CT:0,200	TT: 0,010 CT: 0,211	0,54
-834 C>T	T:0,239	T:0,289	0,18	TT: 0,063 CT: 0,351	TT: 0,077 CT: 0,423	0,35
-613 C>T	T: 0,104	T:0,116	0,64	TT: 0 CT: 0,207	TT: 0,010 CT: 0,211	0,55
-549 T>C	C: 0,590	C:0,526	0,12	CC: 0,360 CT: 0,459	CC: 0,268 CT: 0,515	0,23
-441 C>T	T:0,180	T:0,178	0,942	TT: 0,063 CT:0,234	TT: 0,052 CT: 0,253	0,874
-197 T>C	C:0,099	C:0,121	0,408	CC:0,009 CT:0,180	CC:0,015 CT:0,211	0,313
-95 G>T	T:0,005	T:0,013	0,313	TT: 0 GT:0,009	TT: 0 GT:0,026	0,310

A continuación, se describen las distintas asociaciones encontradas entre los distintos grupos de pacientes y los polimorfismos de *PTGDR*.

PRUEBAS CVTÁNEAS (PC) POSITIVAS

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* en los pacientes respecto a los controles [$p = 0,044$; poder estadístico (PE) = 56,9 %]. El genotipo AG resultó más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,39). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,045$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA).

SENSIBILIZACIÓN A LOS PÓLENES

A partir del análisis bivalente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* ($p = 0,020$; PE = 68,3 %). El genotipo AG fue más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,37). Esta asociación se confirmó con el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,028$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA).

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas ($p = 0,025$; PE = 68,3 %). El genotipo CT fue el más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,37). Esta asociación se confirmó con el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,029$ para la distribución genotípica (TT frente a CT y CC).

SENSIBILIZACIÓN SOLAMENTE A ÁCAROS Y PÓLENES

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* en los pacientes ($p = 0,050$; PE = 54,1 %). El genotipo AG fue más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,31). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad

y sexo con una $p = 0,009$ para la distribución genotípica (AG frente a GG y AA con OR: 0,24 IC 95%: 0,08-0,70; FPRP = 14,4 %).

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas ($p = 0,050$; PE = 54,1 %). El genotipo CT resultó más frecuente en los controles (0,52) que en pacientes (0,31). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,009$ para la distribución genotípica (CT frente a TT y CC con OR: 0,24 IC 95%: 0,08-0,70; FPRP = 14,4 %).

SENSIBILIZACIÓN AL MENOS A ÁCAROS Y PÓLENES

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,023$; PE = 75,4 %) en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR*. El genotipo AG fue más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,33). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,031$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA, y AG frente a GG y AA)

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas ($p = 0,023$; PE = 75,4 %). El genotipo CT fue el más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,33). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,031$ para la distribución genotípica (TT frente a CT y CC, y CT frente a TT y CC)

SENSIBILIZACIÓN A MÁS DE 1 GRUPO DE AERIALÉRGENOS (POLISENSIBILIZADOS)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* en los pacientes respecto a los controles ($p = 0,037$; PE = 63 %). El genotipo AG resultó más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,37). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo, con una $p = 0,044$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA).

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas en pacientes ($p = 0,037$; PE = 63 %). El genotipo CT fue más frecuente en los controles (0.52) que en pacientes (0.37). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,044$ para la distribución genotípica (TT frente a CT y CC).

5.3.2.~ POLIMORFISMOS DE *PTGDR* Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

ASMA ALÉRGICA EN PACIENTES POLISENSIBILIZADOS

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* ($p = 0,041$; PE = 52,8 %). El genotipo AG fue más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,38). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,040$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA).

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas ($p = 0,041$; PE = 52,8 %). Sí, el genotipo CT resultó el más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,38). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,040$ para la distribución genotípica (TT frente a CT y CC).

RINITIS ALÉRGICA EN PACIENTES POLISENSIBILIZADOS

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR* ($p = 0,030$; PE = 67,1 %). El genotipo AG fue más frecuente en los controles (0,52) que en los pacientes (0,36). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,025$ para la distribución genotípica (GG frente a AG y AA, y AG frente a GG y AA).

El polimorfismo -1122T>C del promotor de *PTGDR* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias genotípicas ($p = 0,030$;

PE = 67,1 %). El genotipo CT fue más frecuente en los controles (0,52) que en pacientes (0,36). Esta asociación se confirmó en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo con una $p = 0,025$ para la distribución genotípica (TT frente a CT y CC, y CT frente a TT y CC).

El resumen de los resultados de asociación de polimorfismos para las variables de diagnóstico clínico se muestra en la tabla 24.

Tabla 24.- Resultados de asociación génica para las variables alergia, asma y rinitis

Grupo	SNP	p	Frecuencias alélicas				Frecuencias Genotípicas		
			OR	IC 95%	Poder	FPRP	p	Poder	Genotipo
Asma Alérgica n = 137	-1289 G>A	0,019	0,630	0,429- 0,928	38,4%	32,8%	0,045	43,2%	A/G
	-1122 T>C	0,030	0,655	0,446- 0,962	33,8%	35,8%			
Asma+Polisensibilización n = 93	-1289 G>A	0,021	0,603	0,392- 0,928	36,9%	27,9%	0,041	52,8%	A/G
	-1122 T>C	0,021	0,603	0,392- 0,928	36,9%	27,9%	0,041	52,8%	C/T
Rinitis n = 188	-1289 G>A	0,035	0,682	0,478- 0,975	32%	39,2%			
	-1122 T>C	0,049	0,701	0,491- 0,999	28,7%	47%			
Rinitis+Polisensibilización n = 119	-1289 G>A	0,029	0,643	0,431- 0,957	33,7%	34,7%	0,030	67,1%	A/G
	-1122 T>C	0,029	0,643	0,431- 0,957	33,7%	34,7%	0,030	67,1%	C/T

5.4.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y LOS POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DE *PTGDR*.

5.4.1~ POBLACIÓN GENERAL

En cuanto a la relación de los polimorfismos y los niveles de expresión de *PTGDR* se observaron diferencias estadísticamente significativas en la población global entre los niveles de expresión y los distintos genotipos del polimorfismo -1289G>A ($p = 0,034$). Los datos medios de expresión para los distintos genotipos fueron GG ($0,88 \pm 0,52$), AG ($0,81 \pm 0,55$) y AA ($0,64 \pm 0,45$), con unos niveles de *PTGDR* muy bajos en el caso del genotipo homocigoto mutado AA.

Se realizó un estudio del modelo de herencia que seguía la distribución alélica del SNP -1289G>A y se comprobó que, en la población total, para el modelo alélico dominante, existieron diferencias estadísticamente significativas en la distribución alélica respecto a los niveles de expresión de *PTGDR* ($p = 0,032$). La media de los niveles de *PTGDR* fue para el alelo G de $0,88 \pm 0,52$ y para el alelo A de $0,78 \pm 0,54$.

Del mismo modo, el polimorfismo -1122T>C presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* de los distintos genotipos ($p = 0,04$). La media de los niveles de expresión de *PTGDR* fue para el genotipo TT de $0,88 \pm 0,53$, para el genotipo CT $0,81 \pm 0,55$, mientras que el genotipo homocigoto mutado CC de nuevo presentó los niveles más bajos $0,65 \pm 0,45$.

El modelo de herencia que seguía la distribución alélica del SNP -1122T>C en la población general es dominante. Se comprobó que existían diferencias significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* con esta distribución alélica, $p = 0,046$. Las medias de los niveles de expresión de *PTGDR* fueron para el alelo T de $0,88 \pm 0,52$ y para el alelo C de $0,78 \pm 0,54$.

Igualmente, el polimorfismo -549T>C presentó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *PTGDR* de los distintos genotipos ($p =$

0,011). Las medias de los niveles de expresión de *PTGDR* fueron, para el genotipo TT $0,85 \pm 0,57$ para el genotipo CT $0,91 \pm 0,56$ y para el genotipo CC $0,68 \pm 0,42$.

La distribución alélica del SNP -549T>C siguió un modelo de herencia recesivo en la población general. Se comprobó que existían diferencias significativas en los niveles de expresión de *PTGDR* si se tenía en cuenta este tipo de distribución alélica ($p = 0,004$). La media de los niveles de *PTGDR* fue para el alelo T de $0,90 \pm 0,56$ y para el alelo C de $0,68 \pm 0,42$.

5.4.2~ SENSIBILIZACIÓN SOLAMENTE A ÁCAROS Y POLEN

Entre los grupos de pacientes sensibilizados cabe destacar que los pacientes sensibilizados conjuntamente y únicamente a ácaros y pólenes presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de *PTGDR* y la distribución de los genotipos de los polimorfismos -1289G>A ($p = 0,009$), -1122T>C ($p = 0,009$) y -549T>C ($p = 0,05$).

Se corroboró que existían diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de *PTGDR* con la distribución de las frecuencias alélicas de -1289G>A según un modelo de herencia alélica dominante en el que se comparó GG vs. AG + AA ($1,06 \pm 0,54$ Vs $0,49 \pm 0,39$) ($p = 0,005$). En cuanto al SNP -1122T>C, debido a su ligamiento con -1289G>A, se obtuvieron resultados similares.

Estas asociaciones se confirmaron para -1289G>A en el estudio de regresión ajustado por edad y sexo [$p = 0,004$ con un OR = 5,108; IC 95% (1,663 - 15,683)] para la distribución genotípica (GG vs AG + AA)]. Al igual sucedió con -1122T>C para la distribución genotípica (TT vs CT y CC).

Por último, se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de expresión de *PTGDR* y la distribución alélica de -549T>C si se le asignaba un modelo de herencia alélica recesiva al comparar TT + CT vs CC ($1,00 \pm 0,55$ Vs $0,55 \pm 0,44$) ($p = 0,019$). Esta asociación no se confirmó para -549T>C en el estudio de

regresión ajustado por edad y sexo [$p = 0,143$ para la distribución genotípica (TT vs CT y CC)]

5.5~ NIVELES DE *PTGDR* Y APLICACIÓN CLÍNICA

Para analizar los niveles de *PTGDR* respecto a su posible aplicación clínica para el diagnóstico de alergia, procedimos a realizar una curva ROC (Figura 34) y obtuvimos un área bajo la curva de 0,654, con un IC 95 % (0,588-0,721) y un error estándar de 0,034.

El análisis de dicha curva proporciona un posible punto de corte para la expresión de *PTGDR* de 0,509 para el cual obtenemos un 81,4% de sensibilidad y un 42,3% de especificidad. El valor predictivo positivo para este punto de corte es del 72% y el valor predictivo negativo del 55%.

Debido a que la especificidad es baja es aconsejable utilizar este parámetro junto con la historia clínica y las pruebas cutáneas para terminar de confirmar el diagnóstico de alergia.

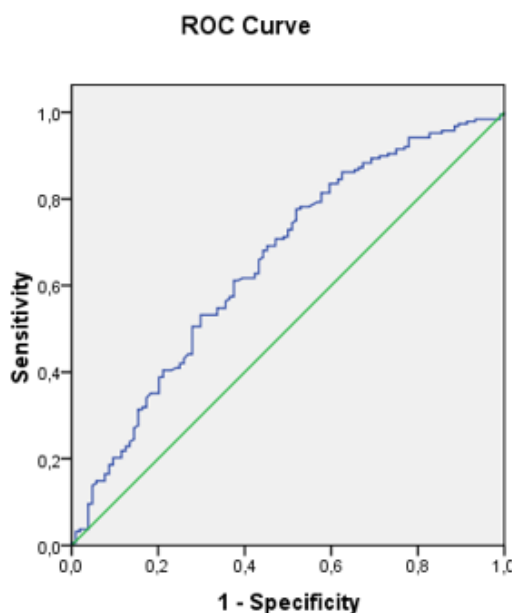


Figura 35.- Representación de la curva ROC para los niveles de expresión de *PTGDR* y el diagnóstico de alergia.

DISCVSIÓN

6.~ DISCVSIÓN

6.1.~ CARACTERÍSTICAS DE LA MVESTRA

En cuanto a las características de la muestra cabe destacar que se encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad de controles y pacientes. Los controles tenían una edad significativamente superior que los pacientes, lo que tiene, por otro lado, la ventaja de confirmar durante más tiempo que no han desarrollado la enfermedad. El posible efecto de esta variable sobre los niveles de expresión de *PTGDR* ha sido corregido mediante una regresión logística ajustada por edad.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la variable sexo en los grupos poblacionales de estudio a pesar de lo cual se incluyó dicha variable en el ajuste de la regresión para un mayor control estadístico.

Por otro lado, como era de esperar, existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de inmunoglobulina E total entre controles y pacientes (140). También, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de inmunoglobulina E total entre los pacientes que padecían asma y rinitis alérgica, que son pacientes con una sintomatología más grave que los pacientes diagnosticados exclusivamente de rinitis alérgica (155). Esto viene a reforzar la idea de que las distintas manifestaciones alérgicas en las vías respiratorias podrían representar una enfermedad continua en lugar de entidades paralelas discretas que ocurren simultáneamente (156,157). De esta forma, la inflamación simultánea del tracto respiratorio superior y del inferior tendría más repercusión sobre los niveles de IgE total que la afectación exclusivamente del tracto superior.

En el caso de los pacientes asmáticos se observó con mayor frecuencia la presencia de asma intermitente y rinitis persistente moderada, esto se corresponde con los datos observados en poblaciones mediterráneas según los criterios GINA y ARIA (158,159,160), pero difiere respecto a las poblaciones asiáticas, en las que predomina la rinitis leve intermitente (161).

Se ha descrito que un tercio de los pacientes con rinitis alérgica presenta asma (28,30). Esto no se cumple en este estudio, porque se seleccionaron, de manera intencional, pacientes asmáticos para ser incluidos en el estudio.

En cuanto a la sensibilización de los pacientes a los aeroalérgenos cabe destacar que el grupo de aeroalérgenos que predominó fue el de los pólenes seguido del grupo de los ácaros (72,74,76,79,80). En este estudio en el grupo de pólenes el 24 % correspondió a pacientes monosensibilizados, mientras que hubo un 76 % de pacientes polisensibilizados. En el caso de los pacientes sensibilizados al grupo ácaros, el 27 % correspondió a monosensibilizados y 73 % a polisensibilizados. Del grupo completo de pacientes los monosensibilizados corresponden a un 37 % del total, el resto estaba sensibilizado a más de un grupo de aeroalérgenos como sucede en los estudios ya publicados hasta la fecha (74,77,78). De entre los monosensibilizados, el 52 % lo era a los ácaros y el 48 % a los pólenes, una situación perfecta para comparar ambos grupos.

Por último, se ha sugerido que la historia familiar juega un papel muy importante en el desarrollo del asma y la atopia. El 41 % de los pacientes presentaron antecedentes familiares de atopia o alergia en nuestro estudio; estos datos se corresponden con la bibliografía donde se indica que existe un riesgo máximo del 40-45 % de ser alérgico cuando se tiene dos familiares de primer grado afectados y que disminuye al disminuir el número de ascendientes afectados (162).

6.2.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y LAS VARIABLES CLÍNICAS.

Para tener unos resultados de expresión génica fiables es necesario seleccionar un buen gen de referencia. En caso contrario, el experimento de qPCR será difícilmente reproducible debido a la mala calidad de los datos (154).

Los genes de referencia, también denominados constitutivos, se corresponden con un grupo de genes que se expresan de forma relativamente constante en el organismo, ya que son necesarios para el correcto funcionamiento y mantenimiento del mismo (154). La estabilidad del gen de referencia en todos nuestros sujetos es lo que nos permite

realizar un índice para compararlos entre sí y poder obtener conclusiones sobre como se está comportando el gen en estudio de acuerdo con las características clínicas de la población.

En este estudio los genes de referencia seleccionados fueron *GAPDH* y *TBP*, el primero está relacionado con la vía de la glicolisis y el segundo con la transcripción. El gen de referencia más estable se correspondía con *TBP* y el otro gen estable elegido, con respaldo bibliográfico en estudios con población alérgica, fue *GAPDH* (163,164). En los estudios de expresión es recomendable utilizar al menos dos genes de referencia, ya que uno sólo puede dar lugar a errores relativamente grandes (165). En nuestro estudio de expresión se observó una buena correlación entre los resultados de expresión llevados a cabo de forma paralela con ambos genes de referencia, confirmando así la fiabilidad de los resultados de expresión presentados.

Además, se realizó un estudio pormenorizado de las condiciones experimentales idóneas para la determinación de los niveles de expresión, en el que se incluyó un estudio de eficiencia de los cebadores para la qPCR y la estimación de la calidad de ARN mediante el índice *RIN*, lo que nos permite asegurar que todas nuestras aproximaciones iniciales garantizan unos resultados de calidad óptima. Todos los parámetros técnicos presentaron una gran calidad, con la cual queremos asegurar la reproducibilidad de los resultados de este estudio.

6.2.1~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y LA SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA

En el estudio de expresión se observaron asociaciones altamente significativas entre los niveles de expresión de *PTGDR* y las distintas variables de sensibilización alérgica. Todos los pacientes sensibilizados presentaban niveles de expresión de *PTGDR* en sangre periférica superiores a los de los no alérgicos. De todos los grupos de aeroalérgenos llama la atención que los pacientes monosensibilizados al grupo de ácaros o al grupo de pólenes presentaban niveles ligeramente superiores a los del resto de grupos, siendo los pacientes monosensibilizados a pólenes el grupo que más destacaba. Por todo esto, parece posible que *PTGDR* pueda ser un marcador de la alergia, no específico de

grupo de aeroalérgeno, si bien se encuentra especialmente elevado en el grupo con sensibilización a pólenes.

Para que un biomarcador pueda ser considerado un buen biomarcador debería ser capaz de diferenciar dos o más estados biológicos, ser robusto y tener utilidad clínica sobre otros marcadores que se utilicen y debe ser detectado en una muestra biológica que pueda obtenerse de forma no invasiva (166).

En relación a su capacidad de discriminar entre la situación alérgica y no alérgica, si bien posee una gran sensibilidad, que permitiría identificar a los verdaderos positivos, pacientes positivos para este marcador y que realmente son alérgicos, con un buen valor predictivo positivo, su especificidad, así como su valor predictivo negativo son escasos, ya que pacientes no alérgicos podrían tener elevado su nivel. Sería muy interesante poder realizar un estudio evolutivo de dichos individuos para analizar el carácter predictivo en la evolución a largo plazo de dicho biomarcador.

Por otro lado, aunque PTGDR parece ser un marcador de alergia independiente de la clínica asociada, sus niveles son más elevados en los pacientes monosensibilizados a pólenes. En este grupo no se presentó ningún caso con niveles de PTGDR inferiores 0,3 de *PTGDR* con lo cual podríamos considerar que un paciente con niveles por debajo de 0,3 en ningún caso podría formar parte de dicho grupo. Este dato, además nos podría proporcionar más información, ya que puede estar relacionado con la situación intermitente, por la activación estacional del polen sobre el receptor. De esta forma se explicaría que, en el caso de estar sensibilizados a ácaros a los cuales están expuestos siempre, PTGDR tendría una respuesta menos exacerbada en relación con la cronicidad de la estimulación. En el caso de los pólenes la activación intermitente podría desencadenar un mecanismo inflamación, con una respuesta inicial más abrupta, si bien se necesitarían más estudios para su confirmación.

Además, se ha demostrado experimentalmente que los fitoprostanos contenidos en los granos de polen son moléculas que se asemejan estructural y funcionalmente a la prostaglandina E2 endógena y parecen actuar sobre las células dendríticas provocando

una disminución de IL-12 y favoreciendo la polarización a respuesta Th2 (167). Esto podría estar sucediendo para otros receptores de la misma familia, como es *PTGDR*.

El mecanismo no parece discernir entre los monosensibilizados y polisensibilizados, ya que no se encontraron diferencias significativas, aunque los pacientes monosensibilizados a ácaros presentaron algunas excepciones por debajo de 0,3 al igual que los polisensibilizados.

En cuanto a la utilidad clínica frente a otros marcadores existentes como la IgE total se observa que para el punto de corte de *PTGDR* propuesto los datos son prometedores. *PTGDR* presenta una sensibilidad mayor y una especificidad menor en nuestra muestra que la IgE total para el punto de corte de 100kU/l. Esto, junto con el carácter predictivo similar al de la IgE total podría proporcionar un valor añadido.

Finalmente, sobre la posibilidad de ser detectado en una muestra biológica que pueda obtenerse de forma no invasiva. La ventaja de *PTGDR* como biomarcador es que se mide en sangre periférica, como la mayoría de pruebas rutinarias de laboratorio. Este estudio identifica por primera vez el aumento de la expresión en sangre periférica de los pacientes alérgicos. La producción de PGD₂ por parte de mastocitos a nivel local y de células Th2 posiblemente en circulación estaría activando el receptor *PTGDR*. Resultaría muy interesante identificar qué células podrían estar contribuyendo en sangre periférica a su elevación. Pudiera ser que la PGD₂ de los linfocitos Th2 de sangre periférica desempeñase un papel importante en la contribución a la activación de *PTGDR* en células dendríticas, células de músculo liso de los vasos sanguíneos y plaquetas (168). A su vez se ha descrito que las células dendríticas reducirían la producción de citoquina IL-12, la cual activa las células Th1 (169) y aumentaría la respuesta alérgica mediante la promoción del sesgo de linfocitos T hacia población Th2 al menos durante la fase de sensibilización (168).

Otras células sanguíneas que presentan el receptor *PTGDR* son los linfocitos Th1, Th2, NK, linfocitos B, neutrófilos, basófilos y eosinófilos (105,109). Por ello, sería de gran interés cuantificar cuanto contribuye cada población de células sanguínea a la sobreexpresión de *PTGDR* para entender de una manera más exacta el mecanismo

biológico mediante el cual se desencadena la respuesta alérgica en relación a la activación de dicho receptor.

Una posible utilidad como biomarcador de los niveles de expresión de *PTGDR* podría ser la inmunoterapia, en el caso de que sus niveles se modificaran significativamente a lo largo de la misma

6.2.2.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los niveles de *PTGDR* fueron significativamente superiores en los pacientes diagnosticados de asma y rinitis, y en los que presentaron exclusivamente rinitis alérgica que en los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de rinitis sola o asociada al asma para los niveles de expresión de *PTGDR*, por lo que parece un marcador independiente de las manifestaciones clínicas.

Destaca que, tanto en el caso del asma como en el de la rinitis alérgica, los pacientes monosensibilizados al polen presentaban niveles de expresión de *PTGDR* significativamente superiores que el resto de los grupos. Además, en todos los grupos con diferencias importantes el denominador común sigue siendo la sensibilización al polen. Estos resultados abren la puerta a la posible contribución de este biomarcador para complementar otras pruebas que apoyen el diagnóstico de la alergia.

6.2.3.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR* Y LOS NIVELES DE IGE TOTAL

Cuando comparamos el comportamiento de los niveles de IgE sérica total y los niveles de expresión de *PTGDR* en los pacientes alérgicos, observamos que los niveles de IgE se incrementaban con el número de grupos a los que eran sensibles los pacientes, como era de esperar (170); sin embargo, no sucedió esto mismo con los niveles de *PTGDR*, que no mostraron diferencias significativas respecto al número de grupos a los que son sensibles los pacientes. Estos resultados podrían indicar que *PTGDR* podría ser

un indicador de activación del mecanismo de inflamación más que de la gravedad de la respuesta.

6.3.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *PTGDR* CON LAS VARIABLES CLÍNICAS

6.3.1.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *PTGDR* CON LA SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA

En cuanto al estudio de genotipado se observó que para el polimorfismo -1289G>A de *PTGDR* era significativamente más frecuente el genotipo AG en los controles que en los pacientes con pruebas cutáneas positivas, lo cual indicaría que el alelo A podría tener un papel protector, ya que la presencia del alelo A se asoció con una disminución del riesgo a desarrollar la enfermedad.

El hecho de que el genotipo AG fuera significativamente más frecuente en controles se replicó en los casos en que los pacientes estaban sensibilizados a los pólenes; sensibilizados a exclusivamente ácaros y pólenes; sensibilizados a ácaros, pólenes y como mínimo otro grupo de aeroalérgenos entre los que se encuentran los epitelios y los hongos, y en los polisensibilizados, lo cual implica cualquier combinación de dos grupos de aeroalérgenos, por lo que parece una asociación general del proceso alérgico.

Este SNP no se había asociado hasta ahora con ningún grupo clínico y por primera vez se describe asociado a la alergia. El efecto del -1289G>A parece protector, al ser más frecuente en controles que en pacientes alérgicos. Esto puede ser una adaptación al medio pero lo que sí está claro es que se están descubriendo más casos de polimorfismos protectores, como el -765G>C en el enzima COX-2 de la ruta de la inflamación, que protege frente al desarrollo de enfermedad obstructiva pulmonar crónica (171).

Si buscamos un denominador común entre los grupos de sensibilización para el SNP -1289G>A, se puede ver que, generalmente, los pacientes alérgicos al polen en combinación con otro grupo de aeroalérgenos presentan diferencias con los controles.

Estas diferencias en las frecuencias de los genotipos parecen ser más intensas cuando el existe cosensibilización a ácaros y pólenes.

Previamente se ha descrito un receptor de la misma familia de *PTGDR*, denominado *PTGER2* y se han asociado algunos de sus polimorfismos al asma (172)

Por otra parte, para el polimorfismo -1122T>C, al igual que sucedía con -1289G>A, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias del genotipo CT entre controles y pacientes sensibilizados a pólenes, solamente a ácaros y pólenes, ácaros y pólenes como mínimo, y polisensibilizados. Esto indicaría un posible desequilibrio de ligamiento con -1289G>A, lo que se confirma al observar un valor de $D' = 0,99$ para el estudio de ligamiento. El efecto de -1122T>C sería protector, al ser más frecuente en controles que en pacientes alérgicos el genotipo CT, por lo que sospechamos que el alelo menos frecuente, en este caso C tiene ese carácter.

Entre los polimorfismos estudiados se observó, en un estudio previo, que existía un fuerte desequilibrio de ligamiento de -95G>T con -549T>C, -441C>T y -197T>C ($D' = 0,99, 0,99$ y $0,94$, respectivamente) pero no con -613C>T ($D' = 0,01$) (140). En el presente estudio se reproduce el desequilibrio de ligamiento de -95G>T con -549T>C, -441C>T y -197T>C ($D' = 0,99, 0,93$ y $0,99$, respectivamente) y también con -613C>T ($D' = 1$). Esta diferencia puede deberse a que en el estudio previo el criterio de inclusión fue el asma fuese o no alérgica y en el presente estudio el criterio de inclusión fue la alergia, de este modo podemos explicar estas diferencias.

Los polimorfismos -1289G>A y -1122T>C no hay datos de estudios anteriores respecto al desequilibrio de ligamiento, pero si los hay de otros polimorfismos no estudiados del promotor de *PTGDR* que han sido estudiados en el presente estudio. Por ejemplo, en una población danesa se encontró un desequilibrio de ligamiento muy importante entre polimorfismos que se encuentran en el promotor y la zona codificante como es el caso de -731A>G y +6651C>T ($D' = 0,98$) (173).

En un estudio previo en niños chinos asmáticos se publicó que había un fuerte desequilibrio de ligamiento entre -549T>C y -441C>T ($D' = 1,0$), En el presente estudio,

a pesar de utilizar población adulta alérgica, observamos un desequilibrio igual de fuerte para estos polimorfismos ($D' = 0,99$) (174).

6.3.2.~ ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *PTGDR* CON LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

En el estudio hemos observado que, en el polimorfismo -1289G>A del promotor de *PTGDR*, el genotipo AG era significativamente más frecuente en los controles que en los pacientes asmáticos polisensibilizados. Esto apunta a que el alelo menos frecuente, A podría tener un papel protector, ya que la presencia del alelo A en el genotipo AG disminuye el riesgo a padecer la enfermedad. Esto mismo se replicó en el polimorfismo -1122T>C con el genotipo CT, donde el alelo C parece disminuir el riesgo a sufrir la enfermedad. La replicación de los datos en ambos polimorfismos es debido a que presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento ($D' = 1,0$).

En el caso de la rinitis en pacientes polisensibilizados, tanto la significación como el poder estadístico de la misma es mejor que en el caso de los pacientes asmáticos polisensibilizados. Así, se observó igualmente que el genotipo AG era significativamente más común en los controles que en los pacientes para el SNP -1289G>A, al igual que sucede con el genotipo CT en el polimorfismo -1122T>C. Probablemente el poder estadístico es mejor debido a que este grupo es de mayor tamaño que el de asmáticos polisensibilizados; aun así, ambos grupos respaldan sus buenos resultados con poderes estadísticos muy buenos. Por último indicar que en este grupo también se observó un desequilibrio de ligamiento parejo al del grupo de asmáticos polisensibilizados ($D' = 1,0$).

Algunos de los polimorfismos utilizados en nuestro estudio se habían asociado anteriormente con el asma; así, por ejemplo, el SNP -549T>C ha sido asociado con esta enfermedad en pacientes caucásicos y afroamericanos, mientras el -441T>C solo fue asociado en población caucásica (137). En otro grupo, en población española, se asoció el SNP -197T>C con el asma y, más concretamente, con el asma alérgica (136). Además se comprobó que en los pacientes asmáticos los SNP -549T>C, -441T>C y -197T>C se

encuentran en una región donde se unen el factor de transcripción C/EBP β y miembros de la familia de GATA y Sp (136), que podrían estar involucradas en la mayor expresión de *PTGDR*. Otro estudio apoya este hecho, al asociar el SNP -549T>C con la urticaria aguda inducida por AINE en una población española (175); los autores postulan que la unión de GATA2/GATA3 modificaría la actividad del promotor de *PTGDR* (137). En otro estudio, el SNP -613C>T fue asociado con la alergia, principalmente con la cosensibilización a ácaros y pólenes, y, en ese mismo estudio, el SNP -549T>C se acercó mucho a la significación con una $p = 0,09$ en el grupo de alergia a ácaros y pólenes (140).

En nuestro estudio no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre estos polimorfismos y las variables clínicas analizadas, aunque este resultado podría explicarse por que, a diferencia de los estudios anteriormente mencionados, en nuestro estudio el primer criterio de inclusión está relacionado con la alergia y no con el asma en su conjunto.

De todas formas, existen estudios en población mexicana, puertorriqueña y afroamericana que contradicen la implicación de los SNP -549T>C, -441T>C y -197T>C (134) en el desarrollo del asma, al igual que estudios sobre población australiana (133). Estas discrepancias pueden deberse a pequeñas diferencias étnicas entre poblaciones o a factores ambientales, ya que únicamente en la población caucásica es reproducible la implicación de dichos polimorfismos del promotor de *PTGDR* con el asma, si bien esto debería de ser ratificado con más estudios en otras poblaciones. También puede ser que ciertos haplotipos en los que confluyen polimorfismos, no solo del promotor sino de la parte codificante del gen, de lugar a combinaciones específicas responsables de la susceptibilidad a la enfermedad,

6.4.~ ESTVDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y LOS POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DE *PTGDR*.

En la población general, en el estudio de asociación de la expresión de *PTGDR* con los polimorfismos localizados en su región promotora, observamos que existen diferencias significativas en los niveles de expresión de *PTGDR*, en el caso del polimorfismo -1289G>A, -1122T>C y -549T>C.

En el caso de -1289G>A se observa que el homocigoto mutado (AA) presenta niveles de expresión más bajos que el heterocigoto (AG) o el homocigoto silvestre (GG). Este mismo resultado se reproduce en el caso de los polimorfismos -1122T>C y -549T>C, que presentan niveles de *PTGDR* significativamente inferiores en el caso del genotipo homocigoto mutado (CC).

Además, existen diferencias en los niveles de *PTGDR* cuando los polimorfismos -1289G>A y -1122T>C se heredan con un modelo de herencia alélica dominante y -549T>C se hereda con un modelo de herencia recesivo; en los tres casos, el alelo mutado es el que presenta niveles inferiores de *PTGDR*. Estos resultados parecen indicar que el alelo menos frecuente para estos tres polimorfismos podría estar determinando una menor eficiencia en la expresión del gen *PTGDR*, que determinaría la menor expresión del gen observada en el grupo control.

En el grupo de pacientes sensibilizados a los ácaros y pólenes se observan también diferencias significativas entre los niveles de *PTGDR* y la distribución de los genotipos de -1289G>A, -1122T>C y -549T>C: los genotipos con alelos mutados son los que presentan niveles de *PTGDR* más bajos.

Por otra parte, existen diferencias en los niveles de *PTGDR* cuando la herencia alélica de los polimorfismos -1289G>A y -1122T>C es dominante y cuando la herencia alélica del -549T>C es recesiva, aunque en este último caso no se confirma cuando se ajusta por regresión a edad y sexo.

Los resultados de este trabajo claramente indican que *PTGDR* está asociado con la alergia por sus niveles de expresión y demuestra que los polimorfismos -1289G>A, -1122T>C y -549T>C son polimorfismos candidatos para explicar una parte de la variación en los niveles de expresión observados. Además, las diferencias tan significativas de los niveles de *PTGDR* en los grupos de pacientes, respaldadas con unos buenos poderes estadísticos, nos hacen pensar que los niveles de *PTGDR* constituyen un mejor marcador de la alergia que los polimorfismos de la región promotora. Estos resultados explicarían además las discrepancias que se encuentran en los estudios de asociación de polimorfismos de *PTGDR* hasta la fecha.

No obstante, los polimorfismos de la región promotora parecen explicar sólo una parte de estas variaciones en la expresión del gen, puesto que las diferencias detectadas no son tan significativas. Por este motivo, parece que existen otros factores como SNP en la región codificante, epigenéticos, u otros (176) que darían lugar a estas diferencias tan claras en la expresión del gen entre pacientes alérgicos y controles.

Por último, el hecho de que los pacientes alérgicos presenten niveles elevados de expresión de *PTGDR* y estos niveles apenas sufran diferencias entre los distintos grupos parece indicar que puede ser un marcador adecuado de alergia para todos los aeroalérgenos estudiados, pero principalmente para el grupo de monosensibilizados a pólenes, por lo que creemos que algunos grupos de aeroalérgenos pueden desencadenar discretas variaciones en la respuesta de expresión de *PTGDR*.

En definitiva, este trabajo abre un interesante campo sobre *PTGDR* como posible marcador de la alergia, que podría explicar con mayor detalle cómo actúa y qué consecuencias tiene en la activación de la ruta de la inflamación. La realización de futuros estudios en distintos grupos de pacientes atópicos sería de gran interés para confirmar nuestras conclusiones y determinar los mecanismos concretos mediante los cuales el aumento de la expresión de *PTGDR* se relaciona con la aparición del fenotipo alérgico.

CONCLUSIONES

7.~ CONCLUSIONES

- 1.- Los niveles de expresión del gen *PTGDR* se encuentran significativamente elevados en sangre periférica en los pacientes diagnosticados de alergia.
2. La asociación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* y la alergia se observa con independencia de las manifestaciones clínicas que presente el paciente.
3. La elevación de los niveles de ARNm de *PTGDR* en nuestros pacientes se observa en todos los patrones de sensibilización, si bien los niveles parecen ser superiores en los pacientes alérgicos exclusivamente a pólenes.
- 4.- En nuestros pacientes los polimorfismos de *PTGDR* -1289G>A, -1122T>C se encuentran ligados y, junto con el polimorfismo -549T>C, podrían estar implicados en la susceptibilidad a la alergia.
- 5.- Aunque se ha identificado una asociación de los polimorfismos 1289G>A, -1122T>C y -549T>C del gen *PTGDR* y la enfermedad alérgica, dicha asociación es menos intensa que la asociación con los niveles de expresión del gen.
- 6.- Si bien parece existir cierta relación entre los niveles de *PTGDR* y los polimorfismos de la región promotora de dicho gen, esta relación no es suficiente para explicar la regulación de la expresión en los pacientes alérgicos. Otros aspectos de regulación transcripómica, que trascienden los objetivos de esta tesis, podrían estar implicados.
7. La determinación de los niveles de expresión del gen *PTGDR* podría constituir un marcador biológico de la enfermedad, al ser un marcador sanguíneo con una buena sensibilidad y por su valor predictivo positivo; sin embargo debido a su escasa especificidad y valor predictivo negativo, que no superan a los marcadores actuales, por el momento no se puede considerar por si solo un biomarcador óptimo. Serían necesarios más estudios para determinar su valor y su posible contribución como biomarcador evolutivo, así como su trascendencia en la práctica clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.~ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ober C, Yao T. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev.* 2011 Jul; 242(1)(10-30): p. 242:10-30.
2. Jackson M. *Allergy: The History of a Modern Malady* Londres: Reaktion Books; 2007.
3. Johansson S, Bieber T, Dahl R, Friedmann P, Lanier B, Lockey R, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May; 113(5)(832-836): p. 91 (3-4): 243-261.
4. Cohen S, Dworetzky M. The allergy archives: Pioneers and Milestones. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 109(1)(179-184): p. 109 (1): 179-184.
5. Rojas-Espinosa O. *Inmunología (de memoria)* Madrid: Médica Panamericana; 2006.
6. Daëron M, Nimmerjahn F. *Fc Receptors* Berlin: Springer; 2014.
7. Cserhádi E. The history of bronchial asthma from the ancient times till the Middle Ages. *Acta Physiol Hung.* 2004; 91(3-4)(243-261): p. 91(3-4): 243-261.
8. Guía GEMA 4.0. Gemasma. [Online]. [cited 2015 Julio 17. Available from: <http://www.gemasma.com/?p=6577>.
9. Rackemann F. Studies in asthma: analysis of 213 cases in which patients were relieved for more than 2 years. *Arch Intern Med.* 1928; 41(346): p. 41:346.

10. De Nijs S, Venekamp L, Bel E. Adult-onset asthma: is it really different? *Eur Respir Rev.* 2013 Mar; 22(127)(44-52): p. 22 (127): 44-52.
11. Binia A, Kabesch M. Respiratory medicine - genetic base for allergy and asthma. *Swiss Med Wkly.* 2012; 22(142): p. 22 (142): w13612.
12. Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med.* 2013; 15(83)(243-249): p. 15 (83): 243-249.
13. Devries A, Vercelli D. Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013; 31(3)(183-189): p. 31(3): 183-189.
14. Hannaway P. *What to Do When the Doctor Says Its Asthma Gloucester: Fair Winds;* 2004.
15. Sears M, Burrows B, Herbison G, Holdaway M, Flannery E. Atopy in childhood II. Relationship to airway responsiveness, hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy.* 1993; 23(11)(949-956): p. 23(11): 949-956.
16. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz A, Denburg J, Fokkens W, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 Update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008 Apr; 63(86)(8-160): p. 63 (86): 8-160.
17. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* 2004; 59(5)(469-478): p. 59(5): 469-478.
18. Faiz A, Burgess J. How Can Microarrays Unlock Asthma? *J Allergy (Cairo).* 2012;(241314): p. 2012:241314.

19. Arshad S, Kurukulaaratchy R, Fenn M, Waterhouse L, Matthews S. Rhinitis in 10-year-old children and early life risk factors for its development. *Acta Paediatr.* 2002; 91(2)(1334-1338): p. 91(2): 1334-1338.
20. Marshall J. European Allergy White Paper: Allergic Diseases as a public health problem in Europe Braine-l'Alleud: UCB Institute of Allergy; 2004.
21. Watson W, S K. Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011 Nov; 7(1).
22. Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K, Wollenberg A, Przybilla B, Wüthrich B, et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy.* 2004 Dec; 59(12)(1318-1325).
23. Lamb C, Ratner P, Johnson C, Ambegaonkar A, Joshi A, Day D, et al. Economic impact of workplace productivity losses due to allergic rhinitis compared with select medical conditions in the United States from an employer perspective. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22(6)(1203-1210): p. 22(6): 1203-1210.
24. Malone D, Lawson K, Smith D, Arrighi H, Battista C. A cost of illness study of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 99(1)(22-27): p. 99(1): 22-27.
25. Pawankar R, Canonica G, Holgate S, Lockey R, Blaiss M. World Allergy Organization Web site. [Online].; 2013 [cited 2015 Enero 26. Available from: <http://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WhiteBook2-2013-v8.pdf>.
26. Bauchau V, Durham S. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J.* 2004; p. 24(5): 758-764.

27. Navarro A, Colás C, Antón E, Conde J, Dávila I, Dordal M, et al. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(2)(7-13): p. 19(2): 7-13.
28. Latvala J, von Hertzen L, Lindholm H, Haahtela T. Trends in prevalence of asthma and allergy in Finnish young men: nationwide study, 1966-2003. *BMJ*. 2005; 330(7501)(1186-1187): p. 330 (7501): 1186-1187.
29. Togias A. Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(6)(1171-1183): p. 111(6): 1171-1183.
30. Linneberg A, Nielsen N, Frolund L, Madsen F, Dirksen A, Jorgensen T. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population-based study. *Allergy*. 2002; 57(1048-1052): p. 57: 1048-1052.
31. US Department of Health and Human Services. National Heart, Lung and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) Bethesda: NHLBI Health Information Center; 2007.
32. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. [Online].; 2014 [cited 2015 Enero 26. Available from: www.ginasthma.org.
33. International Rhinitis Management Working Group. International Consensus Report on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Allergy*. 1994; 49(19)(1-34): p. 49(19): 1-34.
34. Weidinger S, Baurecht H, Naumann A, Novak N. Genome-wide association studies on IgE regulation: are genetics of IgE also genetics of atopic disease? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010; 10(5)(408-417): p. 10(5): 408-417.

35. Sippel J, Pedula K, Vollmer W, Buist A, Osborne M. Associations of smoking with hospital-based care and quality of life in patients with obstructive airway disease. *Chest*. 1999; 115(3)(691-696): p. 115(3): 691-696.
36. Zetterstrom O, Osterman K, Machado L, Johansson S. Another smoking hazard: raised serum IgE concentration and increased risk of occupational allergy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 283(6301)(1215-1217): p. 283(6301): 1215-1217.
37. Tamimi A, Serdarevic D, Hanania N. The Effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: therapeutic implications. *Respir Med*. 2012; 106(3)(319-328): p. 106(3): 319-328.
38. Broekema M, ten Hacken N, Volbeda F, Lodewijk M, Hylkema M, Postma D, et al. Airway epithelial changes in smokers but not in ex-smokers with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180(12)(1170-1178): p. 180(12): 1170-1178.
39. Beuther D, Sutherland E. Overweight, obesity and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Apr; 175(7)(661-666): p. 661-666.
40. Raj D, Kabra S, Lodha R. Childhood obesity and risk of allergy or asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014 Nov; 34(4)(753-765): p. 34(4): 753-765.
41. Shore S, Johnston R. Obesity and asthma. *Pharmacol Ther*. 2006 Apr; 110(1)(83-102): p. 110(1) :83-102.
42. Sood A, Shore S. Adiponectin, Leptin, Resistin in Asthma: Basic Mechanisms through Population Studies. *J Allergy (Cairo)*. 2013 Oct; 2013(785835): p. 2013:785835.

43. Brabäck L, Hjern A, Rasmussen F. Body mass index, asthma and allergic rhinoconjunctivitis in Swedish conscripts -a national cohort study over three decades. *Respir Med.* 2005 Aug; 99(8)(1010-1014): p. 99(8): 1010-1014.
44. Bonds R, Midoro-Horiuti T. Estrogen effects in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013 Feb; 13(1)(92-99): p. 13(1): 92-99.
45. Ticconi C, Pietropolli A, Piccione E. Estrogen replacement therapy and asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013 Dec; 26(6)(617-623): p. 26(6): 617-623.
46. Jenerowicz D, Silny W, Dańczak-Pazdrowska A, Polańska A, Osmola-Mańkowska A, Olek-Hrab K. Environmental factors and allergic diseases. *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19(3)(475-481): p. 19(3): 475-481.
47. Saglani S. Viral infections and the development of asthma in children. *Ther Adv Infect Dis.* 2013 Aug; 1(4)(139-150): p. 1(4): 139-150.
48. Warner J. The early life origins of asthma and related allergic disorders. *Arch Dis Child.* 2004 Feb; 89(2)(97-102): p. 89(2): 97-102.
49. WAO. World Allergy Organization. [Online]. [cited 2015 Febrero 2. Available from:
http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergic_march/.
50. Alm B, Goksör E, Pettersson R, Möllborg P, Erdes L, Loid P, et al. Antibiotics in the first week of life is a risk factor for allergic rhinitis at school age. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 Aug; 25(5)(468-472): p. 25(5): 468-472.

51. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 1999 Mar; 29(3)(342-346): p. 39: 342-346.
52. Marsland B. Influences of the microbiome on the early origins of allergic asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2013 Dec; 10(165-169): p. 10:S165-169.
53. Kiecolt-Glaser J, Preacher K, MacCallum R, Atkinson C, Malarkey W, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Jul; 100(15)(9090-9095): p. 100: 9090-9095.
54. Kiecolt-Glaser J, Heffner K, Glaser R, Malarkey W, Porter K, Atkinson C, et al. How stress and anxiety can alter immediate and late phase skin test responses in allergic rhinitis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Jun; 34(5)(670-680): p. 34(5): 670-680.
55. De Marco R, Pesce G, Girardi P, Marchetti P, Rava M, Ricci P, et al. Foetal exposure to maternal stressful events increases the risk of having asthma and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 Dec; 23(8)(724-729): p. 23(8): 724-729.
56. Khashan A, Wicks S, Dalman C, Henriksen T, Li J, Mortensen P, et al. Prenatal stress and risk of asthma hospitalization in the offspring: a Swedish population-based study. *Psychosom Med*. 2012 Jul-Aug; 74(6)(635-641): p. 74(6): 635-641.
57. Henderson A, Warner J. Fetal origins of asthma. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012 Apr; 17(2)(82-91): p. 17(2): 82-91.
58. Peláez A, Dávila I. *Tratado de Alergología 2007* Madrid: ERGON; 2007.

59. Seaton A, Godden D, Brown K. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax*. 1994 Feb; 49(2)(171-174): p. 49(2): 171-174.
60. Tokuyama H, Tokuyama Y, Nakanishi K. Retinoids inhibit IL-4-dependent IgE and IgG1 production by LPS-stimulated murine splenic B cells. *Cell Immunol*. 1995 Apr; 162(1)(153-158): p. 162(1): 153-158.
61. Litonjua A. Vitamin D and corticosteroids in asthma: synergy, interaction and potential therapeutic effects. *Expert Rev Respir Med*. 2013 Apr; 7(2)(101-104): p. 7(2): 101-104.
62. Mai X, Chen Y, Camargo CJ, Langhammer A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and self-reported allergic rhinitis in Norwegian adults - The HUNT Study. *Allergy*. 2014 Apr; 69(4)(488-493): p. 69(4): 488-493.
63. Jung J, Kim J, Cho S, Choi B, Min K, Kang H. Allergic rhinitis and serum 25-hydroxyvitamin D level in Korean adults. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Nov; 111(5)(352-357): p. 111(5): 352-357.
64. Tamay Z, Akcay A, Ergin A, Güler N. Dietary habits and prevalence of allergic rhinitis in 6 to 7-year-old schoolchildren in Turkey. *Allergol Int*. 2013 Dec; 63(4)(553-562): p. 63(4): 553-562.
65. Bunyavanich S, Rifas-Shiman S, Platts-Mills T, Workman L, Sordillo J, Camargo CJ, et al. Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May; 133(5)(1373-1382): p. 133(5): 1373-1382.

66. Saadeh D, Salameh P, Baldi I, Raheison C. Diet and allergic diseases among population aged 0 to 18 years: myth or reality? *Nutrients*. 2013 Aug; 5(9)(3399-3423): p. 5(9): 3399-3423.
67. Shi Z, Dal Grande E, Taylor A, Gill T, Adams R, Wittert G. Association between soft drink consumption and asthma and chronic obstructive pulmonary disease among adults in Australia. *Respirology*. 2012 Feb; 17(2)(363-369): p. 17(2): 363-369.
68. Maslova E1 HTSMOS. Low-fat yoghurt intake in pregnancy associated with increased child asthma and allergic rhinitis risk: a prospective cohort study. *J Nutr Sci*. 2012 Jul; 1: p. 6;1.
69. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica G, Durham S, Malling H, Valovirta E, et al. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*. 2006. 2006; 61(82)(1-20): p. 61(82): 1-20.
70. Canonica G, Ansotegui I, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, Baena-Cagnani C, et al. A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013 Oct; 6(1)(17): p. 6(1): 17.
71. Miguères M, Dávila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lhéritier-Barrand M, et al. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clin Transl Allergy*. 2014 May; 4(16): p. 4:16.
72. Guerra S, Allegra L, Blasi F, Cottini M. Age at symptom onset and distribution by sex and symptoms in patients sensitized to different allergens. *Allergy*. 1998 Sep; 53(863-869).

73. Bousquet P, Castelli C, Daures J, Heinrich J, Hooper R, Sunyer J, et al. Assessment of allergen sensitization in a general population-based survey (European Community Respiratory Health Survey I). *Ann Epidemiol.* 2010 Nov; 20(11)(797-803): p. 20(11): 797-803.
74. Arbes SJ, Gergen P, Elliott L, Zeldin D. Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Aug; 116(2)(377-383): p. 116(2): 377-383.
75. Barbee R, Halonen M, Lebowitz M, Burrows B. Distribution of IgE in a community population sample: correlations with age, sex and allergen skin test reactivity. *J Allergy Clin.* 1981 Aug; 68(2)(106-111).
76. Calabria C, Dice J, LL H. Prevalence of positive skin test responses to 53 allergens in patients with rhinitis symptoms. *Allergy Asthma Proc.* 2007 Jul-Aug; 28(4)(442-448).
77. Craig T, King T, Lemanske RJ, Wechsler M, Icitovic N, Zimmerman RJ, et al. Aeroallergen sensitization correlates with PC(20) and exhaled nitric oxide in subjects with mild-to-moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Mar; 121(3)(671-677): p. 121(3): 671-677.
78. Calderón M, Cox L, Casale T, Moingeon P, Demoly P. Multiple-allergen and single-allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: looking at the published evidence. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Apr; 129(4)(929-934).
79. Valero A, Pereira C, Loureiro C, Martínez-Cócera C, Murio C, Rico P, et al. Interrelationship between skin sensitization, rhinitis, and asthma in patients with

- allergic rhinitis: a study of Spain and Portugal. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(3)(167-172).
80. de Jong A, Dikkeschei L, Brand P. Sensitization patterns to food and inhalant allergens in childhood: a comparison of non-sensitized, monosensitized, and polysensitized children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Mar; 22(2)(166-171): p. 22(2): 166-71.
 81. Cirillo I, Vizzaccaro A, Klersy C, Baiardini I, Marseglia G, Canonica G, et al. Quality of life and polysensitization in young men with intermittent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005 Jun; 94(6)(640-643).
 82. Andiappan A, Wang dY, Anantharaman R, Suri B, Lee B, Rotzschke O, et al. Replication of genome-wide association study loci for allergic rhinitis and house dust mite sensitization in an Asian population of ethnic Chinese in Singapore. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May; 131(5)(1431-1433).
 83. Hong X, Hao K, Ladd-Acosta C, Hansen K, Tsai H, Liu X, et al. Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children. *Nat Commun*. 2015 Feb; 24(6)(6304).
 84. Šaulienė I, Greičiuviene J, Šukienė L, Juškevičiūtė N, Benner C, Zinkevičienė A, et al. Genetic Loci Associated with Allergic Sensitization in Lithuanians. *PLoS One*. 2015 Jul; 10(7)(e0134188).
 85. Drinkwater H. An Address on Recent Theories and Experiments on Heredity and Inheritance: Delivered before the Denbigh and Flint Division of the British Medical Association. *Br Med J*. 1908; 2(2499)(1538-1541): p. 1, 88.

86. Rackemann F. Studies in asthma II An analysis of two hundred and thirteen cases in which the patients were relieved for more than two years. *Archives of internal Medicine*. 1928;; p. 41, 346-369.
87. Los H, Postmus P, Boomsma D. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res*. 2001 Apr; 4(2)(81-93): p. 4(2): 81-93.
88. Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clin Mol Allergy*. 2009 May; 7: p. 7:7.
89. Miller R, Ho S. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Mar; 177(6)(567-573): p. 177(6): 567-573.
90. Feijen M, Gerritsen J, Postma D. Genetics of allergic disease. *Br Med Bull*. 2000; 56(4)(894-907): p. 56(4): 894-907.
91. Dávila I MJ, Ferrer M, Bartra J, del Cuvillo A, Montoro J, Jáuregui I, et al. Genetic aspects of allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(1)(25-31): p. 19 (1):25-31.
92. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar; 8(3)(169-182): p. 8(3): 169-182.
93. Risch NaKM. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Sep; 273(5281)(1516-1517): p. 273(5281): 1516-1517.
94. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006 Mar; 7(2)(95-100): p. 7(2): 95-100.

95. Hall I, Blakey J. Genetic association studies in Thorax. *Thorax*. 2005 May; 60(5)(357-359): p. 60(5): 357-359.
96. Nicolae D, Ober C. (Too) great expectations: the challenges in replicating asthma disease genes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jun; 179(12)(1078-1079): p. 179(12): 1078-1079.
97. Himes B, Jiang X, Wagner P, Hu R, Wang Q, Klanderman B, et al. RNA-Seq transcriptome profiling identifies CRISPLD2 as a glucocorticoid responsive gene that modulates cytokine function in airway smooth muscle cells. *PLoS One*. 2014 Jun; 9(6)(e99625).
98. Chanock S, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter D, Thomas G, et al. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature*. 2007 Jun; 447(7145)(655-660): p. 447(7145): 655-660.
99. Wills-Karp M, Ewart S. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet*. 2004 May; 5(5)(376-387): p. 5, 376-387.
100. March M, Sleiman P, Hakonarson H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *Int J Gen Med*. 2013 Apr; 6(253-265): p. 6: 253–265.
101. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jan; 135(1)(15-24): p. 135(1): 15-24.
102. Bégin P, Nadeau K. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2014 May; 10(1)(27): p. 10(1): 27.
103. Wang J, Song Y, Wang Z. Non-coding RNAs in gastric cancer. *Gene*. 2015 Apr; 560(1)(1-8): p. pii: S0378-1119(15)00137-7.

104. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Nov; 128(5)(1077-1085): p. 128: 160-167.
105. Pettipher R, Hansel T, Armer R. Antagonism of the prostaglandin D₂ receptors DP1 and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Apr; 6(4)(313-325): p. 6(4): 313-325.
106. Oguma T, Asano K, Ishizaka A. Role of prostaglandin D₂ and its receptors in the pathophysiology of asthma. *Allergol Int*. 2008 Dec; 57(4)(307-312): p. 57(4): 307-312.
107. Kabashima K, Narumiya S. The DP receptor, allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Aug-Sep; 69(2-3)(187-194): p. 69(2-3): 187-194.
108. Tilley S, Coffman T, Koller B. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001 Jul; 108(1)(15-23): p. 108(1): 15-23.
109. Arima M, Fukuda T. Prostaglandin D₂ and T(H)₂ inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med*. 2011 Mar; 26(1)(8-18): p. 26(1): 8-18.
110. Ajuebor M, Singh A, Wallace J. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D₂ is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Jul; 279(1)(238-244): p. 279: 238-244.
111. Angeli V, Staumont D, Charbonnier A, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, et al. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol*. 2004 Mar; 172(6)(3822-3829): p. 171: 3936-3940.

112. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, et al. Antiinflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Mar; 110(13)(5205-5210): p. 105: 20009-20014.
113. Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell W. Prostaglandin D₂ is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood*. 2001 Sep; 98(6)(1942-1948): p. 98: 1942-1948.
114. Hammad H, de Heer H, Soullie T, Hoogsteden H, Trottein F, Lambrecht B. Prostaglandin D₂ inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol*. 2003 Oct; 171(8)(3936-3940): p. 171: 3936-3940.
115. Aritake K, Kado Y, Inoue T, Miyano M, Urade Y. Structural and functional characterization of HQL-79, an orally selective inhibitor of human hematopoietic prostaglandin D synthase. *J Biol Chem*. 2006 Jun; 281(22)(15277-15286): p. 281: 15277-15286.
116. Almishri W, Cossette C, Rokach J, Martin J, Hamid Q, Powell W. Effects of Prostaglandin D₂, 15-deoxy-Delta¹², 14-prostaglandin J₂, and selective DP₁ and DP₂ receptor agonists on pulmonary infiltration of eosinophils in Brown Norway rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Apr; 313(1)(64-69): p. 313: 64-69.
117. Spik I, Brénuçon C, Angéli V, Staumont D, Fleury S, Capron M, et al. Activation of the prostaglandin D₂ receptor DP₂/CRTH₂ increases allergic inflammation in mouse. *J Immunol*. 2005 Mar; 174(6)(3703-3708): p. 174: 3703-3708.

118. Sarashina H, Tsubosaka Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa T, Hori M, et al. Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J Immunol*. 2014 Jan; 192(1)(459-465): p. 192(1): 459-465.
119. García-Solaesa V, Sanz-Lozano C, Padrón-Morales J, Hernández-Hernández L, García-Sánchez A, Rivera-Reigada M, et al. The prostaglandin D2 receptor (PTGDR) gene in asthma and allergic diseases. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014 Jan-Feb; 42(1)(64-68): p. 42(1): 64-68.
120. Boie Y, Sawyer N, Slipetz D, Metters K, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem*. 1995 Aug; 270(32)(18910-18916): p. 270(32): 18910-18916.
121. Bos C, Richel D, Ritsema T, Peppelenbosch M, Versteeg H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jul; 36(7)(1187-1205): p. 36(7): 1187-1205.
122. Suzuki F, Hayashi H, Hayaishi O. Transport of prostaglandin D2 into brain. *Brain Res*. 1986 Oct; 385(2)(321-328): p. 385(2): 321-328.
123. Chen Y, Perussia B, Campbell K. Prostaglandin D2 suppresses human NK cell function via signaling through D prostanoid receptor. *J Immunol*. 2007 Sep; 179(5)(2766-2773): p. 179(5): 2766-2773.
124. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*. 2000 Mar; 287(5460)(2013-2017): p. 287(5460): 2013-2017.

125. Murray J, Tonnel A, Brash A, Roberts L2, Gosset P, Workman R, et al. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med.* 1986 Sep; 315(13)(800-804): p. 315(13): 800-804.
126. Liu M, Bleecker E, Lichtenstein L, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore T, et al. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Jul; 142(1)(126-132): p. 142(1): 126-132.
127. Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, Uodome N, Okazaki-Hatake K, Urade Y. Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol.* 2002 Jan; 168(1)(443-449): p. 168(1): 443-449.
128. Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, et al. Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Aug; 298(2)(411-419): p. 298(2): 411-419.
129. Heavey D, Lumley P, Barrow S, Murphy M, Humphrey P, Dollery C. Effects of intravenous infusions of prostaglandin D2 in man. *Prostaglandins.* 1984 Dec; 28(6)(755-767).
130. Hakonarson H, Bjornsdottir U, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, et al. A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *Am J Hum Genet.* 2002 Sep; 71(3)(483-491): p. 71(3): 483-491.
131. Mansur A, Bishop D, Holgate S, Markham A, Morrison J. Linkage/association study of a locus modulating total serum IgE on chromosome 14q13-24 in families with asthma. *Thorax.* 2004 Oct; 59(10)(876-882): p. 59(10): 876-882.

132. Mansur A, Bishop D, Markham A, Morton N, Holgate S, Morrison J. Suggestive evidence for genetic linkage between IgE phenotypes and chromosome 14q markers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jun; 159(6)(1796-1802): p. 159(6): 1796-1802.
133. Jamrozik E, Warrington N, McClenaghan J, Hui J, Musk A, James A, et al. Functional haplotypes in the PTGDR gene fail to associate with asthma in two Australian populations. *Respirology*. 2011 Feb; 16(2)(359-366): p. 16(2): 359-366.
134. Tsai Y, Choudhry S, Kho J, Beckman K, Tsai H, Navarro D, et al. The PTGDR gene is not associated with asthma in 3 ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Dec; 118(6)(1242-1248): p. 118(6): 1242-1248.
135. Li J, Liu Q, Wang P. Lack of association between three promoter polymorphisms of PTGDR gene and asthma in Chinese Han population. *Int J Immunogenet*. 2007 Oct; 34(5)(353-357): p. 34: 353-357.
136. Sanz C, Isidoro-García M, Dávila I, Moreno E, Laffond E, Avila C, et al. Promoter genetic variants of prostanoid DP receptor (PTGDR) gene in patients with asthma. *Allergy*. 2006 May; 61(5)(543-548): p. 61(5): 543-548.
137. Oguma T, Palmer L, Birben E, Sonna L, Asano K, Lilly C. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med*. 2004 Oct; 351(17)(1752-1763): p. 351(17): 1752-1763.
138. Li C, Shi L, Yan Y, Gordon B, Gordon W, Wang D. Gene expression signatures: a new approach to understanding the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013 Apr; 13(2)(209-217): p. 13(2): 209-217.

139. Sanz C, Isidoro-García M, Dávila I, de Pedro M, Méndez Sde A, Padrón J, et al. A new PTGDR promoter polymorphism in a population of children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009 Mar; 20(2)(151-156): p. 20(2): 151-156.
140. Isidoro-García M, Sanz C, García-Solaesa V, Pascual M, Pescador D, Lorente F, et al. PTGDR gene in asthma: a functional, genetic, and epigenetic study. *Allergy*. 2011 Dec; 66(12)(1553-1562): p. 66(12): 1553-1562.
141. Ávila-Baray H. *Introducción a la metodología de la investigación*: Juan Carlos Martínez Coll; 2006.
142. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov; 152(5)(77-121): p. 152 (5:2): 77-121.
143. Crapo R, Casaburi R, Coates A, Enright P, Hankinson J, Irvin C, et al. 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 Jan; 161(1)(309-329): p. 161(1): 309-329.
144. Brozek J, Bousquet J, Baena-Cagnani C, Bonini S, Canonica G, Casale T, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Sep; 126(3)(466-476).
145. Clinical SCoSTotEAoAa. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. *Allergy*. 1989; 44(10)(1-59).
146. Thermo Scientific. [Online]. [cited 2014 Octubre 25. Available from: www.phadia.com].

147. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 April; 55(4)(611-622): p. 55(4): 611-622.
148. Bustin S, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004 Sep; 15, 3(155-166).
149. Wong M, Medrano J. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul; 39(1)(75-85).
150. Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart C. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006 Feb; 7(85).
151. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4)(402-408): p. 25: 402-408.
152. Livak K, Schmittgen T. Guide to Performing Relative Quantification of Gene Expression Using Real-Time Quatitative PCR. 2004..
153. Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro A, Monclús L, Martí-Guadaño E, et al. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug; 120(2)(359-365).
154. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013;; p. 54(4): 391-406.

155. Magnan A, Fourre-Julian C, Jullian H, Badier M, Lanteaume A, Vervloet D, et al. Rhinitis alone or rhinitis plus asthma: what makes the difference? *Eur Respir J*. 1998 Nov; 12(5)(1073-1078).
156. Bousquet J, Vignola A, Demoly P. Links between rhinitis and asthma. *Allergy*. 2003 Aug; 58(8)(691-706): p. 58:691-706.
157. Morjaria J, Caruso M, Rosalia E, Russo C, Polosa R. Preventign Progression of Allergic Rhinitis to Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Feb; 14(2)(412): p. 14:412.
158. Antonicelli L, Braschi M, Bresciani M, Bonifazi M, Baldacci S, Angino A, et al. The complex link between severity of asthma and rhinitis in mite allergic patients. *Respir Med*. 2013 Jan; 107(1)(23-29).
159. Navarro A, Valero A, Juliá B, Quirce S. Coexistence of asthma and allergic rhinitis in adult patients attending allergy clinics: ONEAIR study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008; 18(4)(233-238).
160. Bousquet J, Annesi-Maesano I, Carat F, Léger D, Rugina M, Pribil C, et al. Characteristics of intermittent and persistent allergic rhinitis: DREAMS study group. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jun; 35(6)(728-732).
161. Ohta K, Bousquet P, Aizawa H, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, et al. Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross-sectional nation-wide study in Japan. *Allergy*. 2011 Oct; 66(10)(1287:1295).
162. Catani A. *Pediatric allergy, asthma and immunology* Berlin: Springer; 2008.
163. Lopes A, Azenha P, Teodosio C, Inacio M, Silva I, Loureiro G, et al. Impact of allergic rinitis and specific subcutaneous immunotherapy on peripheral blood

- basophils of patients sensitized to *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2013 Oct; 9(1)(40).
164. Li C, Peng J, Ren L, Gan L, Lu X, Liu Q, et al. Roles of histone hypoacetylation in LAT expression on T cells and Th2 polarization in allergic asthma. *J Transl Med*. 2013 Jan; 11(26).
165. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 April; 55(4)(611-622).
166. González-Buitrago J, Ferreira L, Muñiz C. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med Clin*. 2008 Oct; 131(11)(426-434).
167. Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, et al. Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med*. 2005 Feb; 201(4)(627-636).
168. Pettipher R. The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar; 153(1)(191-199).
169. Gosset P, Pichavant M, Faveeuw C, Bureau F, Tonnel A, Trottein F. Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur J Immunol*. 2005 May; 35(5)(1491-500).
170. Sonesson A, Bartosik J, Christiansen J, Roscher I, Nilsson F, Schmidtchen A, et al. Sensitization to Skin-associated Microorganisms in Adult Patients with Atopic Dermatitis is of Importance for Disease Severity. *Acta Derm Venereol*. 2013 May; 93(3)(340-345).

171. Wu L, Merrilees M, Young R, Black P. The cyclooxygenase-2-765C promoter polymorphism protects against the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2011 Mar; 105(3)(506-510).
172. Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, et al. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet.* 2004 Dec; 13(24)(3203-3217).
173. Zhu G, Vestbo J, Lenney W, Silverman M, Whyte M, Helms P, et al. Association of PTGDR gene polymorphisms with asthma in two Caucasian populations. *Genes Immun.* 2007 Jul; 8(5)(398-403).
174. Leung T, Li C, Kong A, Chan I, Ng M, Chan M, et al. PTGDR is not a major candidate gene for asthma and atopy in Chinese children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;: p. 20(6): 556-562.
175. Cornejo-García J, Jagemann L, Blanca-López N, Doña I, Flores C, Guéant-Rodríguez R, et al. Genetic variants of the arachidonic acid pathway in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced acute urticaria. *Clin Exp Allergy.* 2012 Dec; 42(12)(1772-1781).
176. Falkenberg V, Gurbaxani B, Unger E, Rajeevan M. Functional genomics of serotonin receptor 2A (HTR2A): interaction of polymorphism, methylation, expression and disease association. *Neuromolecular Med.* 2011 Mar; 13(1)(66-76).

ÍNDICE DE TABLAS

9.~ ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Datos de prevalencia de las enfermedades alérgicas y de la atopía.	7
Tabla 2.- Clasificación de los contaminantes aéreos (58).	22
Tabla 3.- Genes relacionados con la susceptibilidad al asma identificados mediante clonaje posicional (100).....	30
Tabla 4.-Genes identificados a partir de los estudios de asociación de metilación del ADN para el asma, la atopía y las exposiciones ambientales relacionadas (102).....	33
Tabla 5.- Se indican los rs de los polimorfismos de este estudio en la base de datos del SNP del NCBI	57
Tabla 6.- Cebadores utilizados para genotipar <i>PTGDR</i>	60
Tabla 7.- Programa de Amplificación de <i>PTGDR</i>	61
Tabla 8.- Se muestran los cebadores utilizados para secuenciar los polimorfismos en estudio.....	63
Tabla 9.- Relación de los ítems que hay que controlar en publicaciones de qPCR. Los ítems con asterisco forman parte del grupo de ítems no esenciales, pero recomendables.	66
Tabla 10.- Relación de los ítems que hay que controlar en publicaciones de qPCR. Los ítems con asterisco forman parte del grupo de ítems no esenciales, pero recomendables.	67
Tabla 11.- Cebadores de los genes <i>GAPDH</i> y <i>TBP</i> utilizados para el análisis de expresión mediante PCR a tiempo real.	71
Tabla 12.- Relación de genes constitutivos estudiados en el Panel <i>The Real Time ready Human Reference Gene</i> (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).....	72
Tabla 13.- Programa de amplificación para la qPCR del panel <i>The Real Time ready Human Reference Gene</i> (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).....	73
Tabla 14.- Cebadores de <i>PTGDR</i> utilizados para la qPCR	78

Tabla 15.- Programa de amplificación empleado para el análisis de expresión génica de <i>PTGDR</i> mediante PCR a tiempo real con <i>SYBR Green I</i> (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).....	79
Tabla 16.- Características de la población en estudio	84
Tabla 17.- Niveles de IgE de los individuos incluidos en el estudio.....	86
Tabla 18.- Valores Ct de los Genes constitutivos analizados.....	93
Tabla 19.- Niveles de expresión de <i>PTGDR</i> y sensibilización respecto a los controles	94
Tabla 20.- Valores de IgE y niveles de expresión de <i>PTGDR</i> según el número de grupos de aeroalérgenos a los que los pacientes estaban sensibilizados.	97
Tabla 21.- Resumen de los niveles de expresión de <i>PTGDR</i> con respecto a la variable clínica asma.	99
Tabla 22.- Tabla resumen de niveles de expresión de <i>PTGDR</i> con respecto a la variable clínica rinitis.	100
Tabla 23.- Frecuencias alélicas y genotípicas de los distintos SNP	101
Tabla 24.- Resultados de asociación génica para las variables alergia, asma y rinitis .	105

ÍNDICE DE FIGURAS

10.~ ÍNDICE DE FIGVRAS

Figura 1.- Datos de prevalencia del asma a nivel mundial (17).	5
Figura 2.- Datos de muertes al año por cada 100.000 habitantes (17).	6
Figura 3.- Tendencia en la prevalencia de asma y rinitis en un estudio Finlandés, 1966-2003 (28).	9
Figura 4.- Relación entre asma y rinitis en un estudio realizado en población danesa (30).	9
Figura 5.- Posible mecanismo de interferencia del tabaco en la acción de los corticosteroides (37).	13
Figura 6.- Representación esquemática del papel sugerido para la adiponectina y leptina en la inducción del asma por alérgenos en un modelo múdo. Modificada (42).	14
Figura 7.- Representación esquemática de algunos de los efectos de los estrógenos en células inmunes y moléculas con potencial interés en el asma (45).	15
Figura 8.- Esquema resumido donde la exposición a infecciones podría estar relacionada con la respuesta del sistema inmune y el desarrollo de las enfermedades alérgicas (49).	17
Figura 9.- La exposición microbiana directa a través de la inhalación y la microaspiración o la exposición a los metabolitos de la fermentación bacteriana mediada de componentes de la dieta podrían ser factores que influyen en el desarrollo de la alergia y el asma (52).	18
Figura 10.- Las citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) están relacionadas con el mantenimiento del embarazo y los linfocitos T reguladores fetales que segregan citoquinas (IL-10 y TGF- β) dirigidas a disminuir la respuesta Th1 de la madre (48).	20
Figura 11.- Relación de genes replicados en el asma y la atopia. Modificado de (94). .	31
Figura 12.- Ruta del ácido araquidónico hasta la producción de PGD ₂	35
Figura 13.- Transmisión de señales al interior celular inducida por PTGDR (121).	38
Figura 14.- Variables recogidas en el cuestionario.	48

Figura 15.- Cebador y segundo paso del ensayo para determinar IgE total (146).	54
Figura 16.- Tercer y cuarto paso del ensayo para determinar IgE total (146).....	55
Figura 17.- Primer y segundo paso del ensayo para determinar IgE específica (146). ...	56
Figura 18.-Tercer y cuarto paso del ensayo para determinar IgE específica (146).....	56
Figura 19.- Fundamento del procedimiento llevado a cabo por el <i>MagNA Pure Compact</i> (Roche) tomado del <i>MagNA Pure Compact Operator's Manual</i>	59
Figura 20.- Principio de purificación del sistema ExoSAP-IT.....	62
Figura 21.- Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de ADNc total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.	70
Figura 22.- Procedimiento para lisar las células y purificar el ARN.....	75
Figura 23.- Purificación final del ARN y elución	75
Figura 24.- Resumen del procedimiento seguido para la obtención de la población de ADNc total a partir de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.	77
Figura 25.- Distribución de los sujetos participantes en el estudio por edades y sexo... 84	
Figura 26.- Distribución por edades del grupo control y del grupo de pacientes con alergia.	85
Figura 27.- Distribución de los pacientes basada en el diagnóstico.	87
Figura 28.- Distribución de los pacientes según la gravedad del asma.	87
Figura 29.- Distribución de los pacientes basada en la gravedad de la rinitis. Basada en la modificación de la ARIA por Valero (153).....	88
Figura 30.- Distribución de los pacientes basada en la sensibilización.	89
Figura 31.- Antecedentes familiares de asma, rinitis y atopia en pacientes diagnosticados de asma y rinitis alérgica.	90
Figura 32.- Diagrama de cajas (<i>box-plot</i>) donde se observan medias y desviaciones estándar de los Ct de los genes constitutivos.....	91

Figura 33.- Diagrama de cajas (<i>box-plot</i>) donde se observan la media de las desviaciones estándar de los Ct.....	92
Figura 34.- Representación de los niveles de <i>PTGDR</i> y niveles de IgE total.	97
Figura 35.- Representación de la curva ROC para los niveles de expresión de <i>PTGDR</i> y el diagnóstico de alergia.	108

ABREVIATURAS

11.~ ABREVIATURAS

A: adenina

AC: adenilato ciclasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: ácido desoxirribonucleasa

ADN_c: ADN complementario

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARIA: *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ácido ribonucleasa

ARN_{nc}: ARN no codificantes

ARN_{si}: pequeños ARN de interferencia

ARN_{ti}: ARN de inicio de la transcripción

ATP: adenosín trifosfato

AVAD: años de vida ajustados por discapacidad

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C: citosina

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

COX: ciclooxigenasa

CRTH2: *Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2*
(molécula homóloga de receptor quimiotáctico expresada en células Th2)

Ct: *Cycle Threshold* (Ciclo Umbral)

CV: Coeficiente de Variación

DEP: partículas de combustión de los motores diésel

ds: desviación estándar

dNTP: dinucleótidos trifosfato

EAACI: *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*

ECRHS: *European Community Respiratory Health Survey*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEUU: Estados Unidos de América

FEV₁ : volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada

FPRP: *False Positive Report Probability* (cálculo de probabilidad de obtener un falso positivo)

FVC: *Forced Vital Capacity* (capacidad vital forzada)

G: guanina

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GEMA: Guía Española para el Manejo del Asma

GINA: The Global Initiative for Asthma

GWAS: *Genome-wide association study*

HDAC: histona deacetilasa

HCl: ácido clorhídrico

H-PGDS: Hematopoietic Prostaglandin D Synthase (Sintetasa hematopoyetica de prostaglandina D).

IFN: interferón

IgE: inmunoglobulina E

IL: interleucina

IMC: índice de masa corporal

KCl: cloruro de potasio

kDa: kilodalton

kU : kilounidades

L: litro

L-PGDS: lipocalin Prostaglandin D Synthase (Sintetasa lipocalina de prostaglandina D)

LPS: lipopolisacárido

M: Molar

m: metro

mg: miligramo

Mg²⁺: ión magnesio

min: minuto

MIQE: *minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*

MgCl₂: Cloruro magnésico

miARN: micro ARN

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NGS: *Next Generation Sequencing*

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

NK: *Natural killer*

Nm: nanometro

NO_x: óxido nitroso/nítrico

NTC: *No template Control* (Control sin muestra)

O₂: oxígeno

O₃: ozono

OVA: ovoalbúmina

Pb: pares de bases

PC₂₀: concentración de metacolina requerida para provocar una caída del FEV1 del 20%

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PE: poder estadístico

PGD₂: prostaglandina D2

PGDS: sintasa de la prostaglandina D2

PGE₂: prostaglandina E2

PGF₂: prostaglandina F2

PGG₂: prostaglandina G₂

PGH₂: prostaglandina H₂

PGI₂: prostaglandina I₂

PGJ₂: prostaglandina J₂

PGHS1: prostaglandina H sintasa 1

PGHS2: prostaglandina H sintasa 2

pH: pondus Hydrogenium

PKA: *Protein kinase A* (Proteína cinasa A)

PKC: *Protein kinase C* (Proteína cinasa C)

Piwi-ARNs: ARN asociados a proteínas Piwi

PTGDR (DP): *Prostaglandin D2 receptor* (Receptor de prostaglandina D₂)

PTGDS: *Prostaglandin D2 Synthase* (sintasa de prostaglandina D₂)

qPCR: *quantitative PCR* (PCR cuantitativa)

RI: rango intercuartílico

RIN: *RNA Integrity Number*

Rs: *SNP ID number* or refSNP cluster

RT: retotranscripción

Sg: segundos

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleótido único)

SO₂: dióxido de azufre

T: timina

TBE: Tris-Borato-EDTA

TBP: proteína de unión a caja TATA

TGF- β : *Transforming growth factor* beta (Factor $\square\square$ Transformante del Crecimiento)

Th: *T helper* (T colaborador)

TNF: *Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral)

TXA₂: tromboxano A₂

U: unidades enzimáticas

UV: ultravioleta

V: voltio

VRS: virus respiratorio sincitial

WAO: *World Allergy Organization* (Organización Mundial de la alergia)