

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL
DIAGNÓSTICO



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LOS
GENES *PTGDR*, *LTC4S* Y *CYSLTR1* EN
PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA POR
HIPERSENSIBILIDAD A POLENES**

Memoria presentada por Doña Beatriz Fernández Parra
para optar al Título de Doctor

2015

El Prof. Dr. D. Ignacio Jesús Dávila González, la Prof^a. Dra. Doña Catalina Sanz Lorenzo y el Prof. Dr. D. Félix Lorente Toledano.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES; *PTGDR, LTC4S Y CYSLTR1* EN PACIENTES CON RINITIS ALERGICA POR HIPERSENSIBILIDAD A POLENES**”, que presenta la licenciada en Medicina Doña Beatriz Fernández Parra, 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 2 de Diciembre de 2015.

Fdo.: Prof. Dr. Ignacio Jesús Dávila González

Fdo.: Prof^a Dra. Catalina Sanz Lozano

Fdo.: Prof. Dr. Félix Lorente Toledano

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ignacio Jesús Dávila González, director de esta tesis, por orientar la parte clínica de esta tesis, por su dedicación y su disponibilidad a pesar de su gran carga de trabajo.

A la Dra. Catalina Sanz Lozano, codirectora de esta tesis, por su disponibilidad y su gran ayuda.

Al Dr. Félix Lorente Toledano, codirector de esta tesis, por su disponibilidad y ayuda.

A la Dra. María Isidoro García, por el asesoramiento y correcciones.

A Choni por su acogida en el Laboratorio de Inmunoalergia y por su ayuda y su gran disponibilidad.

Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda de la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

También quiero agradecer a los pacientes por participar en el estudio y por ser el objeto del mismo.

A Montse, por sus acertados consejos y su gran apoyo incondicional, sobre todo en los momentos difíciles

A Tomas por su cariño, por animarme en los días malos y alegrarse conmigo en los buenos.

A David, una nueva ilusión en mi vida que me da mucha alegría y energía en los momentos difíciles.

A mi amigo Santi, mi profesor en la residencia de alergología, la persona más buena y luchadora que conozco, que me enseñó el camino para descubrir y tratar lo mejor posible a los pacientes alérgicos, un ejemplo de lucha y aprecio a la vida.

A mi amiga Ángeles, por sus ánimos, sus acertados consejos y apoyo en el día a día.

Para finalizar a mi padre que esté donde esté se sentirá muy orgulloso al igual que yo de él, por quererme y creer en mí; por su sacrificio y por dárme todo para llegar hasta aquí.

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles,

no puede ni podrá nunca explicarlo todo.

Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable.

Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven,

tendrán siempre un infinito mundo de misterio”

Gregorio Marañón

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. RECUERDO HISTORICO.....	15
1.2. DEFINICIÓN.....	17
1.3. EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.3.1. FACTORES DE RIESGO.....	21
1.3.1.1. GENÉTICA Y ANTECEDENTES FAMILIARES.....	22
1.3.1.2. FACTORES DE RIESGO EN LAS ETAPAS PRECOCES DE LA VIDA.....	22
1.3.1.3. GRUPOS ÉTNICOS.....	24
1.3.1.4. EXPOSICIÓN A ALÉRGENOS.....	25
1.3.1.5. DIFERENCIAS ENTRE POBLACIONES RURALES Y URBANAS Y MODIFICACIÓN DEL ESTILO DE VIDA.....	25
1.3.1.6. CONTAMINACIÓN DOMÉSTICA Y ATMOSFÉRICA.....	27
1.3.1.7. FUMADORES ACTIVOS.....	30
1.3.1.8. CLASE SOCIAL Y OCUPACIÓN.....	30
1.3.1.9. EL CAMBIO CLIMÁTICO REPERCUTE EN LOS ALÉRGENOS...	31
1.3.2. PREVALENCIA.....	32
1.3.2.1. MUNDIAL.....	33
1.3.2.2. NACIONAL.....	34
1.3.2.3. AUTONOMICO: CASTILLA Y LEON.....	36
1.4. ETIOPATOGENIA.....	37
1.4.1. INFLAMACIÓN ALÉRGICA.....	37
1.4.2. MECANISMOS DEPENDIENTES DE IgE.....	38
1.4.3. MECANISMOS INDEPENDIENTES DE IgE.....	39

1.4.4. INFLAMACIÓN DE LA MUCOSA NASAL EN LA RA.....	40
1.5. ASPECTOS GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS....	42
1.6. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA RINITIS ALÉRGICA.....	53
1.6.1. POLIMORFISMOS.....	55
1.6.2. ESTUDIOS EN GENOMA COMPLETO EN LA RINITIS ALÉRGICA....	56
1.6.3. ESTUDIOS DE POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO EN LA RINITIS ALÉRGICA.....	58
1.6.3.1. POLIMORFISMOS EN GENES DE QUIMIOCINAS Y DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.....	59
1.6.3.2. POLIMORFISMOS EN GENES DE INTERLEUCINAS Y DE RECEPTORES DE INTERLEUCINAS.....	60
1.6.3.3. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA Y DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO.....	63
1.6.3.4. POLIMORFISMOS EN GENES DE LOS EOSINÓFILOS.....	63
1.6.3.5. POLIMORFISMOS EN OTROS GENES.....	64
1.6.4. POLIMORFISMOS QUE SE VAN A EVALUAR EN EL PRESENTE ESTUDIO.....	66
1.6.4.1. POLIMORFISMOS DE LOS GENES DE LA VÍA DE LOS LEUCOTRIENOS.....	66
1.6.4.2. REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL RECEPTOR DE PROSTANOIDES (PTGDR).....	68
2. HIPOTESIS.....	72
3. OBJETIVOS.....	74
4. MATERIAL Y METODOS.....	76
4.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES	76
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	76

POBLACIÓN ESTUDIADA.....	76
VARIABLES.....	77
4.2. OBTENCIÓN DE DATOS FILIACIÓN Y CLÍNICOS.....	78
4.3. ESTUDIO MOLECULAR.....	81
4.3.1. ANÁLISIS MOLECULAR.....	82
4.3.1.1. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	82
4.3.1.2. AMPLIFICACIÓN.....	84
4.3.1.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	86
GEN <i>PTGDR</i>	87
GEN <i>LTC4S</i>	89
GEN <i>CYSLTR1</i>	90
4.3.1.4. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	91
4.3.1.5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN.....	93
4.3.1.6. ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.....	93
CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO.....	95
4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN GÉNICA.....	97
4.4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	97
4.4.2. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.....	97
4.4.3. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.....	98
4.4.4. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	98.
5. RESULTADOS.....	100
5.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO.....	100
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL.....	100
5.1.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES CON RINITIS ALERGICA.....	101
ANTECEDENTES FAMILIARES.....	101
ANTECEDENTES PERSONALES DERMATITIS ATÓPICA.....	102

GRAVEDAD DE LA RINITIS ALÉRGICA.....	102
PRUEBAS CUTÁNEAS.....	102
ANÁLISIS DE LAS SENSIBILIZACIONES.....	103
IGE ESPECÍFICA.....	105
IGE SÉRICA TOTAL.....	107
DISTRIBUCIÓN DE LOS NIVELES DE IGE SÉRICA TOTAL SEGÚN LA GRAVEDAD DE LA RINITIS ALÉRGICA.....	109
DISTRIBUCIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA RA EN LOS PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS Y POLISENSIBILIZADOS.....	110
DISTRIBUCIÓN DE LOS NIVELES DE IGE ESPECÍFICA SEGÚN LA GRAVEDAD DE LA RA.....	110
5.2. ANÁLISIS GENOTÍPICO.....	111
5.2.1. ANTECEDENTES FAMILIARES.....	113
5.2.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE DERMATITIS ATÓPICA....	115
5.2.3. PACIENTES POLISENSIBILIZADOS Y MONOSENSIBILIZADOS.	118
5.3. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	121
5.3.1. ANTECEDENTES FAMILIARES.....	122
5.3.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE DERMATITIS ATÓPICA.....	123
5.3.3. PRUEBAS CUTÁNEAS.....	124
5.3.4. POLISENSIBILIZADOS Y MONOSENSIBILIZADOS.....	129
6. DISCUSIÓN.....	133
6.1. ESTUDIO GENÉTICO.....	137
6.1.1. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN <i>PTGDR</i> CON LA RINITIS ALÉRGICA.....	138
6.1.2. POLIMORFISMO <i>PTGDR</i> -613C>T.....	138
6.1.3. POLIMORFISMO <i>PTGDR</i> -549 T>C.....	139

6.1.4. POLIMORFISMO <i>PTGDR</i> -441C>T.....	140
6.1.5. POLIMORFISMO <i>PTGDR</i> -197T>C.....	141
6.1.6. POLIMORFISMO <i>PTGDR</i> -95G>T.....	142
6.2. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN <i>LTC4S</i> CON LA RINITIS ALÉRGICA.....	142
6.2.1. POLIMORFISMO <i>LTC4S</i> -444 A/C.....	143
6.3. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN <i>CYSLTR1</i> CON LA RINITIS ALÉRGICA.....	143
6.3.1. POLIMORFISMO <i>CYSLTR1</i> 927C>T.....	143
6.4. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS.....	144
7. CONCLUSIONES.....	148
8. APÉNDICE.....	151
9. BIBLIOGRAFÍA.....	154

ABREVIATURAS

A: Adenina

aa: Aminoácido

ADAM33: *A Disintegrin And Metalloprotease 33* (Desintegrina y metaloproteasa 33)

ADR β 2: *β 2 adrenergic receptor* (Receptor β 2 adrenérgico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNds: ADN de doble cadena

ADNss: ADN de cadena sencilla

A.F: Antecedentes familiares

Arg: Arginina

ARIA: Rinitis alérgica y su repercusión en el Asma

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

ATS: *American Thoracic Society* (Sociedad Americana del Tórax)

C: Citosina

CO₂: Dióxido de Carbono

COV: Compuestos orgánicos volátiles

CYFIP2: *Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2* (Proteína 2 que interacciona con la proteína citoplasmática FMRP)

DA: Dermatitis atópica

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DPP10: Dipeptidil-dipeptidasa 10

DT: Desviación típica

EAACI: *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ECP: Proteína catiónica eosinofílica.

ECRHS: Encuesta de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea

EMSA: Ensayos de movilidad electroforética

FcεRI (FCERI): Receptor de alta afinidad para IgE

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

FGF-2: *Fibroblast growth factor 2* (Factor 2 de crecimiento de fibroblastos)

FLG: Filagrina

G: Guanina

GATA 3: Factor de transcripción 3 de la familia GATA

Gli: Glicina

Gln: Glutamina

Glu: Glutámico

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos)

GRPA: Receptor acoplado a proteína GGST: Glutathion-S-transferasa

GWAS: *Genome Wide Association analysis* (Estudios de asociación en genoma completo)

HLA: *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitario humano)

IFN: Interferón

IgE: Inmunoglobulina E

IL: Interleucina

IL-4RA: Subunidad A del receptor de IL-4

IL-1RN: Receptor de IL-1

ISAAC: *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (Estudio Internacional del Asma y Alergia en la Infancia)

Kb: Kilobase

KCl: Cloruro de potasio

kDa: Kilodalton

kU/L: Kilounidad/litro

Lt: Leucotrienos

LT-A: Linfotoxina alfa

LTC4: Leucotrieno C4

LTC4S: *Leukotriene C4 synthase* (Sintasa de LTC4)

LTP: Proteínas de transferencia de lípidos

M: Molar

mg: miligramo

mL: mililitros

MHC-II: *Major Histocompatibility Complex Clase II* (Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II)

MPO: Mieloperoxidasa

NaCl: Cloruro potásico

NF-KB: *Nuclear Factor kB* (Factor nuclear kappa beta)

NO: *Nitric Oxide* (Óxido nítrico)

OMS: Organización Mundial de la Salud

O²⁻: Radical superóxido

OH-: Radical hidroxilo

OR: *Odds Ratio* (Razón de odds)

PAF: *Platelet-activating factor* (Factor activador plaquetario)

Pb: Pares de bases

PC20: Concentración de metacolina en mg/ml que produce una caída del FEV1 del 20%

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

PGD2: Prostaglandina D2

PGDS: Sintasa de la prostaglandina D2

PGE2: Prostaglandina E2

PGT: *Prostaglandin transporter* (Transportador de prostaglandinas)

PS: Partículas solidas

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

RA: Rinitis alérgica

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción)

SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecilsulfato sódico)

SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de un único nucleótido)

SO₂: Dióxido de azufre

SPINK5: *Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5* (Inhibidor de la serinproteasa Kazal de tipo 5)

SSP-PCR: *Sequence-Specific-Primer PCR* (Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de secuencia)

STAT6: *Signal Transducer and Activator of Transcription* (Transductor de señales y activador de la transcripción)

T: Timina

TAE: tampón Tris-Acético-EDTA

TBE: Tris-Borato-EDTA

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

Th: *T helper* (T colaborador)

TLR: *Toll-like receptor* (Receptor de tipo "toll")

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

TSLP: *Thymic stromal lymphopoietin* (Linfopoyetina tímica estromal)

U: Unidades enzimáticas

UV: Ultravioleta

V: Voltio

V-CAM-1: *Vascular cell adhesion molecule 1* (Molécula de adhesión vascular de tipo 1)

x²: Chi cuadrado



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

➤ LA RINITIS ALERGICA (RA)

La rinitis alérgica (RA), que es la patología de origen inmunológico más frecuente y, a la vez, la primera causa de consulta en alergia, es una de las enfermedades más conocidas desde la antigüedad. Su incidencia, los mecanismos de producción, el diagnóstico y tratamiento han servido de modelo, en muchos casos, para otras enfermedades, puesto que esta enfermedad cada día afecta a un mayor número de personas de cualquier edad y condición (1).

La RA es una enfermedad respiratoria crónica importante por su prevalencia, su repercusión sobre la calidad de vida, su repercusión en el rendimiento escolar y la productividad laboral, su carga económica, y porque puede asociarse a otras enfermedades prevalentes, como la conjuntivitis, la sinusitis o el asma (2).

1.1. RECUERDO HISTORICO

Es evidente que el hombre prehistórico ya estaba expuesto a aeroalérgenos, como lo demuestra el aislamiento de un polen, con una antigüedad de 50.000 años, en unos asentamientos de grava del hombre de Neanderthal en Irak (1). También se ha podido identificar un polen fosilizado de lirio acuático perteneciente al Pleistoceno, época en que aparece el hombre moderno (3).

Por otro lado, Claudio Galeno de Pérgamo, famoso médico de la antigüedad, describió el moco nasal como una secreción que procede del cerebro; estas enseñanzas perduraron en medicina durante 13 siglos, siendo un médico de Bolonia llamado Marcelo Malphigio (1628-1694) quien estableció definitivamente que el moco no procedía del cráneo, sino que era secretado por la membrana que reviste las cavidades nasales (4). Konrad Victor Schneider,

en 1662, también demostró que el catarro nasal estaba producido por una exudación de la mucosa, y no se originaba en el cerebro.

Por su parte, Rhazes (865-932), médico persa que escribió en árabe y cultivó la Alquimia tituló uno de sus trabajos: “Una disertación sobre la causa del coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume”. Es la primera descripción conocida de la rinitis alérgica estacional (RA) (5).

En 1565 Leonardus Botallus (1519-1587), médico anatomista de origen francés, describió la existencia del “catarro o mal de las rosas” en su libro “Commentarioli Duo, alter de Medici, alter aegroti munere”, en el que relata el caso de una paciente que al oler las rosas experimenta cefalea, prurito nasal, y estornudos. Experiencias similares fueron notificadas por otros médicos posteriormente como Johannes Rhodius (1587-1659), quien comunicó la existencia de episodios de estornudos y epistaxis al oler las rosas en algunos pacientes. En 1683 Samuel Ledelius, en su obra “Miscelanea Curiosa” llama la atención sobre el efecto nocivo de las rosas para la vista (1).

A finales del siglo XVII la RA estacional comenzó a describirse con frecuencia, considerándola una enfermedad aristocrática por suponer que era notificada más frecuentemente entre las clases superiores. Por aquel entonces el término “fiebre del heno” reemplaza al del “catarro de las rosas o del melocotón” (6).

Viet Riedlin (1656-1724), médico alemán, en su publicación “Ites medicum” describió una “prueba de provocación” para la RA. Para comprobar la veracidad de los hechos que le relataba uno de sus pacientes, le entregó una bolsa de rosas para que la abriese durante el camino hacia su casa, sin advertirle de su contenido, reproduciéndose todos los síntomas característicos en un breve lapso de tiempo.

Baldomero Sánchez Cuenca en su obra “Polinosis” (1934) afirmaba; “es curioso que las primeras observaciones de polinosis estén relacionadas con la floración de los rosales, ya que la sensibilización al polen de rosas es muy poco común. En la mayor parte de casos se trataría de un catarro primaveral cuya aparición coincidía con la floración de los rosales” (7).

Fue a partir de 1819, con las aportaciones clínicas de dos galenos alérgicos al polen, Bostock y Blackley, cuando el “Catarrhus aestivus” o “Fiebre del heno”

llegó a ser más conocido, que se consideraba una afectación periódica de los ojos y los bronquios, y cuya génesis se atribuía erróneamente a la exposición al calor y a la luz del sol (8).

En 1873 Charles Harrison Blackley comenzó a sospechar que el polen podía ser la causa de sus estornudos y demás alteraciones primaverales, cuando al sacudir unas flores en su dormitorio se reprodujeron sus síntomas. En primer lugar relacionó las cuentas de granos de polen presentes en el aire con la intensidad de la afección, cubriendo, para ello, pequeñas láminas de vidrio con una delgada capa de vaselina y exponiéndolas al medio ambiente. La observación microscópica ulterior le sirvió para confirmar que cuando sus síntomas empeoraban había mayor contenido de polen en la superficie de sus láminas. Llegó también a reproducir en su propia piel un pequeño habón rodeado de eritema tras el contacto del polen de una gramínea con la superficie cutánea previamente escarificada, probando, a su vez, los extractos de polen en las mucosas nasal y ocular. Comprobó que al introducir una elevada cantidad de polen en las fosas nasales los síntomas llegaban a persistir horas, e incluso varios días. Descubrió así los atisbos de lo que posteriormente se conocería como “reacción inmediata” y “reacción tardía” (9).

En 1872 Morrill Wyman, médico norteamericano de la Universidad de Harvard, publicó un folleto titulado “Catarro de otoño”, en el que fue el primero que identificó al polen como causante de la “fiebre del heno” (1).

El médico berlinés Alfred Wolff-Eisner (1877-1948) creyó que la “fiebre del heno” estaba originada por una sensibilidad anormal de tipo anafiláctico frente a proteínas del polen (1).

En nuestro país fue en el año 1894, cuando un médico natural de Palencia llamado Simón y Nieto, describió el primer caso de polinosis (10). Medio siglo después, el doctor Román Alemany Vall, eminente alergólogo catalán, publicó, junto con sus colaboradores, las primeras observaciones en nuestro país sobre la sensibilización al polen de *Parietaria officinalis*, altamente alergénico (11).

1.2. DEFINICIÓN

El término rinitis engloba un grupo heterogéneo de trastornos nasales que se caracterizan por la presencia de uno o más de los siguientes síntomas: estornudos, prurito nasal, rinorrea y obstrucción (12). A lo largo de los años han ido surgiendo diversas clasificaciones de la rinitis, muchas de ellas fruto de consensos de expertos. Las de mayor trascendencia han sido publicadas por la Academia Europea de Alergia en 1994 (13) modificada posteriormente, en el año 2000 (14), y la más novedosa y utilizada actualmente es la propuesta en el documento ARIA (2, 15).

La RA se define (2) como una enfermedad inflamatoria de la mucosa nasal, mediada por IgE y causada por la exposición a una gran variedad de alérgenos. En este proceso inflamatorio participan diversas células. Uno de los datos característicos es la infiltración por eosinófilos y la activación de los mastocitos. El reclutamiento tisular de eosinófilos es reflejo de la secreción local de citocinas de tipo Th2, fundamentalmente derivadas de linfocitos T activados y mastocitos y de la consecuente activación de las células endoteliales, con un aumento selectivo de la expresión de las moléculas de adhesión. Esta liberación de citocinas da lugar también a la activación de las células epiteliales. Los mediadores liberados de las células activadas, como los mastocitos, basófilos y eosinófilos, son los responsables de las manifestaciones clínicas por sus acciones sobre los nervios sensitivos, los componentes glandulares, y las estructuras vasculares nasales.

La rinitis ha sido considerada, tradicionalmente, como una enfermedad leve y, en muchos casos, como un proceso trivial; sin embargo, en los últimos años ha quedado patente que constituye una causa infravalorada de morbilidad, que puede conllevar costos muy importantes para quien la sufre, impidiéndole una actividad diaria, un rendimiento laboral, y una vida de relación normales (12).

Por otra parte, cada vez es más evidente su importancia como factor de riesgo para el desarrollo del asma y su interacción con esta enfermedad, con la que comparte el mecanismo inmunopatogénico, habiéndose llegado a establecer el nuevo concepto de una única enfermedad de la vía respiratoria (12).

Habitualmente, la RA se ha clasificado, teniendo en cuenta el periodo de exposición al alérgeno, en RA estacional, en la que los síntomas aparecen típicamente durante una estación concreta, cuando determinados alérgenos

son abundantes en la atmósfera, como ocurre con los pólenes y algunos hongos y en RA perenne, en la que los alérgenos responsables están presentes en el ambiente durante todo el año y, generalmente, son alérgenos domésticos “de interior”, como los ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos, cucarachas, u otros. Sin embargo esta clasificación presenta algunos inconvenientes, pues en determinadas zonas geográficas los llamados “alérgenos estacionales” están presentes en la atmósfera durante la mayor parte del año, como por ejemplo los mohos en los climas tropicales o el polen de la parietaria en el área mediterránea. Por otra parte, los “alérgenos perennes” no siempre están presentes en el medio y el paciente puede exponerse a ellos de forma intermitente, o incluso su concentración puede sufrir variaciones estacionales, como ocurre con las poblaciones de ácaros. Además cada vez es más frecuente que los sujetos estén polisensibilizados y, por lo tanto, que presenten síntomas durante largos periodos, no pudiendo diferenciarse claramente la rinitis perenne de la rinitis estacional (16).

En el año 2001, un grupo de expertos, el *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Workshop Expert Panel*, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), elaboró el documento ARIA (17). En él se recogen diversas recomendaciones y, entre ellas, se propone una nueva subdivisión de la RA en “intermitente” y “persistente”. Esto ha supuesto un cambio conceptual importante, ya que esta subdivisión no depende del alérgeno al que el paciente esta sensibilizado, sino de la duración y de la frecuencia de los síntomas, número de días por semana y el número de semanas consecutivas al año durante las cuales el paciente tiene síntomas. A su vez, la rinitis se clasifica en leve y moderada-grave, en función de la intensidad de las manifestaciones clínicas y de la repercusión sobre la calidad de vida (2) (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de la Rinitis Alérgica(18).

INTERMITENTE significa que los síntomas están presentes: Menos de 4 días a la semana O bien durante menos de 4 semanas
PERSISTENTE significa que los síntomas están presentes: Más de 4 días a la semana Y durante más de 4 semanas
LEVE significa presencia de todos los ítems siguientes: Sin alteración del sueño Sin afectación de las actividades diarias, de ocio y/o deportivas Sin afectación de las actividades laborales o escolares Síntomas no molestos
MODERADA-GRAVE significa presencia de uno o más de los ítems siguientes: Afectación del sueño Deterioro de las actividades diarias, de ocio y/o deportivas Deterioro laboral o escolar Síntomas considerados como molestos

Las dos clasificaciones no son análogas, es decir, perenne no es sinónimo de persistente, ni estacional de intermitente. De hecho, según algunos estudios realizados en países europeos, aproximadamente el 50 % de los pacientes diagnosticados de rinitis estacional tienen síntomas persistentes, y un 50 % de los pacientes con rinitis perennes tienen clínica intermitente (19).

De forma alternativa, otros autores (20) consideraron que, debido precisamente a la gran prevalencia del grupo “moderado/grave”, se agrupaban rinitis muy heterogéneas y, por tanto recomiendan diferenciar entre rinitis moderada y grave. Siendo la propuesta más consolidada la de Valero y cols (21) que diferencia entre rinitis moderada (de 1 a 3 parámetros afectados) y grave (los 4 parámetros afectados). Esta modificación fue validada posteriormente en adultos (22) y en población pediátrica (23). De acuerdo a estos criterios encontraron un (20,5 %) con RA leve, (45,9 %) con RA moderada y un (33,6 %) con RA grave.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

La RA es un problema de salud mundial y representa una de las diez causas más frecuentes de consulta en atención primaria (24).

Los estudios epidemiológicos indican que la prevalencia de la RA se ha ido incrementando de forma progresiva en los últimos 50 años (25), afectando a cerca del 10-20 % de la población mundial (2).

Los estudios epidemiológicos realizados en grandes poblaciones con los síntomas de RA, la metodología más frecuentemente utilizada ha sido los cuestionarios estandarizados (26) . Los resultados pueden ser dudosos, ya que la valoración subjetiva de los síntomas por parte del paciente es muy variable y los estudios con cuestionarios tienden a sobreestimar las prevalencias (27).

Los resultados mejoran si los estudios epidemiológicos se basan en un diagnóstico médico con valoración clínica (valores predictivos positivo del 84 % y negativo 74 %), si existe confirmación de alergia por pruebas cutáneas (valor predictivo positivo del 48 %), o por determinación de IgE específica sérica (valor predictivo positivo 43,5 %) (28).

1.3.1. FACTORES DE RIESGO

La RA es una enfermedad multifactorial producida por la interacción entre los genes y el entorno (2).

Los alérgenos de interior y de exterior inhalados causan RA de forma global. Los principales alérgenos de interior son los ácaros, los epitelios de animales y los hongos. Los alérgenos alimentarios raramente provocan síntomas nasales aislados. Los agentes laborales pueden causar rinitis por medio de mecanismos alérgenos y no alérgenos (2).

La RA está muy relacionada con el asma y el eccema (12). Sin embargo, las distribuciones geográficas y temporales, así como las asociaciones entre estas enfermedades varían considerablemente y estas diferencias pueden usarse para entender mejor el mecanismo de las enfermedades alérgicas. Puede

haber factores de riesgo de RA en todas las edades de la vida y la epidemiología ha contribuido considerablemente a su exploración (1, 12).

1.3.1.1. GENÉTICA Y ANTECEDENTES FAMILIARES

La RA es una enfermedad multifactorial cuyo desarrollo se ve influido por factores genéticos y ambientales. Las enfermedades alérgicas, como el asma y la rinitis presentan fenotipos estrechamente relacionados y, a menudo, coinciden con la atopia (29), mostrando una fuerte agrupación familiar e intraindividual. Sin embargo, aunque existen algunos polimorfismos genéticos (30, 31) y varios antígenos del sistema HLA (32) asociados a la RA, los problemas relacionados con la definición de los fenotipos estudiados, el pequeño tamaño de la población estudiada y la falta de reproducibilidad de los resultados siguen impidiendo una generalización (33).

Se ha demostrado que existe un componente genético en la RA, así como en otras enfermedades alérgicas, y el factor de riesgo más claro de RA son los antecedentes familiares de alergia (12). Además, se ha comprobado, en función del análisis de los individuos y de pares de gemelos discordantes, que la RA aumenta significativamente el riesgo de asma (34). Se han identificado varios antígenos del sistema HLA que podrían ser responsables de la RA (32). También algunos genes se han convertido en candidatos para explicar el componente genético de la RA, pero hay problemas con la definición de los fenotipos estudiados que impiden hacer una generalización. Está claro que el aumento reciente de la prevalencia de la RA no puede deberse a un cambio en el conjunto de genes, sino que la implicación genética es más específica en las localizaciones de los alelos, genotipos y haplotipos de los polimorfismos de algunos genes (35).

1.3.1.2. FACTORES DE RIESGO EN LAS ETAPAS PRECOCES DE LA VIDA

Algunos estudios han demostrado que la sensibilización a los alérgenos puede ocurrir en un periodo muy precoz de la vida (36). Sin embargo, estos factores que aparecen al comienzo de la vida pocas veces se han relacionado con la RA, siendo los resultados contradictorios de los diferentes estudios.

Holt y cols (37) aportaron la hipótesis de que el primer contacto de los linfocitos T con los antígenos naturales se produce durante el período de vida intrauterina, en un ambiente inmunológico polarizado hacia un fenotipo Th2. La desviación hacia una respuesta Th1 se produce tras el parto, por un efecto inmunológico originado por la estimulación microbiana. Por esta razón la falta de infecciones facilitaría el desarrollo de una respuesta tipo Th2.

La inmadurez del sistema inmunitario en los primeros tres meses de vida, así como la asociación de anomalías inmunológicas transitorias, como el eccema del lactante, avalan la noción de que este entorno inicial puede ser un periodo de especial vulnerabilidad en el desarrollo de la sensibilización alérgica. La asociación de la RA con el mes de nacimiento (mayor en los nacidos en primavera-verano) (38), la notable asociación inversa con el número de hermanos mayores, las variaciones de presentación según el lugar de nacimiento y la clase social paterna, son indicativas de influencias ambientales tempranas (39).

En la evaluación prospectiva del estudio sobre las enfermedades respiratorias infantiles realizado en Tucson, la introducción precoz de alimentos sólidos, el tabaquismo materno durante el primer año y una IgE elevada se asociaron con el desarrollo de RA en los primeros años de vida (40). Esto confirmaría el hecho de que la RA es una manifestación precoz, de una predisposición atópica desencadenada por exposiciones ambientales precoces, estos resultados son contradictorios en otras series inglesas (18) .

En algunos estudios se han encontrado una relación inversa entre la atopia, la RA, el asma, el número de hermanos y el orden de nacimiento (41), aunque estudios más recientes de metanálisis de variantes genéticas asociadas con sensibilización en RA al polen y relación en niños que tienen hermanos mayores, concluyen que no hay ninguna interacción entre el orden de nacimiento y la sensibilización (42). En niños que viven en pequeñas familias con pocos hijos, las infecciones son raras, pudiendo desarrollar más enfermedades tipo Th2, en vez de Th1. Como consecuencia se produce una IgE responsable de la sensibilidad inmediata, aumentando la frecuencia de desarrollo de enfermedades alérgicas.

1.3.1.3. GRUPOS ÉTNICOS

Aunque se han llevado a cabo algunos estudios sobre la influencia de la etnia en el asma, pocos de ellos han examinado el papel de los orígenes étnicos en el desarrollo de la RA. En Inglaterra, (43) se ha descrito que los ingleses nativos presentaban menor riesgo de desarrollar alergia que los habitantes del país nacidos en Asia o en las Indias Occidentales. Igualmente, en un estudio se comprobó que los maoríes presentaban una frecuencia mayor de RA que los habitantes de Nueva Zelanda de origen inglés (43).

Las personas que emigran de países en vías de desarrollo a países industrializados parecen presentar un mayor riesgo de contraer alergia rinitis y asma (44). Hasta ahora existen pocas pruebas que puedan demostrar esta relación, dado que determinadas razas con menor prevalencia de RA en sus áreas de origen, igualan la prevalencia de RA respecto a la existente en el país de acogida al vivir en países occidentales (45).

Así pues, el estilo de vida y los factores ambientales de las zonas industrializadas de los países desarrollados parecen ser más importantes que la etnia (44).

En un metanálisis de estudios de asociación genética de variantes en los genes vía Th2 se realizó una búsqueda sistemática en PubMed (46), sobre polimorfismos genéticos relacionados con la vía Th2 y sus asociaciones con la RA. Se realizó un análisis de cada polimorfismo genético, estudiaron los (SNP), que es el polimorfismo de un único nucleótido. Se realizaron análisis con los modelos de efectos fijos y aleatorios, con estratificaciones por: grupos de edad, origen étnico y definición de RA. Se evaluaron los sesgos, y la heterogeneidad de los estudios. Seis estudios independientes, que analizaban tres polimorfismos de genes candidatos, con un total de 1596 casos y 2892 controles, cumplieron con los criterios de inclusión. En general, el alelo A *IL13* solo nucleótido (SNP) polimorfismo rs20541 se asoció con una mayor probabilidad de desarrollar RA, en particular en los grupos de población de edad media.

1.3.1.4. EXPOSICIÓN A ALÉRGENOS

Los alérgenos son antígenos que favorecen la producción de anticuerpos anti-IgE específicos y reaccionan con ellos. Proceden de una gran variedad de fuentes antigénicas: animales, insectos, plantas, hongos, o fuentes laborales, entre otras. Suelen ser proteínas o glicoproteínas y, con menor frecuencia, polisacáridos (47). La nomenclatura de los alérgenos fue establecida por el subcomité de nomenclatura de alérgenos de la OMS/IUIS (48).

La mayoría de los alérgenos presentan actividades asociadas a funciones biológicas potentes y pueden dividirse en varios grupos amplios, en función de su actividad biológica demostrable o de su homología significativa con proteínas de función conocida (49). Entre ellos se incluyen enzimas, inhibidores enzimáticos, proteínas implicadas en el transporte y proteínas reguladoras.

La exposición a alérgenos es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo y desencadenamiento de la RA, sobre todo la exposición en un periodo muy precoz de la vida. Los alérgenos externos suponen un mayor riesgo de desarrollar RA estacional, que los alérgenos domésticos. En el curso de la RA, la sensibilización a los alérgenos exteriores parece desempeñar un papel más importante en el desarrollo de la enfermedad que la sensibilización a los alérgenos interiores (50). Siendo muy importante la exposición, cuanto más expuestos estén los pacientes atópicos a múltiples pólenes, más sensibilizaciones pueden desarrollar los paciente alérgicos con RA; así, actualmente, son más frecuentes los pacientes con RA polisensibilizados que los monosensibilizados (51).

Por otro lado, el complejo ambiente de los espacios interiores modernos contribuye a que exista una exposición a múltiples fuentes de alérgenos que pueden tener un efecto sinérgico entre ellos (52).

1.3.1.5. DIFERENCIAS ENTRE POBLACIONES RURALES Y URBANAS Y MODIFICACIÓN DEL ESTILO DE VIDA

En 1989, Strachan postuló la denominada hipótesis de la higiene, la cual explica la relación entre genes y ambiente, resultando ser una de las hipótesis más aceptadas en los últimos años (53). En ella se establece que la mejora en

la higiene observada en la sociedad industrializada, junto con las mejoras en las medidas de salud pública y el uso de vacunas y antibióticos, reducen la incidencia de las infecciones que normalmente estimulan el sistema inmunitario para protegerle contra el desarrollo de enfermedades alérgicas (Figura 1).

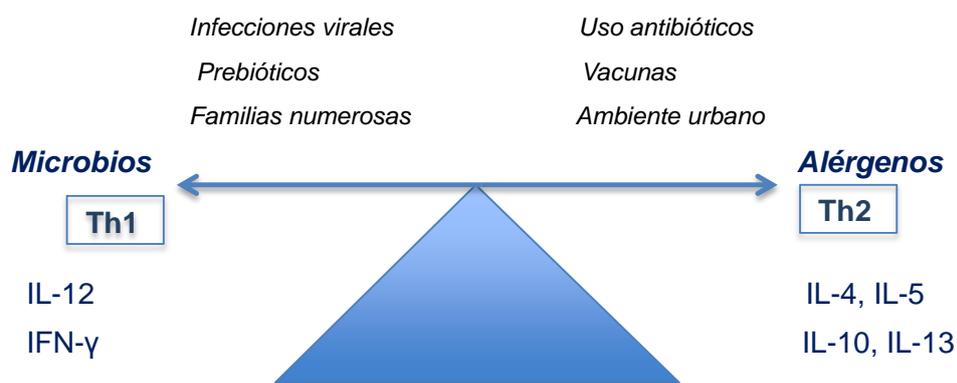


Figura 1. Factores que favorecen respuestas Th1 o Th2, hipótesis de la higiene.

En diferentes estudios realizados en Norteamérica, Europa y Sudáfrica se ha demostrado que la prevalencia de atopía (definida positividad en las pruebas intraepidérmicas frente a aeroalérgenos comunes) y de RA es mayor en áreas urbanas que en áreas rurales (54).

Otra hipótesis es que los antígenos bacterianos pueden favorecer el desarrollo de las células Th1 a partir de linfocitos TCD4+ estimulados por medio de una vía dependiente de *CD14*. El gen *CD14* se encuentra situado en el 5q31.1. Las variantes genéticas del gen *CD14* podrían influir en la diferenciación de las células Th y, como consecuencia, en la IgE sérica total. En este sentido, se ha observado que el SNP -159 de *CD14* desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de *CD14* en suero y los niveles totales de IgE sérica (55).

También se ha comprobado que los hijos de los granjeros tienen menos riesgo de desarrollar RA que otros niños, lo que indica que el estilo de vida del campo podría proteger a los niños frente al desarrollo de alergia (56). Se ha especulado que pudiera ser porque las endotoxinas bacterianas inducirían la producción de IL-12 y, por tanto, una desviación hacia una respuesta Th1 y un

menor desarrollo de sensibilización a alérgenos (56). Los hábitats urbanos actuales presentan unas condiciones más favorables para el crecimiento de ácaros (con el uso de cortinas, moquetas, calefacción, etc.) y el contacto con los animales de compañía es más estrecho, lo que aumenta el riesgo de desarrollar RA por ácaros y epitelios.

En los países en vías de desarrollo se ha asociado el desarrollo de asma y alergia con la adopción de un estilo de vida urbanizado, “occidental” (57). Esto se explica por las diferencias entre factores ambientales del ambiente urbano y rural, como la convivencia con animales domésticos, compartir la cama con un fumador, educación de los padres, ventilación de la casa y exposición a los vehículos de motor.

La RA es más frecuente en los países desarrollados y entre los individuos que, desde zonas pobres, se trasladan a vivir a países avanzados (58).

1.3.1.6. CONTAMINACIÓN DOMÉSTICA Y ATMOSFÉRICA

La contaminación del ambiente interior tiene una gran importancia, ya que los habitantes de los países industrializados pasan más del 80 % de su tiempo en espacios interiores. Esta incluye los alérgenos domésticos y los compuestos contaminantes de interior, cuyo mayor representante es el tabaco (59).

Los estudios ambientales de los efectos sobre la salud de la contaminación del aire han contribuido al conocimiento de estas afecciones.

Se han realizado estudios sobre los efectos crónicos de algunos tipos de contaminantes, como el ozono, la lluvia ácida, los tóxicos transportados por el aire y las partículas de materia de sustancias químicas (incluidos los residuos de la combustión de los motores diésel). Varios estudios han evaluado los efectos de la contaminación ambiental sobre la rinitis:

En la ciudad de Méjico se ha descrito que la contaminación es una causa importante de síntomas nasales en sujetos no alérgicos (60).

En Turquía se ha observado que los estudiantes de enseñanza secundaria que viven en áreas polucionadas presentan unas tasas significativamente mayores

de prevalencia de síntomas de RA (22, 8 %) que los que viven en áreas residenciales no contaminadas (6 %) (61).

En Italia, Corbo y cols, demostraron que los niños de 7 a 11 años que viven en un área contaminada tenían 1,7 veces más síntomas de RA que los no expuestos (62).

En Tailandia, los policías que trabajan en zonas de tráfico intenso presentan más tos y síntomas de rinitis y menor FEV1 y FVC que la población tailandesa general (63).

En Taiwan, los síntomas nasales de los niños que viven en comunidades petroquímicas fueron más prevalentes que los de los que viven en comunidades rurales (64).

La contaminación atmosférica produce la aparición de síntomas en pacientes con RA. Las partículas residuales de la combustión de los motores diésel pueden producir inflamación del tipo Th2, aumentando así la incidencia de RA (65).

También es importante tener en cuenta que la población occidental permanece gran parte del tiempo en interiores, siendo muy importante el efecto de la contaminación doméstica:

La exposición prenatal y durante el periodo postnatal precoz al humo del tabaco aumenta la sensibilización alérgica en algunos grupos, sobre todo en niños varones o niños con atopia en los tres primeros años de vida (40).

En el estudio francés ISAAC, con colaboración internacional, en el que participaron aproximadamente unos 15.000 niños, se observó un incremento en la frecuencia de dermatitis atópica en los niños crecidos en familias fumadoras (66).

Otros contaminantes que pueden ejercer cierta influencia, especialmente cuando en la casa hay una cocina de combustible o de leña, que emite CO₂ (óxidos de carbono), óxidos de nitrógeno, PS (Partículas Sólidas), producidas principalmente por la combustión incompleta de los carburantes y los lubricantes, COV (Compuestos Orgánicos Volátiles) y contaminantes sulfúricos, el SO₂, (dióxido de azufre), provocando el aumento de enfermedades de vías

respiratorias (67). Las cocinas de gas también pueden estar implicadas en los síntomas respiratorios, especialmente en las mujeres y en las personas atópicas (68).

En un estudio realizado en niños de 9 a 11 años del sur de Baviera se encontró un menor riesgo de desarrollar RA estacional en familias que usaban hulla y madera para calentar la casa; la hulla y la madera, que se usan en clases sociales bajas, aumentan el riesgo de infecciones respiratorias (69).

Los productos de la combustión de combustibles fósiles pueden actuar como adyuvantes en el sistema inmunitario y potenciar la inflamación alérgica (70). A través de este mecanismo, los productos de la combustión de los motores diésel pueden contribuir a la mayor prevalencia y morbilidad del asma y la RA. Se mostró que las partículas de dichos gases de escape decantan la respuesta inmunitaria hacia la producción de IgE y aumentan la inflamación alérgica (71). La provocación nasal con partículas de escape de motores de diésel produce alteraciones en las respuestas de las citocinas y aumento de la producción de IgE (72). Las partículas de estos gases pueden inducir enfermedades alérgicas con un aumento de la producción de IgE y una activación preferente de las células Th2 (73). También pueden actuar como potenciadoras de los alérgenos del polen (74, 75). Las vías metabólica y de activación celular están vinculadas a sustancias químicas como los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en las emisiones de combustible diésel (76).

Actualmente la contaminación atmosférica es un problema de salud pública que va en aumento. En Europa, el principal causante de la contaminación atmosférica por partículas en suspensión son los vehículos a motor, sobre todo a expensas del diésel. Las partículas de emisión de diésel, están conformadas por un núcleo de carbono, sobre el que se depositan componentes químicos orgánicos de alto peso molecular y metales. Los contaminantes atmosféricos no solamente tienen un efecto directo o indirecto sobre el individuo sino que tienen una importante acción sobre los aeroalérgenos. Los pólenes de zonas con gran contaminación pueden expresar mayor cantidad de proteínas descritas como alergénicas (75, 77).

1.3.1.7. FUMADORES ACTIVOS

Muchos pacientes con RA son fumadores. El tabaquismo aumenta de forma variable los niveles de IgE total y específica (78).

En algunos estudios se ha demostrado que los fumadores presentan más RA que los no fumadores, pudiendo ser el tabaco un factor causal de alergia (79). El tabaquismo también puede aumentar la sensibilización alérgica a haptenos en marcos ocupacionales (80).

La exposición prenatal y posnatal al humo del tabaco puede aumentar la sensibilización alérgica durante los tres primeros años de vida (40).

El humo del tabaco, puede alterar el aclaramiento mucociliar y provocar una inflamación eosinofílica y de tipo alérgico de la mucosa nasal en niños no atópicos (81).

El efecto del tabaquismo activo varía en función de la edad. En estudios transversales se ha demostrado que los niños o adolescentes con RA fuman más que los que no presentan RA (82).

1.3.1.8. CLASE SOCIAL Y OCUPACIÓN

Estos factores también pueden participar en la prevalencia de la RA. En la mayoría de estudios se ha observado mayor frecuencia de RA en las clases sociales con un nivel económico más elevado. Así, en una serie británica de personas nacidas en 1958, los hijos de padres con ocupaciones de clases sociales más altas tenían más probabilidades de padecer RA estacional (40).

En un estudio realizado en los centros urbanos de los Estados Unidos, las clases sociales bajas presentaban un aumento de IgE total, del número de sensibilizaciones a alérgenos y de los niveles de IgE específica (83).

En el estudio sobre salud respiratoria infantil de Tucson se observó la mayor prevalencia de RA estacional en los niños cuyas madres tenían niveles de estudios superiores al de educación secundaria (40).

1.3.1.9. EL CAMBIO CLIMÁTICO REPERCUTE EN LOS ALÉRGENOS

El cambio climático repercute en los aeroalérgenos, especialmente el polen (84). Con frecuencia se utiliza la alergia al polen para estudiar la interrelación entre la contaminación del aire, la rinitis y el asma bronquial. Los estudios epidemiológicos han demostrado que están correlacionados: urbanización, niveles elevados de emisiones de la combustión de los motores de vehículos y estilo de vida occidentalizado, con un aumento en la frecuencia de la alergia respiratoria inducida por el polen, frecuente en las personas que viven en zonas urbanas en comparación con aquellos que viven en las zonas rurales. También los factores meteorológicos (temperatura, velocidad del viento, humedad, etc.), junto con sus cambios climatológicos (calientes o frías anomalías y períodos secos o lluviosos, etc.), pueden afectar de forma biológica y química a los componentes de esta interacción. Además, mediante la inducción de la inflamación de las vías respiratorias, la contaminación del aire supera las respuestas de la barrera mucosa, inducidas por el alérgeno. En conclusión, el cambio climático podría inducir efectos negativos sobre las enfermedades alérgicas respiratorias. En particular, la mayor longitud y severidad de la estación polínica, la mayor concurrencia de estos eventos: fuertes precipitaciones y la creciente frecuencia de episodios de contaminación atmosférica urbana sugieren que los factores de riesgo ambientales tendrán un efecto influyente en la RA (84).

En España, se ha predicho que, debido al cambio climático, dentro de 100 años, los robles polinizarán un mes antes que en la actualidad (85).

En algunas especies se ha ampliado la duración de la estación polínica. Además, en estas condiciones climáticas modificadas, las plantas producen mayor cantidad de polen (86, 87) y se ha descrito una mayor alergenicidad del polen de árboles que han crecido a temperaturas más altas o en áreas contaminadas (87).

Los cambios climáticos progresivos pueden afectar la calidad y cantidad de los pólenes alergénicos aerotransportados; el aumento de las temperaturas, puede modificar la carga de polen global y afectar la tasa de sensibilización alérgica (88).

El efecto del cambio climático se traduce, en parte, en una variación en el patrón de temperatura que caracteriza las estaciones. De este modo, las plantas pueden variar su calendario polínico, avanzando y alargando su periodo de polinización. Además, en presencia de concentraciones elevadas de CO₂ y temperatura, las plantas aumentan su producción de polen. El cambio climático también puede comportar la desaparición de especies así como el arraigamiento de especies no autóctonas, con el consiguiente riesgo de sensibilización alérgica para la población expuesta.

En conclusión, existen suficientes pruebas científicas sobre el efecto que la contaminación atmosférica tiene en el alérgeno incrementando su exposición, su concentración y/o su actividad biológica alérgica (77).

1.3.2. PREVALENCIA

La RA es una enfermedad muy frecuente en los países con estilo de vida occidental. Es más frecuente en los países más desarrollados, aumentando progresivamente la prevalencia de esta enfermedad. Los datos de prevalencia más antiguos eran de RA estacional y perenne y proceden de estudios monocéntricos con importantes problemas de diseño y falta de homogeneidad en los resultados, obteniéndose cifras con una gran dispersión. La cifra media de prevalencia de la RA estacional es del (15 %), con un rango entre el (10,9 %) y (18,6 %), siendo más frecuente en niños que en adultos. Por el contrario la RA perenne es más frecuente en adultos (89).

Sin embargo, el conocimiento epidemiológico de la RA no es muy completo. Deberían realizarse nuevos estudios sobre la epidemiología de la RA porque podrían dar indicios útiles para la interpretación de las alteraciones inmunológicas asociadas con las enfermedades alérgicas en general (40).

Existe una gran dispersión en las cifras de prevalencia publicadas por los diferentes autores, atribuibles en muchos casos a la disparidad de los métodos utilizados para su evaluación (cuestionario, información proporcionada por los padres, diagnóstico establecido a través de examen médico, pruebas cutáneas, medición de IgE) (12).

1.3.2.1. MUNDIAL

En un estudio en el que se evaluaron la prevalencia, la sensibilización y los agentes y factores asociados con la RA en varios países de África, Extremo Oriente, Australia, Europa, Latinoamérica, Medio Oriente y Turquía (90), los autores encontraron que, en los niños, la prevalencia de la RA en estas regiones variaba entre las regiones: desde 2,9 % a 3,8 % RA en niños de 10 a 18 años de edad de una región en Turquía; desde 54,1 % a 39,2 % RA en niños de 13 a 14 años de edad en una región en Nigeria. Por otra parte, la prevalencia de la RA ha aumentado notablemente en la última década, especialmente en algunos de los países más prósperos de África, China y Taiwán y varios países de Oriente Medio, probablemente como consecuencia de mejores estándares de vida, con una creciente exposición a múltiples agentes de sensibilización tradicionales y no tradicionales y por factores de riesgo similares a los observados en Europa occidental y América del norte.

Estos resultados sugieren que hay mayor diversidad en la prevalencia de la RA en las poblaciones de estas regiones, está en contraste con la diversidad de RA en las poblaciones occidentales (Estados Unidos y Europa), que tienden a ser más uniforme la prevalencia de la RA.

En los últimos decenios se han comunicado incrementos llamativos en la prevalencia de la rinitis alérgica, sobre todo en los países occidentales (90). Se estima que entre el 10 % y el 25 % de la población general presenta esta enfermedad, si bien las cifras pueden ser diferentes según la edad de la muestra estudiada y su distribución geográfica. En estudios epidemiológicos internacionales, sobre asma y alergia en la infancia el (ISAAC I), realizado en 1994 en niños de 56 países, se apreciaron prevalencias muy variables (1,4 %-39,7 %) (91) y su seguimiento (ISAAC III) (92).

En lo que se refiere a los adultos, en una encuesta de salud respiratoria de la comunidad europea (ECHRS), realizado en 1994, proporcionó en España cifras que oscilaron entre el 12,1 % y el 17,6 % (93).

En un estudio sobre población general llevado a cabo en Europa, se observó que la prevalencia de la RA fue de aproximadamente el 25 %, oscilando entre el 17 % de Italia y el 28,5 % de Bélgica (tabla II) (94)

Tabla II. Prevalencia de la rinitis alérgica en la población general europea.

	Edad	Prevalencia	Diagnosticados	Persistente	Intermitente
Bélgica	39,0	28,5 %	52,5 %	24,8 %	72,0 %
Alemania	38,0	20,6 %	66,0 %	41,7 %	19,5 %
Italia	41,5	16,9 %	70,3 %	32,4 %	35,1 %
España	31,3	21,5 %	52,0 %	21,0 %	48,5 %
Reino Unido	42,7	26,0 %	57,7 %	53,8 %	57,7 %
Francia	38,8	24,5 %	45,7 %	28,7 %	55,4 %

1.3.2.2. NACIONAL

En cuanto a la prevalencia de la RA, en España, se obtuvieron cifras intermedias entre (11,7 %-21,8 %) en relación con el resto de países europeos (12).

En un estudio monocéntrico en el país vasco Azpiri y cols en pacientes entre edades de 10-40 años obtuvieron una prevalencia de RA estacional del (10,6%) (95).

En el estudio *Alergológica 2005* se apreció un incremento variable de la RA entre los escolares españoles, en relación con la variabilidad geográfica, lo que indica la existencia de factores de riesgo locales. Esta elevada prevalencia supone un importante impacto económico. Este hecho, junto a la alta asociación a otras enfermedades alérgicas, hace que la RA esté adquiriendo cada vez más importancia en el plano sociosanitario español (96).

La rinoconjuntivitis fue el principal motivo de consulta en *Alergológica 2005*, con un 55,5 % de los casos (2.771 pacientes, de un total de 4.991 estudiados), cifra equiparable a la que se obtuvo en *Alergológica 92* (2.279 pacientes de un total de 4.005 pacientes que representaban el 57,4 % de la muestra) (96).

El sexo femenino fue ligeramente superior en la submuestra de rinoconjuntivitis (55,4 % de mujeres y 44,6 % de varones) en *Alergológica 2005*.

La edad media de los pacientes del grupo de rinoconjuntivitis en *Alergológica 2005* es de (29,9 \pm 14,9 años) ha aumentado cinco años desde *Alergológica 92*. En la figura 2 se muestra la distribución por edades: los niños (menores de 14 años) han representado el 15,3 % de la muestra (418 pacientes), la mitad con respecto a los estudiados en 1992.

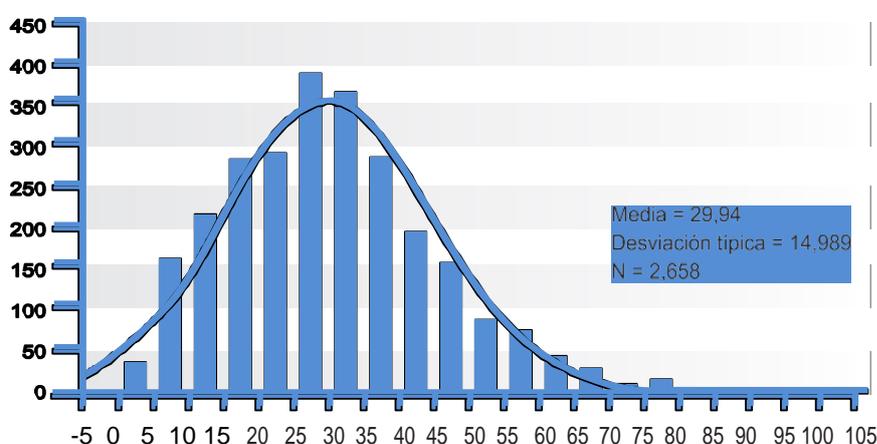


Figura 2. Histograma de la edad de los pacientes con rinoconjuntivitis (96).

La distribución de los pacientes según su comunidad autónoma de residencia se representa en la figura 3. En la mayoría de las comunidades (excepto en el País Vasco, Castilla León, Aragón, La Rioja, Navarra y Cantabria) los pacientes que consultaron por rinoconjuntivitis constituyeron más de la mitad de la muestra, lo que es un dato significativo. En el 86,6 % de los casos el paciente continuaba viviendo en la comunidad en que nació.

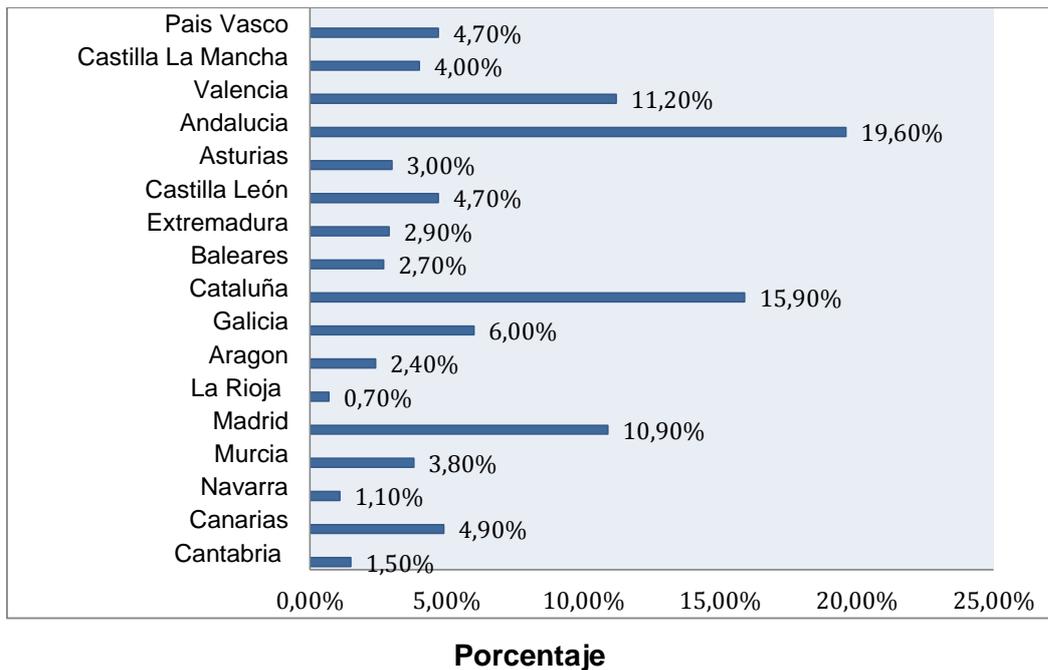


Figura 3. Procedencia por la comunidad autónoma de residencia (96).

En un estudio de Jauregui y cols (97), se obtuvieron las prevalencias de (7,1 %) de RA intermitente leve, (52,1 %) de RA intermitente moderada/grave, (3,2 %) de RA persistente leve y (37,6 %) de RA persistente moderada/grave, posteriormente se completó el estudio modificado por Valero (22), discriminándose entre la RA moderada (59,5 %) y grave (30,4 %).

1.3.2.3. AUTONÓMICO: CASTILLA Y LEÓN

Como se ha mencionado, en el estudio Alergológica 2005 se estudió el porcentaje de pacientes sensibilizados a alérgenos en las diferentes comunidades autónomas (96). En la Tabla V, se puede observar que el mayor porcentaje de sensibilización de los pacientes con RA en Castilla y León se corresponde con los pólenes (tabla III).

Tabla III. Porcentaje de sensibilización a los distintos alérgenos en pacientes con rinoconjuntivitis de Castilla y León.

POLENES		ACAROS		EPITELIOS		HONGOS	
Pacientes	%	Pacientes	%	Pacientes	%	Pacientes	%
75	58,6 %	38	29,7 %	32	25,0 %	5	3,9 %

Entre los pólenes, las gramíneas siguen siendo el grupo más importante, seguido del polen de olivo.

En este estudio también se evaluó las sensibilizaciones a los diferentes pólenes en Castilla y León (Tabla IV).

Tabla IV. Porcentaje de pacientes con RA sensibilizados a pólenes

<i>Gramíneas</i>	<i>Olea</i>	<i>Platanus</i>	<i>Cupressus</i>	<i>Chenopodium</i>
53,9 %	14,1 %	2,3 %	6,3 %	8,6 %

1.4. ETIOPATOGENIA

1.4.1 INFLAMACIÓN ALÉRGICA

La RA es el resultado de la inflamación nasal mediado por IgE producido por células mediadoras, citocinas, neuropéptidos, así como moléculas y células de adhesión que colaboran en un complejo sistema que provoca síntomas específicos y la hiperreactividad nasal inespecífica (figura 4).

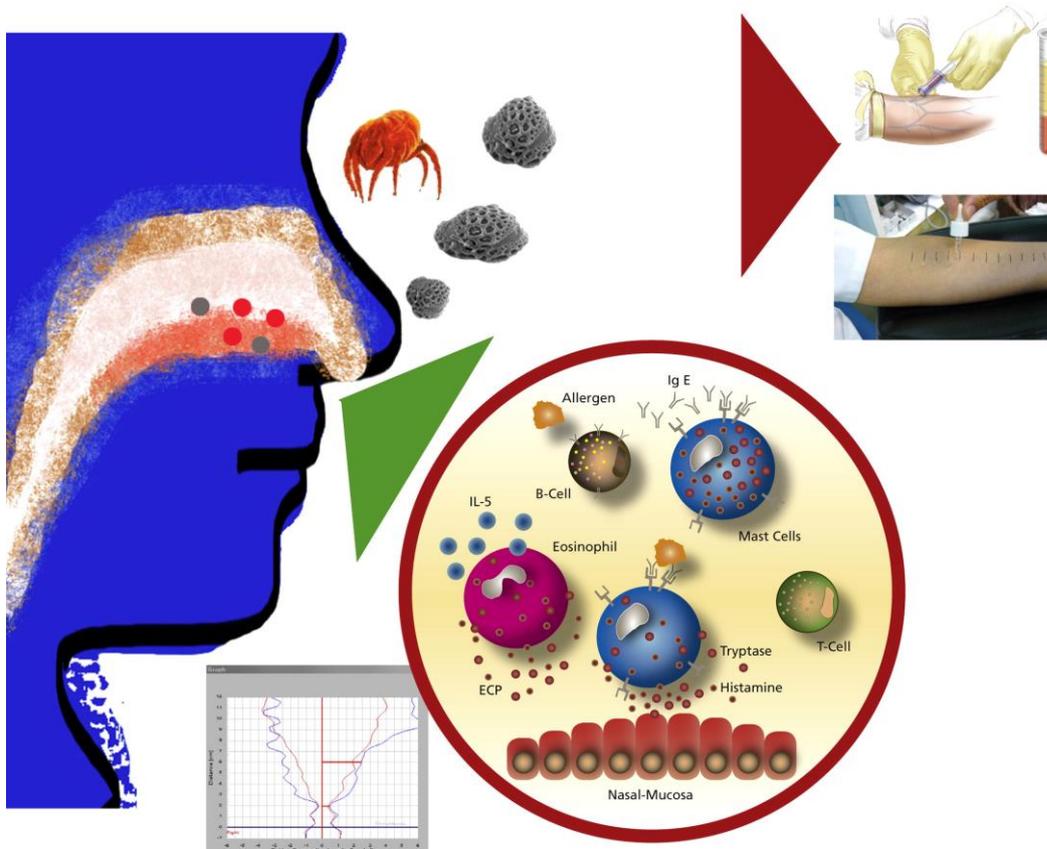


Figura 4. El efecto del alérgeno en la mucosa nasal produce una respuesta mediada por IgE con un patrón inflamatorio TH2 que conduce a una reducción en el volumen de las vías respiratorias nasales después de la exposición al alérgeno; en el diagnóstico se utilizan pruebas “in vivo” e “in vitro” (98).

1.4.2. MECANISMOS DEPENDIENTES DE IgE

La RA está causada por una sobreproducción constante de inmunoglobulina E (IgE) en respuesta a antígenos ambientales habituales como los alérgenos de interior y de exterior, los alimentos (muy poco frecuentes) y otros posibles alérgenos (99). La producción de IgE deriva de complejas interacciones entre linfocitos B, linfocitos T, mastocitos y basófilos, que implican la participación de las citocinas IL-4, IL-13 e IL-18, así como una interacción física entre los linfocitos B y T por medio de numerosas moléculas de superficie y de adhesión (100). Los linfocitos Th2 y una disminución de las respuestas de los linfocitos T reguladores de tipo 1, estimulan la síntesis de IgE y el reclutamiento, la maduración, la supervivencia y la función efectora de células accesorias como los eosinófilos, los basófilos y los mastocitos (101). Durante la estación polínica

, y justo después de esta, tiene lugar una síntesis continua de IgE de la mucosa nasal (102). En la RA, los alérgenos impulsan un cambio de isotipo hacia IgE en la mucosa nasal (103).

La IgE específica del alérgeno, sintetizada en respuesta a los alérgenos ambientales, se fija a los receptores de alta afinidad por IgE (FcεRI) situados en la membrana de los mastocitos y los basófilos. La acumulación de las moléculas de IgE unidas a los receptores tras la exposición a los alérgenos específicos da lugar a la producción de mediadores que generan la respuesta alérgica (104) (figura 5).

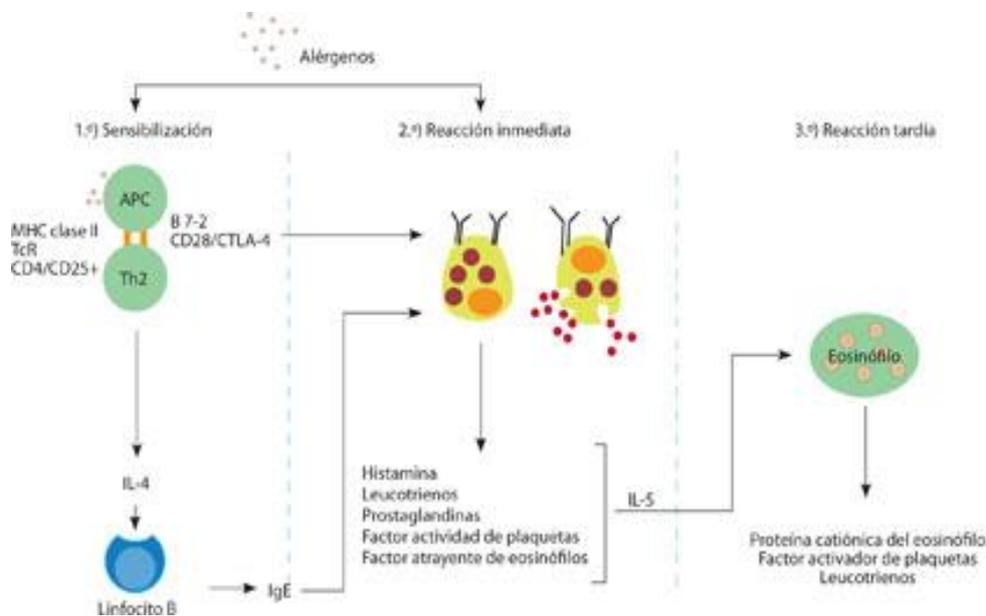


Figura 5. Después de la sensibilización se produce la reacción inmediata de cuatro a seis horas después de esta reacción inflamatoria. Esta ocurre debido a unos productos que se liberaron junto con la histamina, y que tienen como misión atraer al lugar donde se produce la inflamación unas células, los eosinófilos principalmente, que liberan su contenido interior. Es entonces cuando se empieza a dañar e inflamar, de una forma más crónica, la conjuntiva de los ojos, la mucosa de la nariz y/o de las vías respiratorias, perpetuándose los síntomas de la conjuntivitis, rinitis y/o asma bronquial. A esta fase se le denomina *reacción alérgica tardía* (105).

1.4.3. MECANISMOS INDEPENDIENTES DE IgE

Los alérgenos, a causa de su actividad enzimática proteolítica, pueden activar directamente las células epiteliales y terminar provocando una respuesta

inmunitaria de tipo 2 que cause la liberación de citocinas y quimiocinas, lo que implica que son capaces de producir la inflamación de las vías respiratorias con independencia de la IgE (106).

1.4.4. INFLAMACIÓN DE LA MUCOSA NASAL EN LA RA

La infiltración celular de la mucosa nasal durante la estación polínica se relaciona con la gravedad de los síntomas y con la hiperreactividad nasal inespecífica; se pueden encontrar eosinófilos entre las células epiteliales no descamadas de la mucosa, en la submucosa y en las secreciones nasales. Existe un mayor número de mastocitos en el epitelio y en la submucosa, aunque suelen estar desgranulados. La cantidad de linfocitos T CD4+ también aumenta durante la estación polínica. Igualmente se produce un incremento de las células de tipo Langerhans (CD1+) (107).

En lo que se refiere a alergia respiratoria (rinitis y asma alérgicas), se especula sobre la existencia de una conexión naso-bronquial, donde la liberación de citocinas (sobre todo IL-5) y mediadores proinflamatorios a la circulación sanguínea, junto con la acción de las moléculas de adhesión, propagarían por vía sistémica la inflamación iniciada en la mucosa nasal o bronquial (108). Se han demostrado cambios inflamatorios en la mucosa bronquial de los pacientes no asmáticos con RA, al igual que una inflamación eosinofílica nasal en los pacientes asmáticos sin clínica nasal, datos que indican que la inflamación alérgica está presente a lo largo de toda la vía respiratoria, aunque el paciente sólo manifieste de forma predominante rinitis o asma (109) (figura 6) .

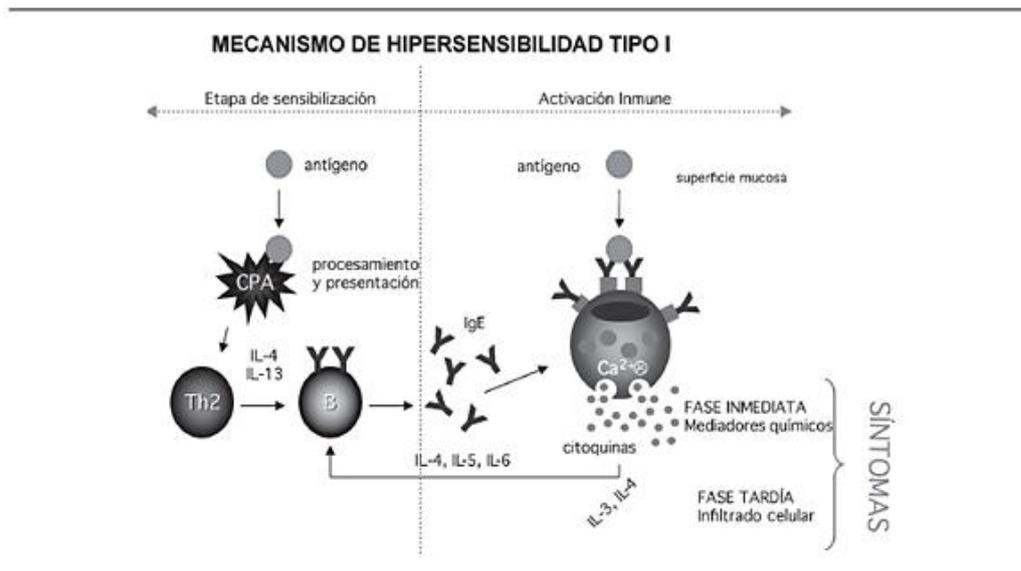


Figura 6. (110) La liberación de mediadores químicos (histamina y leucotrienos, entre otros) originados en la activación del mastocito, sensibilizado con IgE específica de alérgeno, es la responsable de los síntomas del paciente.

✓ Células inflamatorias

El infiltrado inflamatorio está formado por diferentes tipos celulares. Los mastocitos no son sólo células efectoras de la respuesta inmediata, sino que también intervienen en la inflamación alérgica en curso (111, 112). Durante la estación polínica, los eosinófilos pueden diferenciarse de sus células progenitoras; en los pacientes alérgicos su número es mayor y están activados (113). El contacto del alérgeno con la fosa nasal en el paciente sensibilizado da lugar a una respuesta inmediata, mediada por IgE, que se inicia con la liberación de histamina y mediadores formados de *novo*, como los leucotrienos. Varias horas más tarde, la liberación de citoquinas por las células inflamatorias (mastocitos, macrófagos, células epiteliales, linfocitos colaboradores CD4+) favorece la quimiotaxis y activación de eosinófilos y la síntesis de IgE, perpetuando la respuesta al alérgeno durante la respuesta tardía. Es llamativa la presencia de histamina en la mucosa nasal durante la fase tardía, que en

ausencia de PG D2, sugiere una activación de los basófilos (109) (figura 7).

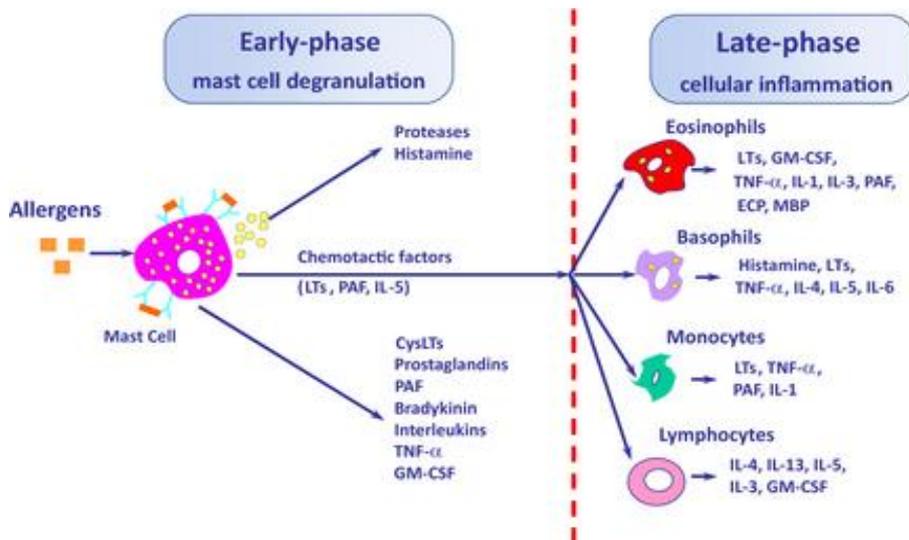


Figura 7. (114) Células inflamatorias en la respuesta inmediata y la tardía.

✓ Mediadores de la inflamación

La mayoría son sintetizados por diferentes células y sus acciones sobre los vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y glándulas de la mucosa nasal van a dar lugar a las manifestaciones clínicas: estornudos, prurito, rinorrea y obstrucción nasal. Un mediador puede ocasionar todos los síntomas, como ocurre con la triptasa. Y un síntoma puede estar provocado por diferentes mediadores y por distintos mecanismos como ocurre con la obstrucción nasal, que es consecuencia de la vasodilatación, la exudación del plasma y el edema.

Durante la estación polínica se liberan una serie de mediadores en las secreciones nasales. Entre otros se incluyen los leucotrienos cisteínicos (CysLT) la proteína catiónica eosinofílica (ECP) y, de forma inconstante, la histamina (115).

1.5. ASPECTOS GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Asma y atopia son enfermedades comunes que involucran reacciones inadecuadas del sistema inmunitario. Se ha definido la atopia como una predisposición genética a responder frente a antígenos ambientales comunes,

denominados alérgenos, mediante la producción de cantidades significativamente elevadas de anticuerpos IgE específicos (116). Esta patología engloba diferentes entidades: asma bronquial, RA y dermatitis atópica. La gran variedad en los fenotipos atópicos muestra la complejidad de este tipo de enfermedades, pudiendo ser un reflejo de su carácter multifactorial, es decir, de la implicación tanto de factores genéticos como ambientales.

A pesar de que, habitualmente, el análisis de la susceptibilidad a padecer asma y enfermedades alérgicas se ha evaluado estudiando la implicación de muchos genes y muchos factores ambientales, analizados de forma individual, mientras que la realidad es mucho más compleja, con genes que interaccionan entre sí y con factores de riesgo ambientales que confieren susceptibilidad, las aproximaciones simplistas, tanto por ligamiento como por asociación, han proporcionado interesantes descubrimientos. Se han encontrado muchas regiones del genoma ligadas a fenotipos de asma y atopia. Alrededor de 70 variantes de genes candidatos han sido publicados como asociados a fenotipos. Las principales regiones se han localizado en determinados cromosomas:

► [Cromosoma 1](#)

-*IL10*: Gen que codifica la citocina IL-10, cuyas variantes génicas han presentado asociación con el asma (117).

-*FLG*: Gen de la filagrina, expresada en la epidermis y en las mucosas oral y nasal (118) que forma parte del complejo de diferenciación epidérmico localizado en el cromosoma 1q21. Se ha relacionado con la dermatitis atópica y el eccema (119) así como con la gravedad del asma asociada a dermatitis atópica (120).

► [Cromosoma 2](#)

-*IL-1RN*: Gen perteneciente a la agrupación del gen *IL-1* en 2q14, que sintetiza la proteína antagonista del receptor de la IL-1, citocina relevante en el equilibrio entre el estado pro y anti-inflamatorio. *IL-1RN* se ha asociado al asma a través de 3 polimorfismos en una población alemana y de otros 2 distintos en familias italianas (121). Los genes antagonistas del receptor de la IL-1, *IL1RN* y el

antígeno 4 de los linfocitos citotóxicos, *CTLA4*; las variantes en *IL1RN* se han asociado con el asma y la alergia (122).

-DPP10: Codifica la dipeptidil-dipeptidasa 10, implicada en el procesamiento de los péptidos terminales de citocinas y quimiocinas. Su localización comprende una amplia región entre 2q14 y 2q32, próxima a la agrupación del gen de la IL-1, y que se ha determinado como una región ligada al asma y a la hiperreactividad bronquial (123).

-CTLA4: Sólo se expresa en células T activadas y es un potente inhibidor de la activación de células T. Además, un polimorfismo de este gen se ha asociado con niveles elevados de IgE total y RA en mujeres (124) y varios otros se han asociado con asma, IgE sérica elevada y nivel de gravedad del asma (125).

► [Cromosoma 5](#)

-IL-5: La citocina IL-5 ha sido analizada en diversos estudios genéticos por participar en la maduración de los eosinófilos mediante su unión a la cadena alfa del receptor de IL-5 presente en estas células y, por tanto, en el proceso inflamatorio de la alergia. De hecho, en estas investigaciones se determinó la asociación de variantes de IL-5 y de su receptor, con el asma y sus síntomas (33), aunque dicha asociación no ha resultado tan contundente como la existente con otros genes característicos de la respuesta Th2.

-IL-4: Gen perteneciente a la agrupación (*cluster*) de citocinas del 5q, asociado al asma y la alergia a través de sus variantes génicas en diferentes estudios (126). Asociación esperada teniendo en cuenta la implicación de IL-4 en la orientación de la maduración linfocitaria de los CD4+ hacia linfocitos Th2. El gen que codifica la IL-4 está localizado en cromosoma 5q31 y el de la cadena alfa del receptor de IL4, IL4RA, en el cromosoma 16q12; en ambos los estudios de ligamiento genético han descrito asociación con el asma, niveles de IgE sérica y la RA (126).

-IL-13: Gen de la citocina IL-13, inductora de la síntesis de IgE y uno de los más estudiados en relación a esta patología. El cambio Arg130Gln en la secuencia de aminoácidos a causa del polimorfismo *IL-13 +2044G>A* provoca un aumento en su actividad, lo que puede explicar la asociación de esta variante con niveles elevados de IgE total, asma, RA y dermatitis atópica (127). También se ha asociado con un aumento del riesgo de desarrollar

sensibilización alérgica a través de un segundo polimorfismo en la región promotora del gen: 1112C>T, que se traduce en una mayor tasa de transcripción (128).

-*CD14*: Algunos polimorfismos del gen que codifica al receptor del lipopolisacárido, CD14, se han asociado a la inflamación alérgica y la regulación de IgE (55), y con la atopia (129).

-*SPINK5*: La proteína SPINK5 (*Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5*), exclusiva del epitelio, tiene una función protectora respecto a las proteasas de los mastocitos. El cambio en la secuencia de aminoácidos Glu420Lys, rs230307 se ha asociado con el asma y el eczema (130).

-*ADRB2*: El gen del receptor adrenérgico $\beta 2$ es uno de los genes asociados al asma que mejor han sido replicados (131).

-*CYFIP2*: Conocido como el gen de la proteína 2 que interacciona con la proteína citoplasmática FMRP (*Cytoplasmic fragile X mental retardation protein*), se encuentra en la región 5q33, fuertemente ligada al asma. Podría estar relacionado con la diferenciación de linfocitos T, ya que su expresión se encuentra incrementada en los linfocitos de pacientes homocigotos para un determinado haplotipo (132).

► [Cromosoma 6](#)

-*TNF*: La asociación del gen codificante del factor de necrosis tumoral al asma es otra de las que mejor han sido replicadas en los estudios (133).

-*LTA*: Asociado al asma y responsable de la síntesis de la linfotóxina α (LT-A) (134).

-HLA-II: También ha quedado de manifiesto el importante papel que juega la presentación antigénica en las respuesta alérgica dependiente de IgE, mediante estudios que muestran una asociación relevante con los alelos *DR*, *DQ* y *DP* del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (135). El HLA-DRB1, el *TNF* (*TNFA*) y la linfotóxina (*LTA*), en la región 6p21, se han asociado con fenotipos de asma (136).

-HLA-G: HLA-G es una molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad. El gen se encuentra localizado en la región 6p21, ampliamente ligada al asma y fenotipos relacionados; se presenta como un gen de susceptibilidad para el asma y la hiperreactividad bronquial (137).

► [Cromosoma 7](#)

-*GRPA*: El gen *GRPA*, presente en la región 7p15-p14, asociada al asma y la atopia (138), pertenece a un receptor acoplado a proteína G.

► [Cromosoma 10](#)

-*GATA3*: El factor de transcripción *GATA3* actúa en la inducción de los linfocitos T hacia el linaje Th2. De hecho, tiene como inhibidor una citocina promotora de la respuesta Th1, como es la IL-12, que actúa impidiendo su interacción con el ADN a través de una interacción proteína-proteína con el TGFB1. Los polimorfismos presentes en este gen se han asociado al asma y la alergia en varios estudios (139).

► [Cromosoma 11](#)

-*FCER1*: El polimórfico gen que codifica la cadena β del receptor de alta afinidad de la IgE, *Fc ϵ R1* (*FCER1B*), es uno de los genes de susceptibilidad al asma que ha sido más replicado (140) y que tradicionalmente explicaba el ligamiento de la región 11q13 al asma. Estas pequeñas variaciones en su secuencia se podrían traducir en cambios en su expresión y en la consecuente desgranulación de los mastocitos a través de la interacción con la IgE en la atopia (141). Se encontró también una asociación altamente significativa con alelo A rs7927894 en el cromosoma 11q13.5, en el gen *C11orf30* que aparecía aproximadamente el 13 % de los individuos de origen europeo homocigóticos para rs7927894, en los cuales encontraron que el riesgo de padecer dermatitis atópica era 1,47 veces más elevados que en el resto, estando también relacionado este gen con la RA (142) .

-Genes *GST*: Son genes de las Glutation-S-transferasas (*GSTP1* y *GSTM1*), cuyos polimorfismos se han asociado con el asma y la atopia (143).

-*IL-18*: en la región 11q22, se observó que aumentaba la producción de IL-4/IL-13 con lo cual se induce la producción de IgE, que está directamente asociada con la patogenia de enfermedades atópicas. Por lo tanto se demostró que existe u papel directo de *IL 18* en la patogenia de la atopia con la presencia de 8 SNP comunes en las regiones promotoras de *IL 18* (144).

► [Cromosoma 12](#)

-*STAT6*: La proteína *STAT6* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) pertenece a la vía de transmisión de señales de la IL-4 en la activación hacia la

respuesta Th2. Los polimorfismos de *STAT6* y de la óxido nítrico sintasa 1 (*NOS1*) también se han asociado con el asma y la atopía (145).

▶ [Cromosoma 13](#)

-*PHF11*: Fue identificado mediante un estudio de ligamiento en el que se descubrió un nuevo QTL tras identificar una asociación de niveles elevados de IgE con un microsatélite de la región 13q14 hasta ese momento irrelevante. Algunas de sus variantes génicas se han asociado con la gravedad del asma (146).

▶ [Cromosoma 14](#)

-*PTGDR*: Gen del receptor de prostaglandinas D2 (DP), expresado en mastocitos y eosinófilos. Surgió a partir de la asociación de un marcador de ADN muy cercano a él que presentó ligamiento con niveles elevados de IgE en suero (147).

▶ [Cromosoma 17](#)

-*SCYA11*: polimorfismos en la región promotora del gen de la eotaxina, principal quimioatrayente de los eosinófilos, se han asociado con asma, eosinofilia, función pulmonar y niveles de IgE total (145, 148).

▶ [Cromosoma 19](#)

-*TGFB1*: El gen codificante de la citocina inmunorreguladora *TGFB1* (*Transforming Growth Factor-B*), al igual que el de la IL-10, ha sido asociado con el asma (117).

-*MRPL4* y *TNFA* en la región 19p13.2 se han asociado con el desarrollo de RA (149).

▶ [Cromosoma 20](#)

-*ADAM33*: El gen de la metaloproteasa *ADAM33* fue identificado como responsable de la señal de ligamiento a partir del análisis posicional de una región en el brazo corto del cromosoma 20 que presentó un ligamiento significativo con el asma y la hiperreactividad bronquial (150).

En la RA una serie de estudios de asociación familiar y de ligamiento han identificado un número de polimorfismos y regiones cromosómicas potencialmente asociadas con la enfermedad. Hasta el 2010 la mayoría de los estudios genéticos en la RA eran estudios de genes candidatos y en pocas excepciones eran casos de análisis de ligamiento clásico.

En 2011 se publicó un estudio de asociación en genoma completo (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Study*) (151). Los avances tecnológicos en la secuenciación masiva y en el empleo de micromatrices (*microchips*) han determinado nuevas estrategias en los estudios de asociación de polimorfismos con la susceptibilidad de padecer una determinada enfermedad compleja o alguno de sus síntomas. En este tipo de análisis de asociación se considera fundamental la caracterización y muestreo de los individuos participantes, especialmente en el caso de los controles. Otra de las consideraciones que es necesario tener en cuenta es la necesidad de un tamaño muestral grande con el fin de conseguir un poder estadístico aceptable que permita identificar los alelos de interés. Sin olvidar que la enorme cantidad de datos generados hace imprescindibles conocimientos y herramientas bioinformáticas estadísticas avanzadas para su procesamiento que permitan distinguir resultados verdaderamente positivos, y eviten los falsos positivos. El hecho de trabajar con muestras tan grandes puede afectar a la buena caracterización de los individuos y, del mismo modo, aportar una considerable heterogeneidad del componente ambiental, especialmente relevante en el desarrollo de enfermedades complejas (152). El desarrollo de este tipo de estudios ha supuesto una revolución en el conocimiento general de las enfermedades alérgicas; sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no han sido tan relevantes como se esperaba a priori.

Un metanálisis Ramasamy y cols (42), estudiaron el GWAS en pacientes con RA, las asociaciones de la lista actual de SNP implicados está claramente dominada por los resultados de los primeros estudios de genes candidatos. En total, esto dio como resultado a más de 100 polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en los que se observó una relación con la RA. Sin embargo, las investigaciones que han dado lugar a esta lista de SNP son muy

heterogéneas en cuanto a tamaños muestrales, tipo de las poblaciones de estudio y definiciones de fenotipo, pudiendo representar las asociaciones falsos positivos o pudiendo tener menor efecto en relación con el tamaño muestral de lo realmente registrado (153).

Se han realizado varios estudios del (GWAS) en enfermedades alérgicas (tabla V).

Tabla V. Estudios de asociación en genoma completo (GWAS) en las enfermedades alérgicas (154).

Cromosoma	Gen	Función	Fenotipo asociado
1q23	<i>FCERIA</i>	Subunidad alfa del receptor de alta afinidad para la IgE	IgE total
2q12	<i>ILR1</i>	Implicado en la función de los linfocitos T colaboradores	Eosinofilia Asma
5q12	<i>PDE4D</i>	Regulación de la contractilidad del músculo liso de las vías respiratorias	Asma infantil
5q22	<i>WDR36</i>	Implicado en el ciclo celular, la transmisión de señales, la regulación génica y la apoptosis	Eosinofilia Asma
5q23	<i>RAD50</i>	Implicado en la reparación y división celulares	IgE total Eccema atópico Asma
6q23	<i>MYB</i>	Supervivencia, proliferación y diferenciación de células madre hematopoyéticas	Eosinofilia Asma
9q21	<i>TLE4</i>	Diferenciación de los linfocitos B	Asma infantil
9q24	<i>IL33</i>	Activación de mastocitos y linfocitos Th2	Eosinofilia Asma
10q22	<i>CTNNA3</i>	Adhesión intercelular mediada por la cadherina E	Asma inducida por isocianatos
11q13	<i>EMSY</i>	Remodelación de la cromatina	Dermatitis atópica
17q12	<i>ORMDL3</i>	Desconocida	Asma de inicio en la infancia
17q21	<i>GSDMB</i>	Posiblemente implicada en la transmisión de señales de TGF-beta	Asma infantil

Bonnelykke y cols (155) realizaron un estudio a gran escala, de asociación en genoma completo (GWAS) en pacientes con sensibilización alérgica y seguimiento de los SNP en *TLR6*, *C11orf30*, *STAT6*, *SLC25A46*, *HLA-DQB1*, *IL1RL1*, *LPP*, *MYC*, *IL2* y *HLA-B*. Todos los SNP se asociaron con síntomas alérgicos. Se estimó que las variantes de riesgo asociadas a estos diez loci

representaban al menos el 25% de los que tenían sensibilización alérgica y RA (figura 8).

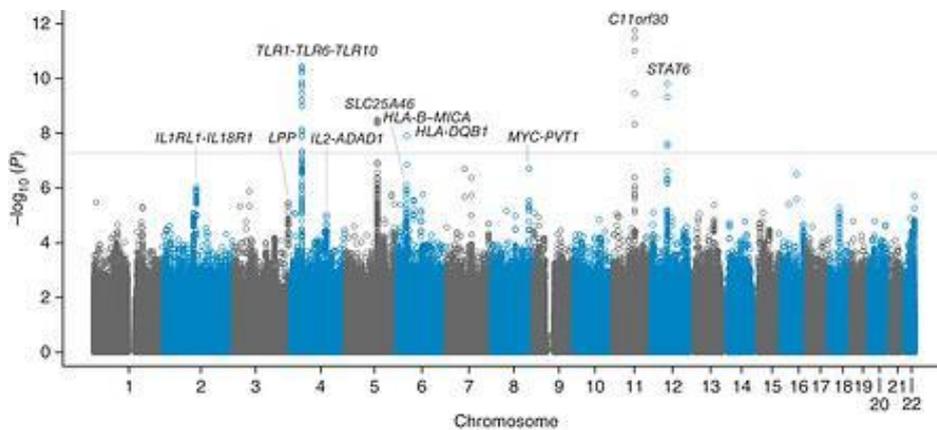


Figura 8. Gráfico de tipo Manhattan realizado en el metanálisis del GWAS. En la línea horizontal está indicado el umbral de la significación de todo el genoma ($P < 5 \times 10^{-8}$).

Nilsson y cols (156) realizaron tres GWAS para evaluar la asociación de la RA con la sensibilización alérgica. Los tres estudios identificaron un conjunto de 37 loci juntos, pero demostraron baja concordancia y reproducibilidad entre los tres estudios, ya que, por separado, los estudios presentaban mejores valores, que cuando se realizó la comparación entre estos. En los estudios se investigó la reproducibilidad de las asociaciones de SNP detectadas en una cohorte longitudinal ampliamente caracterizada en 2.153 niños de entre 8 y 16 años de edad. Se eligieron las frecuencias alélicas de 39 SNP, que se investigaron por asociación con los fenotipos alérgicos exactos de los estudios del GWAS. Las pruebas de asociación de los 39 SNP identificaron 12 SNP con valores significativamente asociados a la sensibilización alérgica. Los autores concluyeron que es probable que el gen *TLR6-TLR1* desempeñe un papel importante en el desarrollo de la enfermedad alérgica. La asociación entre la variación genética en los loci *SSTR1-MIPOL1* y *TSLP-SLC25A46* y una edad de inicio temprana resultó significativa para el desarrollo de la RA en estos pacientes.

Tomita y cols (157) en una población japonesa encontraron una asociación significativa con la RA de un total de cinco polimorfismos descritos en pacientes con asma en un locus del cromosoma 17q21: rs9303277, rs7216389,

rs7224129, rs3744246 y rs4794820. El nivel de expresión de la transcripción en el gen *ORMDL3* se correlacionó significativamente con el genotipo de rs12150079, rs7216389, rs3744246 y rs4794820 con una $p < 0,01$ y se observó una gran expresión de mRNA de este mismo gen en el epitelio nasal. Los autores concluyeron que habían identificado las variantes genéticas en el locus de susceptibilidad 17q21 en pacientes con asma, que se asociaron significativamente con RA, con lo cual el cromosoma 17q21 podría ser uno de los marcadores de susceptibilidad común para el asma y RA en las poblaciones japonesas.

Li y cols (158) realizaron una revisión sobre RA y los estudios de GWAS en la que llegaron a la conclusión de que había rasgos de enfermedades alérgicas tanto en del asma, como de la dermatitis atópica y la RA, que comparten un gran número de loci de susceptibilidad genética, de los cuales IL33/IL1RL1, IL-13-RAD50 y C11orf30/LRRC32 parecen ser importantes para más de dos fenotipos alérgicos. En estos estudios quedan reflejados los fenotipos de RA subyacentes dentro de la gran heterogeneidad genética (Tabla VI).

Tabla VI. Los loci de susceptibilidad de desarrollar RA identificados con GWAS

Cromosomas	Gen	Posible mecanismo alérgico	Referencia
19p13	<i>MRPL4</i>	Implicado en los procesos de inflamatorios y de adhesión	(151)
10q24	<i>BCAP</i>	Implicado en la activación, desarrollo y maduración de las células B	(151)
11q13	<i>C11orf30/LRRC32</i>	Funcionan en la barrera epitelial, regulación células T y tolerancia inmune	(42)
7p21	<i>FERD3L</i>	Desconocido	(159)

Muchos autores han investigado o investigan las interacciones entre genotipo y exposición ambiental (160). Estos modelos consideran que los genotipos específicos pueden dar lugar a fenotipos específicos sólo en ciertos ambientes o exposiciones ambientales. Se han publicado varios ejemplos de interacciones genes-ambiente en cuanto al riesgo de asma y atopia (137).

En la poliposis nasal, también se ha observado una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo -444A del gen *LTCS4* con la poliposis y la atopia y con la poliposis y el asma (161). Los autores encuentran, además, una asociación significativa de la repetición (CCTTT) en el gen *NOS2A*, cuando la poliposis se asocia al asma, o con la triada del ASA. Por otro lado, el diplotipo CCCT/CCCC (-613CC, -549CC, -441CC y -197TC) del gen *PTGDR* se observó con mayor frecuencia en los pacientes con poliposis. Con estos resultados, los autores sugieren que la influencia genética puede estar desempeñando un papel más relevante en el desarrollo de las características clínicas asociadas a la poliposis nasal, asociada con los polimorfismos específicos solamente cuando se presentaba con fenotipos asociados, que cuando aparece solamente la poliposis nasal simple (161). En otro estudio genético se buscó la asociación de la poliposis nasal y el desarrollo y gravedad del asma (162) con en el gen *CD14*; los autores encontraron que, en el polimorfismo C-159T de este gen, los pacientes con genotipo CC en la posición -159 de la región promotora de *CD14*, presentaban un mayor riesgo de desarrollar asma.

En estudios realizados en pacientes con dermatitis atópica, en la infancia que se caracteriza por alteraciones típicas en el fenotipo, entre ellas el paso de afectación cutánea a alergia respiratoria, que se produce habitualmente alrededor de los 3 años de edad, Kayserova y cols (163), seleccionaron a 94 pacientes con dermatitis atópica grave y 103 controles, investigaron la asociación entre los polimorfismos genéticos de 13 genes receptores de las citocinas y las manifestaciones clínicas. Concluyendo que los genotipos de 7 polimorfismos (-1098G/T y -590C/T en *IL-4*, -174C/G y nt565A/G en *IL-6* y -1082A/G, -819C/T y -592A/C en *IL-10*), mostraron una asociación significativa con el desarrollo de la dermatitis atópica; además, también observaron una asociación estadísticamente significativa entre los haplotipos AA de *TNF- α* y GC en *IL4R α* con el desarrollo de la enfermedad. Confirmando la existencia de un cambio clínico en el fenotipo alérgico durante los tres primeros años de vida, con la asociación de los polimorfismos en los genes *IL-4*, *IL-6* e *IL-10* en el desarrollo de la Dermatitis Atópica.

En un estudio realizado en 89 niños iraníes con dermatitis atópica, Gharagozlou y cols (164), evaluaron la frecuencia de alelos, genotipos y

haplotipos de los polimorfismos del gen *IL6* en la posición 174 y nt565, en comparación con 139 controles, observando que existía un aumento significativo del alelo G y del haplotipo GG en la posición (-174, nt565) del gen *IL6* en los pacientes con dermatitis atópica.

1.6. ASPECTOS GENÉTICOS DE LA RINITIS ALÉRGICA

Es bien sabido que la rinitis alérgica presenta una importante base genética, al igual que otras enfermedades atópicas, como el asma o la dermatitis atópica. Sin embargo, las investigaciones genéticas son complicadas en la RA por una serie de motivos: por un lado, la enfermedad es el efecto de una serie de genes considerados individualmente; por otro, existen interacciones entre esos genes que influyen el resultado final; por último, existen interacciones entre los posibles genes causantes de la enfermedad y una serie de factores ambientales aún no bien determinados (165). La identificación de posibles genes causantes de una enfermedad puede realizarse de diversas maneras (166). Por un lado, la técnica del gen candidato se basa en seleccionar un gen a partir de datos previamente conocidos sobre su función (gen candidato funcional). A continuación se efectúan los correspondientes estudios de asociación en pacientes y controles, cohortes o familias para, finalmente, desvelar el mecanismo de asociación mediante estudios de fenotipo-genotipo y estudios funcionales (165). En los estudios de clonación posicional inicialmente se realizan estudios de ligamiento que permiten determinar una región concreta del genoma que se asocia con una determinada enfermedad. En ese momento, todos los genes de la región en la que se ha detectado un ligamiento se consideran genes candidatos posicionales, realizándose, a continuación, los correspondientes estudios de asociación cuya finalidad es la identificación del gen asociado y las variaciones que contribuyen al riesgo de enfermedad. Finalmente, se estudian los mecanismos de asociación como en el caso anterior. Las nuevas técnicas de estudio genético, que permiten un avance cada vez más rápido del conocimiento, comprenden la PCR a tiempo real, los actuales métodos de secuenciación, la pirosecuenciación, la DHPLC, el SNP-LEX, las micromatrices (microarrays) o la espectrometría de masas (165).

Un aspecto muy importante de los estudios genéticos es la replicación de los mismos por distintos investigadores y en distintas poblaciones. Pueden darse diversas posibilidades: ausencia de confirmación de la asociación en estudios posteriores, replicación del estudio con un fenotipo diferente, y replicación con un polimorfismo distinto o con diferentes alelos de la misma variante. Además, se añaden los factores étnicos y las posibles interacciones entre un genotipo concreto y las exposiciones ambientales individuales (116). Así, puede suceder que un genotipo dé lugar a un fenotipo concreto únicamente ante una determinada exposición o que un genotipo concreto dé lugar a distintos fenotipos según la exposición ambiental (165).

Bunyavanich y cols (159) realizaron un análisis genómico integrado de la RA mediante GWAS, en 5.633 pacientes de América del Norte étnicamente diferentes. Estudiaron la expresión génica de la enfermedad, recogiendo tejido (de los linfocitos CD4+ de sangre periférica) de los sujetos que habían sido genotipados e integraron los datos de expresión del GWAS. Los resultados del GWAS mostraron una especificidad en cuanto a las asociaciones detectadas en función del origen étnico (tabla VII). Así se detectó una asociación de 4 genes en el grupo de latinos y de 1 único gen asociado con la RA en todas las etnias estudiadas. En cuanto a la comparación de los resultados del GWAS con los resultados de expresión se observó que entre los 22 genes para los que se detectó asociación en el GWAS había un grupo de 6 genes que presentaban también diferencias en la expresión génica entre los pacientes y los controles. El análisis de las rutas biológicas llevadas a cabo por estos genes mostró que este módulo codificaba principalmente para funciones mitocondriales.

Tabla VII. Frecuencias alélicas identificadas en estudios GWAS en distintos grupos étnicos en pacientes con RA(159).

Genes	SNP	Localización	Alelo*	Europeos America- nos	Latinos	Africanos America- nos
<i>PRDM16</i>	rs868688	1p36,32	T	0,52	0,43	0,39
<i>BSND</i>	rs2149039	1p32,3	A	0,79	0,68	0,78
<i>LINC00486</i>	rs11680788	2p22,3	C	0,95	0,90	0,97
<i>DLG1</i>	rs6583203	3q29	C	0,34	0,33	0,38
<i>SYCP2L</i>	rs4713039	6p24,2	A	0,81	0,81	0,94
<i>FAM20C</i>	rs6583337	7p22,3	A	0,38	0,28	0,32
<i>FERD3L</i>	rs7780001	7p21,1	A	0,86	0,78	0,78
<i>NKAIN3</i>	rs10156309	8q12,3	C	0,96	0,99	0,99
<i>TUSC1</i>	rs10124907	9p21,2	A	0,54	0,46	0,43
<i>OSTF1</i>	rs1332366	9q21,13	A	0,14	0,08	0,21
<i>ABCA1</i>	rs2472448	9q31,1	C	0,88	0,89	0,90
<i>AKR1E2</i>	rs17133587	10p15,1	A	0,21	0,26	0,06
<i>SVIP</i>	rs11027293	11p14,3	G	0,02	0,04	0,01
<i>CHRD2</i>	rs1893361	11q13,4	A	0,18	0,17	0,22
<i>DYRK4</i>	rs2884670	12p13,32	A	0,32	0,37	0,59
<i>ST8SIA2</i>	rs1352323	15q26,1	A	0,24	0,40	0,34
<i>RBFOX1</i>	rs12597084	16p13,3	A	0,47	0,39	0,10
<i>FTO</i>	rs7187423	16q12,2	A	0,05	0,04	0,21
<i>PMP22</i>	rs2061	17p12	A	0,07	0,10	0,21
<i>LAMA3</i>	rs7237244	18q11,2	C	0,98	0,89	0,99
<i>ZNF776</i>	rs12973620	19q13,43	C	0,18	0,25	0,12
<i>RBX1</i>	rs7287939	22q13,2	C	0,07	0,06	0,02

*Referencia de alelo asignada al alelo codificado, en el mapa realizado en el consenso de haplotipos.

1.6.1. POLIMORFISMOS

Las variaciones en la secuencia del ADN que se observan en más del 1% de la población se denominan polimorfismos y, entre ellos, los que se producen por un cambio en una única base se denominan polimorfismos de un único nucleótido (SNP). Parece admitirse que la inmensa mayoría de las variaciones genéticas que contribuyen a las enfermedades complejas desde un punto de vista genético probablemente representen la contribución de varios SNP. Dado que existen unos 4.200 millones de pares de bases (pb) en el DNA genómico humano y que hay un SNP por cada 1000 pb, se calcula que existen al menos

cuatro millones de SNP, que contribuyen a todas las características diferenciales individuales (estatura, peso, color de ojos, tipo de piel). Los SNP pueden localizarse en las regiones codificadoras y modificar la estructura de la proteína al cambiar un aminoácido. Estos polimorfismos pueden producirse también en regiones promotoras alterando la expresión de las proteínas (167). En algunos casos, los SNP se consideran silentes al no variar el aminoácido codificado, pero incluso en esos casos podrían producir variaciones del producto proteico por mecanismos aún no del todo conocidos. Para que un SNP contribuya a una enfermedad, debe de cumplir una serie de requisitos: debe de producir una alteración en la función o en la expresión del producto génico; debe de existir un estudio de ligamiento con una potencia adecuada que establezca la asociación con la enfermedad; y el mecanismo debe de ser plausible desde el punto de vista biológico, a ser posible mediante una demostración en modelos experimentales animales (165).

1.6.2. ESTUDIOS EN GENOMA COMPLETO EN LA RINITIS ALÉRGICA

En los últimos años, se ha dedicado una considerable atención al estudio de las bases genéticas de la rinitis alérgica, en especial en poblaciones orientales.

Se han realizado estudios de búsqueda en genoma completo en relación con la transmisión hereditaria de la rinitis alérgica. Así, en 2001, Haagerup y cols (168) realizaron una búsqueda en genoma completo en 33 familias con probando-familiar empleando 446 marcadores microsatélites. Los autores encontraron una región candidato principal en 4q24-q27 (LOD=2,83) y ocho regiones candidatas secundarias en 2q12-q33, 3q13, 4p15-q12, 5q13-q15, 6p24-p23, 12p13, 22q13, y Xp21 (LOD=1,04-1,63).

En otro estudio posterior, Noguchi y cols (132), en un estudio de búsqueda de ligamiento en genoma completo de 48 familias japonesas (188 miembros) con RA por *Dactilys glomerata*, encontraron ligamiento de la misma con las regiones cromosómicas 1p36.2, 4q13.3, y 9q34.3 y débil con 5q33.1. Por su parte, los mismos autores del primer estudio, realizaron un estudio de ligamiento a escala fina en dos pasos con 11 regiones candidatas seleccionadas en los cromosomas 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 9p, 12q, 12qter, 18q y

Xp (168). Analizaron 97 marcadores polimórficos en 424 individuos y evaluaron los datos de 5 fenotipos: asma alérgica, dermatitis atópica, rinitis alérgica e IgE total y específica. Los autores encontraron genes de susceptibilidad en los cromosomas 3q, 4p (MLS = 2.34), 4q y Xp como regiones candidato de los 5 fenotipos.

En el año 2005, Dizier y cols (169) evaluaron 295 familias con al menos un asmático en el estudio francés EGEA, realizando un estudio en genoma completo en el que buscaron regiones con ligamiento potencial con RA o con asma o compartidos por ambas. En el estudio encontraron que el cromosoma 1p31 podía contener un determinante genético común para el asma y la RA, mientras que era más probable que los cromosomas 2q32, 3p24-p14, 9p22 y 9q22-q34 alberguen factores genéticos específicos de la RA.

En 2006 Bu y cols (170) realizaron un análisis de ligamiento en genoma completo en el que evaluaron 250 familias inicialmente empleadas en un estudio de ligamiento de dermatitis atópica. Los autores concluyeron que se reafirmaba el ligamiento de las regiones cromosómicas 3q13, 6p23-p24 y 9q34.3 con la rinoconjuntivitis alérgica, observado en investigaciones previas.

Brasch y cols (171), analizaron 28 marcadores microsatélites en un mapa denso del cromosoma 3q en 236 familias alérgicas con parejas probando-familiar, incluyendo 125 parejas con rinitis, concluyendo que el ligamiento de la región 3q13.31 se asociaba con la rinoconjuntivitis alérgica con una intensidad no antes descrita para ninguna enfermedad alérgica.

Ramassamy y cols realizaron un metanálisis de los estudios de las variantes de asociaciones en genoma (completo GWAS) (42) buscando identificar las asociaciones génicas con la RA y la sensibilización a gramíneas. Para el estudio de la RA utilizaron 4 grandes cohortes europeas de adultos con 3.933 casos y 8.965 controles, y para la sensibilización a gramíneas con 2.315 casos y 10.032 controles. Tres loci del GWAS alcanzaron significación relevante para cualquiera de los fenotipos: la variante rs7775228 de HLA, que regula el HLA-DRB4, se asociaba intensamente con la sensibilización a gramíneas y débilmente con la RA, las variantes en el locus *C11orf30* del cromosoma 11q13.5 que se han asociado anteriormente con el eccema y la dermatitis atópica, también se asociaron intensamente con los dos fenotipos de

sensibilización a gramíneas y RA en rs2155219. La tercera variante significativa de genoma fue rs17513503 que se localiza cerca de la proteína transmembranaria 232 (*TMEM232*) y el miembro 46 de la familia 25 de transportadores de solutos (*SLC25A46*). También estudiaron las variantes dentro de 164 genes, y encontraron variantes en 3 genes con resultados significativos: en el cromosoma 5q22.1, el gen de la linfopoyetina del estroma tímico (*TSLP*), en el cromosoma 4p14, el gen de receptores del tipo toll6 (*TLR6*) y en el cromosoma 7p14.3, el gen de dominio de oligomerización (*NOD1/CARD4*); los autores demostraron una asociación significativa entre estos 3 genes y la RA y la sensibilización a gramíneas.

Tang y cols (172), en un estudio en población china realizado con 363 pacientes con RA y 668 controles, se genotiparon diez SNP(rs11204971 y rs3126085 en el gen de la filagrina *FLG*, rs10067777, rs7707890, rs13360927 y rs13361382 en el cromosoma 5q22.1,rs6010620 en el cromosoma 20q13.3, rs7936562 y rs7124842 en el cromosoma11q13.5 y rs4982958 en14q11.2). De estos diez SNP observaron que el alelo T de rs4982958 en 14q11.2 se asociaba significativamente con la RA, identificaron un nuevo locus de susceptibilidad para la RA, que podría contener genes candidatos que confieren susceptibilidad a la RA y afectan a los fenotipos de la enfermedad.

Xin y cols (149) realizaron un estudio en 414 pacientes chinos con RA y 293 controles, comparando 14 SNP localizados en los cromosomas 19 (19p13.2, 19p13.3), 4 (4q24) y 6 (6p21.3); los autores encontraron una asociación significativa del SNP de *MRPL4* y *TNFA* en el cromosoma 19p13.2 con el desarrollo de RA.

1.6.3. ESTUDIOS DE POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO EN LA RINITIS ALÉRGICA.

En los últimos años se han realizado la mayor parte de los estudios de SNP en la RA. Curiosamente, la mayoría de estos estudios se han realizado en poblaciones orientales, en especial japonesas, coreanas e taiwanesas. A continuación se resumen los principales estudios realizados, agrupados por

genes de función común. Se dedicará particular énfasis a los polimorfismos que se van a desarrollar en el presente trabajo.

1.6.3.1. POLIMORFISMOS EN GENES DE QUIMIOCINAS Y DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

Nakamura y cols (173) analizaron los genes *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, *CCR5*, y *CCXCR1* ubicados en el cromosoma 3p21.3 en una población de pacientes japoneses con polinosis por cedro japonés y controles y encontraron 8 polimorfismos: A111G, Arg127Cys y Arg252Gln en *CCXCR1*; T885C en *CCR1*; Val64Ile y T780C en *CCR2*; T51C en *CCR3* y Arg223Gln en *CCR5*. Realizaron, además, una prueba de desequilibrio de transmisión en 60 niños con polinosis y sus padres y un estudio de asociación con adultos no relacionados (151 pacientes y 157 controles) y encontraron una asociación estadísticamente significativa del SNP 64Ile en *CCR2* y 51C en *CCR3* con la polinosis por cedro. También encontraron que la frecuencia del haplotipo 64Ile/780C/51C fue mayor en los pacientes con polinosis respecto a los controles.

Zhang y cols (174) evaluaron marcadores asociados con RA por *Dactylis glomerata* en el cromosoma 4q mediante 17 marcadores microsatélites, y, posteriormente, buscaron mutaciones en 11 genes. Estudiaron 44 SNP en 48 familias con RA y analizaron distintos haplotipos, así como la expresión tisular de genes. Encontraron un microsatélite asociado con la RA y que un bloque haplotípico que contenía *SDAD1*, *CXCL9*, *CSCL10* y *CXCL11* (4q21) se transmitía de modo preferente a la descendencia.

Kim y cols (175) realizaron un estudio de casos y controles de los alelos -403A y -28G de *RANTES* (17q.11) en 151 pacientes con rinitis alérgica y 278 individuos sanos no atópicos y concluyeron que las frecuencias de ambos alelos de *RANTES* resultaron significativamente superiores en los pacientes con RA que en los controles.

1.6.3.2. POLIMORFISMOS EN GENES DE INTERLEUCINAS Y DE RECEPTORES DE INTERLEUCINAS

Quizás sea con los genes de citocinas o de sus receptores con los que se han realizado más estudios genéticos en pacientes con RA. Así, en una población adulta checa compuesta por 539 pacientes con RA y 312 controles sanos, en la que se evaluaron los polimorfismos -607 C/A, -137G/C y -133 C/G del gen *IL-18* (11q22) no se observó asociación con la RA salvo en el caso del polimorfismo -607 de *IL-18* con la RA por *Alternaria* (176).

En una población adulta coreana, Chae y cols (177), estudiaron 7 exones y los intrones limítrofes de la secuencia de *IL-28RA*, incluyendo la región promotora, e identificaron 18 SNP y 2 sitios de variación. Los autores eligieron 7 SNP (g.-1193 A>C, g.-30 C>T, g.17654 C>T, g.27798 A>G, g.31265 C>T, g.31911 C>T y g.32349 G>A) para el genotipado en una muestra amplia y compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con rinitis alérgica y controles sin ella. En el estudio encontraron que el polimorfismo 32349 G>A de *IL-28RA* puede asociarse con la susceptibilidad a la RA, pero no con los niveles de IgE total.

La vía de interacción *IL-4* e *IL-4R* es una vía importante en la patogenia de las enfermedades atópicas y en el asma. Para ambos genes se han descritos polimorfismos asociados con el asma. En concreto, en el caso del gen de la *IL-4* se ha descrito una asociación del polimorfismo -33C>T de la región promotora con el asma o la atopia Suzuki y cols (178).

Kabesch y cols (179), describen que, la cadena alfa del IL4R forma parte del complejo receptorial de la IL-4 e IL-13, dos citocinas muy importante en las respuestas Th2. El gen *IL4RA* se localiza en el cromosoma 16p, una región que se ha relacionado con el asma y la atopia en distintos estudios.

Se han identificado distintos polimorfismos en la región codificadora del gen. Uno de ellos, 576Q>R, se ha relacionado con un incremento de los niveles de CD23 en los linfocitos B en respuesta a la estimulación con *IL-4*, Suzuki y cols (180).

En el grupo español, Isidoro-García y cols (181) han evaluado el estudio del polimorfismo -33C>T del gen *IL4* y el polimorfismo 576Q>R del gen *IL4RA* en una población de asmáticos españoles sin que encontramos diferencias

estadísticamente significativas entre los pacientes con asma y los controles respecto a la distribución alélica y fenotípica de los dos polimorfismos por separado. No obstante, el alelo T del SNP -33C>T IL4 fue más frecuente en los pacientes con asma persistente. Mediante análisis multivariante pudieron comprobar que los portadores del alelo T presentaban mayor riesgo de padecer asma. Cuando analizaron conjuntamente ambos polimorfismos observaron que los pacientes que presentaban a la vez el alelo T del polimorfismo -33C>TIL4 y el alelo A del polimorfismo 576Q>RIL4RA presentaban un mayor riesgo de asma, lo que era especialmente notable en el caso del asma persistente

En la RA, Kim y cols (182) evalúan el polimorfismo Gln551Arg de la cadena alfa del IL4R y G2044A de la región codificante del gen de *IL-13* y su asociación con la rinitis alérgica en una población coreana. Los autores no observan diferencias en las frecuencias genotípicas ni alélicas de *IL-4RA* entre controles y pacientes. Sin embargo, la frecuencia de alelo 2044A del exón 4 de *IL-13* fue estadísticamente diferente entre controles y pacientes, por lo que los autores concluyen que este último polimorfismo puede conferir susceptibilidad al desarrollo de la RA.

Por otra parte, en el estudio anteriormente citado de Nakamura y cols (183), los autores concluyen que los polimorfismos Ile50Val y Glu375Ala del gen *IL4RA* parecen estar relacionados con la sensibilización al polen de cedro del Japón.

En una población de 160 niños coreanos con rinitis alérgica y 166 controles sanos, Lee y cols (30) encontraron que la frecuencia del polimorfismo IL-18/-607 fue significativamente superior en los pacientes con RA que en los controles

Se han descrito también estudios de polimorfismos en genes de interleucinas que no se relacionan con la RA o que resultan incluso protectores. Así, en un estudio realizado en 95 pacientes con polinosis por cedro del Japón y 95 sujetos normales no se encontraron diferencias en cuanto a la distribución variante Arg110Gln de *IL-13* entre ambas poblaciones, Cheng y cols (184).

Por su parte, Noguchi y cols (185) tampoco encontraron relación de varios polimorfismos de *IL-12B* (5q31.1) con la RA en niños japoneses. Respecto a algún genotipo que se ha demostrado protector, Nieters y cols (186) evaluaron

15 polimorfismos en 13 genes en 322 pacientes con RA y 322 controles concordantes. Encontraron una disminución de la OR para desarrollar RA y sensibilización a aeroalérgenos en los heterocigotos para el polimorfismo -174 G/C de *IL-6*. Los homocigotos para el alelo G de *IL-2* -330 T/G presentaban mayor riesgo de RA.

En pacientes asiáticos se asoció la *IL-13* con el polimorfismo rs20541 con aumento de la susceptibilidad para desarrollar la RA (187).

En un metanálisis (188) en el que se evaluaron los factores de riesgo genético de desarrollar RA, se observó que existía un aumento de riesgo de desarrollar RA con el SNP rs20541 de *IL13*, en los pacientes asiáticos, aunque no así en los pacientes caucásicos.

En un estudio español se han encontrado relación de la *IL13* e *IL4RA* con el desarrollo del asma en pacientes alérgicos al polen de olivo (189).

En pacientes chinos se ha encontrado que el polimorfismo C-590T del gen de la *IL4* con un aumento de la susceptibilidad a desarrollar RA persistente por ácaros, aunque no se observó una asociación significativa con el resto de polimorfismos analizados de los genes *IL13* e *IL4RA* (190).

En un estudio japonés, Matsumoto y cols (191) estudiaron 3 genes (*ARID4B*, *SERPINE2*, e *IL17RB*) en pacientes con RA estacional por cedro del Japón, observando su comportamiento, estudiaron a 32 pacientes de estas características, frente a 25 controles, durante los meses de síntomas, observaron un aumento significativo en la expresión génica de *IL17RB* en los pacientes con RA estacional en los meses de polinización que no aparecían en los controles, el patrón de expresión génica diferencial de *IL17RB* en pacientes con RA estacional durante la exposición a los alérgenos puede estar relacionado con el desarrollo de la RA.

En un estudio realizado en una población pakistaní, Micheal y cols (192), investigaron varios polimorfismos del gen *IL-4*, concluyendo que los SNP C-589T, rs2243250 y T+2979G, rs2227284 presentaban una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de RA y asma en esta población.

1.6.3.3. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ACE) Y DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO

Respecto a estos genes existen estudios contradictorios. Así, Kim y cols (175) analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de inserciones (I) y deleciones (D) del gen *ACE* (17q23) en 137 pacientes con RA, y del polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno en 186 pacientes con RA y de ambos en 219 controles sanos. Los autores no encontraron diferencias en el genotipo DD del gen *ACE* entre controles y pacientes. Tampoco en el genotipo TT del gen de la angiotensina.

Tampoco Ku y cols (193) encontraron diferencia en las frecuencias genotípicas de los genotipos DD y no DD y II y no II al evaluar una población coreana compuesta por 75 niños con rinitis alérgica y 66 niños sanos.

Sin embargo, Lue y cols (194), en un estudio en el que evalúan 106 niños con RA sin asma y 105 niños con RA y asma, concordantes en sexo y edad, y utilizando 102 niños sanos como controles, encontraron que las frecuencias del genotipo DD fueron significativamente superiores en el grupo de niños con RA y asma concomitante que en el grupo de niños con RA pero sin asma. Los autores concluyeron que este gen podría desempeñar un papel en el desarrollo del fenotipo asmático en pacientes con RA.

1.6.3.4. POLIMORFISMOS EN GENES DE LOS EOSINÓFILOS

En un estudio realizado en una población coreana, Chae y cols (195) encontraron que el polimorfismo +2497T>G del gen eotaxina-3 (7q11.22) puede asociarse con susceptibilidad a padecer rinitis alérgica en una población coreana.

Por su parte, Nakamura y cols (183) encontraron que los polimorfismos 202Arg y 358Leu del gen *EPO* (17q23) se asociaban con la polinosis por cedro del Japón en una población infantil japonesa. En otro estudio, estos mismos autores (173), encontraron que el polimorfismo Pro358Leu de *EPO* se asoció con polinosis por cedro del Japón en una población japonesa adulta. Por su parte, los polimorfismos Ile50 o Glu375 del gen *IL4RA* (16p12) podrían

asociarse con polinosis por cedro del Japón en caso de una exposición elevada al mismo.

En una población china se estudiaron 5 polimorfismos del gen *EPO* (-1710T/C, -1710T/C, 2649T/C, 3097A/G y 3979A/G), si bien los autores solamente encontraron una susceptibilidad para el desarrollo de RA en el SNP 3979A/G del gen *EPO* (196).

1.6.3.5. POLIMORFISMOS EN OTROS GENES

Existen estudios que analizan diversos polimorfismos en distintos genes. Así, se ha asociado un polimorfismo en el gen *CD14*, Kang y cols (197) con la gravedad de la RA, o diversos polimorfismos de *ADAM33* con la RA por cedro del Japón Cheng y cols (198), así como también se han asociado con la rinitis alérgica determinados polimorfismos y haplotipos de *FOXP1*, Li y cols(199) o del gen del gen *FcεRI*, Gulen y cols(200).

EL gen *TIM-1* pertenece a la familia de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T, que tienen estructuras comunes: como un dominio de inmunoglobulinas, un dominio de mucina, un péptido señal, una región transmembranaria y una cola intracelular. Los genes *TIM* están situados en el cromosoma 5, y se han relacionado con enfermedades alérgicas.

Mou y cols (201), estudiaron a 185 pacientes chinos con RA sensibilizados a ácaros del polvo, comparados con 178 controles y analizaron los SNP en la región promotora de *TIM-1* (-416G>C y -145G>A), también evaluaron la relación entre los SNP y los niveles de IgE sérica en esta población. Observando que los SNP-416G>C y -145G>A, se asociaron a los pacientes con RA por ácaros y al nivel sérico de IgE específica a ácaros del polvo y no en el resto, indicando que estos SNP presentan relación con la susceptibilidad para desarrollar RA.

En otro estudio realizado en población china Wei y cols (149) estudiaron 14 SNP en los genes (*ICAM-1*, *NF-kB*, *TNF-α* y *MRPL4*) en 414 pacientes con RA y en 293 controles, encontrando que en *TNF-α* SNPrs1799964 y *MRPL4* SNPrs11668618 se asociaban con un mayor riesgo de desarrollar RA comparado con el grupo control, en esta población china.

En un estudio de Andiappan y cols (166), los autores investigaron un total de 192 SNP de 21 genes candidatos (*IL4*, *IL13*, *CD14*, *MS4A2*, *FCERB1*, *IL4R*, *IL4RA*, *ADAM33*, *GSTM1*, *IL10*, *CTLA4*, *SPINK5*, *LTC4S*, *NPSR1 (GPR154)*, *NOD1*, *CARD4*, *SCGB1A1*, *CC16*, *GSTP1*, *STAT6*, *NOS1*, *CCL5*, *TBXA2R*, *ADRB2* y *TGFB1*). Los autores llevaron a cabo un estudio de asociación en dos poblaciones diferentes: seleccionaron una población sueca con 246 pacientes con RA y 431 controles y otra china con 456 casos con RA y 486 controles. Posteriormente, analizaron todos los SNP para ver la asociación con la RA y el asma y su influencia en la sensibilización alérgica a los alérgenos comunes. Observaron una gran variación genética en la mayoría de los genes que se asociaban al asma y no se asociaron con la RA en estas poblaciones, con lo cual concluyeron que el asma y la RA podrían tener menos en común de lo anteriormente se sospechaba. Sin embargo, se observó que los SNP de los genes *NPSR1* (rs324981) y *CTLA4* presentaban asociaciones comunes en los pacientes que padecían de asma y RA en estas poblaciones.

En una población de pacientes chinos con RA por sensibilización a ácaros, Yuan y cols (202) estudiaron 66 pacientes y 198 controles, observaron que las variantes de larga duración del intrón 20 AAT estaban ligadas a la disminución en las vías respiratorias del NO (óxido nítrico), esta producción es debida probablemente a la relativamente pobre actividad de la NOS1(óxido nítrico sintasa) detectada hasta ahora en pacientes con asma, estudiaron el riesgo de desarrollar RA en esta población. Concluyeron que el polimorfismo AAT en el intron 20 del gen *NOS1* se asociaba con un riesgo incrementado de desarrollar RA.

En la población de Jordania, Zihlif y cols (203) estudiaron 8 polimorfismos (T1A/G, T2G/A, T+1G/A,V4C/G, S1G/A, S2C/G, F+1T/C,Q-1G/A) del gen *ADAM33*, localizado en el cromosoma 20p13, y que ha sido ampliamente estudiado en el asma. Los autores observaron que los SNP de este gen *ADAM33*, en esta población se asociaban con incremento del riesgo de desarrollar RA, igual que en la población japonesa y china, donde se ha descrito el papel de este gen en el desarrollo de asma y RA (204).

En otro estudio realizado en Irán por Nasiri y cols (205), en el que evaluaron las asociaciones de los polimorfismos de los genes que regulan el factor de

necrosis tumoral (TNF α) y la familia de la interleucina IL-1, como citocinas proinflamatorias y su papel en el desarrollo de la RA, los autores estudiaron 98 pacientes con RA, comparados con 140 controles. Evaluaron los SNPs del gen *TNF- α* (rs1800629 y rs361525), *IL1* (rs2234650 en *IL1 β* (rs16944 y rs1143634) *IL1 α* (rs2234650) y *IL1RA* (rs315952). Observaron que los pacientes homocigotos para el alelo T de rs16944 en *IL1 β* , mostraban un riesgo 8,1 veces mayor de tener RA que los que presentaron el alelo C. Los SNP del *TNF- α* (rs1800629 y rs361525) mostraron una relación significativa con el desarrollo de la RA, concluyendo que estas variantes genéticas de *TNF- α* e *IL1*, se asociaban con el riesgo de desarrollar la RA.

1.6.4. POLIMORFISMOS QUE SE VAN A EVALUAR EN EL PRESENTE ESTUDIO

A continuación se describen con mayor profundidad los polimorfismos que se van a evaluar en el presente estudio.

1.6.4.1. POLIMORFISMOS EN GENES DE LA VÍA DE LOS LEUCOTRIENOS

Los leucotrienos son importantes mediadores implicados en la fisiopatología del asma y de la RA. Los fármacos capaces de modularlos se han utilizado para el tratamiento del asma y, recientemente, se ha aprobado su uso en el tratamiento de la RA. La LTC₄ sintasa es la enzima más importante de la vía de síntesis de los leucotrienos y el polimorfismo A-444C del gen *LTC4* se ha implicado en la genética del asma. Así, por ejemplo, en un estudio reciente realizado en Australia Kedda y cols (206) analizaron el polimorfismo A-444C en una población de asmáticos y concluyeron que este polimorfismo presentaba una asociación débil con el fenotipo de asma, pero no se asociaba con la gravedad de la enfermedad ni con la intolerancia al AAS.

En el grupo, Isidoro-García y cols (207) han evaluado este polimorfismo en una población española de 123 pacientes asmáticos y 103 controles sin asma sin encontrar ninguna asociación estadísticamente significativa con el fenotipo de asma, si bien detectan una tendencia a una mayor presencia del alelo C en los pacientes con asma, tendencia que era más observable en los pacientes con

asma grave. Al igual que los autores australianos, tampoco encuentran asociación con el asma inducida por AAS.

En la RA, son escasos los estudios realizados. Eskandari y cols (208) realizan un estudio prospectivo, aleatorizado, de casos y controles, que incluía 85 pacientes con RA y 95 individuos sanos a los que se les evaluaba el polimorfismo A-444C del gen de la *LTC4S*. Los autores encuentran que las frecuencias genotípicas AC y CC fueron significativamente más elevadas en el grupo de pacientes con RA. El polimorfismo AC de dicho gen conllevaba un aumento del riesgo de desarrollar RA.

Por otra parte, Zhang y cols (174) identifican 4 polimorfismos (c.-618-434T/C, c.-618-275C/A, c.-618-136G/A, y 927C/T) en el gen *CYSLTR1* Xq21.1; si bien mediante la prueba del desequilibrio de transmisión encontraron que ninguno de ellos se asoció con el desarrollo de asma ni rinitis. No obstante, los autores concluyen que aunque estos polimorfismos puedan no estar involucrados en la rinitis alérgica, pueden influir en las respuestas individuales a los antileucotrienos en individuos con enfermedades atópicas.

Por otro lado, los leucotrienos cisteinílicos ejercen su acción a través de los receptores *CYSLTR1* y *CYSTR2*. La activación de *CYSLTR1* por el *LTC-4* produce contracción y proliferación del músculo liso y edema y migración de los eosinófilos al pulmón. El gen *CYSLTR1* se ha clonado y localizado en Xq13-21. Recientemente se ha descrito un polimorfismo (927T>C) en este gen. En el grupo español de Arriba y cols han evaluado este polimorfismo en una población de niños con asma y atopía (209) encontrando una frecuencia significativamente mayor del polimorfismo 927T>C en la población de niños varones con dermatitis atópica en comparación con los niños varones sin dermatitis atópica y los controles. Aunque este es un SNP silente, podría afectar la transcripción o estar en ligamiento con otro polimorfismo aún no identificado y así predisponer a los niños varones al asma y a la dermatitis atópica.

1.6.4.2. REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL RECEPTOR DE PROSTANOIDES (PTGDR)

La prostaglandina D2 ha sido considerada un marcador de activación de los mastocitos en el asma. Ejerce su acción a través del receptor prostanoide D (*PTGDR*). El gen que codifica este receptor se localiza en el cromosoma 14q22 y, recientemente, se ha asociado con el asma y la atopia por su ubicación y por modelos de estudio murinos. También recientemente se ha descrito la asociación entre distintos polimorfismos de la región promotora de *PTGDR* y el asma (210).

En el grupo español de Sanz y cols (211, 212) evaluaron los polimorfismos 549T>C, 441C>T y 197T>C de este gen en una población de asmáticos encontrando que el polimorfismo -197T>C se asociaba de modo estadísticamente significativos con el asma. El análisis multivariante corregido por edad y sexo confirmó esta asociación con un riesgo incrementado de asma. En el análisis de diplotipos, se observó diferencia entre los pacientes y los controles, en especial con el diplotipo CCT CCC (-549CC, -441CC y -197TC). Al comparar este diplotipo con todos los otros diplotipos se observó una asociación con el asma. Este diplotipo también se asoció con el asma alérgica (213). Curiosamente, todos los pacientes que presentaban este diplotipo tenían asma y ninguno de los controles presentaba este diplotipo. Además, este diplotipo resulta ser la combinación de los dos haplotipos transcripcionales de mayor eficiencia. No hemos encontrado estudios de este gen en la RA.

Pescador y cols (161), en un estudio realizado en 241 pacientes y 245 controles, observaron una asociación estadísticamente significativa del diplotipo CCCT/CCCC (-613CC, -549CC, -441CC y -197TC) del gen *PTGDR* en pacientes con poliposis, poliposis con asma y con triada de la aspirina en relación a los controles.

Isidoro-García y cols (212), realizaron un estudio en el que incluyeron 637 pacientes asmáticos cuyo objetivo fue desarrollar un enfoque integral, en el cual se realizó el estudio genético, epigenético y el análisis de la expresión del gen del receptor de prostaglandina D2 (*PTGDR*) en pacientes asmáticos. Realizaron una caracterización de las variantes genéticas y establecieron las

combinaciones del haplotipo y diplotipo. Realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA) con variantes diferentes del promotor, un análisis epigenético de *PTGDR* y se determinó la expresión génica por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. Los SNP, - 197T > C y -613C > T se asociaron significativamente con el asma alérgica y con la alergia al polen y a los ácaros, respectivamente. Además, varias combinaciones del haplotipo y diplotipo se asociaron con diferentes fenotipos de alergia y asma. La presencia del SNP -613C > T determinó las variaciones en los EMSA. Además, se observaron diferencias consistentes en los patrones de metilación y expresión entre pacientes asmáticos y controles determinando que había un aumento de la expresión génica *PTGDR* en los pacientes asmáticos.

Lee y cols (214) realizaron un metanálisis sobre las asociaciones entre los SNPs -549 C/T, -441 C/T y -197C/T en pacientes con asma. En este metanálisis se incluyeron un total de 13 estudios comparativos independientes de 9 artículos 7.155 pacientes con asma y 7.285 sujetos control. Los autores encontraron una asociación entre el asma y el SNP *PTGDR* -549 C/T. En el metanálisis se encontró una asociación entre el asma y el alelo C de *PTGDR*-549 en los europeos. Además cuando, estratificaron a los sujetos por edad, los autores encontraron una asociación significativa entre el alelo -549 C de *PTGDR* y el asma en adultos, pero ninguna asociación en niños. No se encontró asociación entre el asma y -441 C/T o -197 C/T *PTGDR* y el metanálisis estratificado por edad y etnia tampoco reveló ninguna asociación entre el asma y estos polimorfismos. Además, no se encontró asociación entre el asma y haplotipos los CCC y TCT de *PTGDR* y el metanálisis estratificado por edad y etnia no reveló ninguna asociación entre el asma y los haplotipos CCC y TCT *PTGDR*. Este metanálisis demostró que el SNP -549 C/T de *PTGDR* confiere susceptibilidad para el desarrollo de asma en el grupo de estudio europeo y en los pacientes adultos.



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

HIPOTESIS

2. HIPOTESIS

- La RA es un problema global de salud que afecta entre el 5 y el 50 % de la población y su prevalencia va en aumento. Es bien sabido que la RA tiene una importante base genética a la que se añaden los factores ambientales. Se han realizado diversos estudios de asociación de distintos genes con el riesgo de desarrollar rinitis alérgica.
- Por su parte, *PTGDR*, *LTC4S* y *CYSLTR1* participan en la patogenia de la rinitis alérgica mediante distintos mecanismos: en la síntesis de leucotrienos, actuando como receptor de los leucotrienos cisteinílicos y como receptor de la PGD2 respectivamente.
- En el presente estudio nos hemos planteado evaluar los polimorfismos-197T>C, -441C>T, -549T>C Y -613C>T del gen *PTGDR*; -444A/C del gen *LTC4S*; 927C>T del gen *CYSLTR1*; en pacientes con rinitis alérgica por hipersensibilidad a pólenes.
- La hipótesis que planteamos es que los polimorfismos en estos genes: -197T>C, -441C>T, -549T>C Y -613C>T del gen *PTGDR*; -444A/C del gen *LTC4S* y 927C>T del gen *CYSLTR1* pueden estar relacionados con el desarrollo de la rinitis alérgica.

HIPOTESIS



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos -444A/C del gen *LTC4S*; 927C>T del gen *CYSLTR1*; -197T>C, -441C>T, -549T>C y -613C>T del gen *PTGDR*; en una población de pacientes con rinitis alérgica respecto a una población control no atópica
2. Valorar la relación de los polimorfismos individualmente considerados con los parámetros clínico-biológicos.
3. Establecer las variantes génicas y las combinaciones haplotípicas (en los polimorfismos que se localicen en el mismo gen o en su caso cromosoma) de los distintos polimorfismos, tanto en el grupo control como en los pacientes.
4. Analizar las posibles asociaciones de los haplotipos e interacciones génicas la rinitis alérgica



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

➤ DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, transversal, de casos y controles.

➤ POBLACIÓN ESTUDIADA

En el estudio participaron 359 pacientes.

Todos los individuos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado. El estudio siguió las recomendaciones de los Comités de Ética de la Investigación Clínica locales.

➤ CASOS

Se han evaluado 195 pacientes que acudieron a consulta al Servicio de Alergia del Hospital del Bierzo, que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- ✓ Edad superior a 18 años.
- ✓ Padeciesen una rinitis alérgica sin asma asociada.
- ✓ De al menos dos años de evolución.
- ✓ Diagnosticados mediante historia clínica compatible y positividad para alguno de los extractos de pólenes incluidos en una batería de aeroalérgenos adaptada a la zona de residencia, no se seleccionaron los pacientes con hipersensibilidad a alérgenos perennes: ácaros, hongos y epitelios.
- ✓ Cuando fue necesario se excluyó la presencia de asma mediante la realización de una prueba de provocación bronquial inespecífica con metacolina.

Se recogieron datos de filiación, como el nombre, apellidos, número de historia clínica, edad, sexo, fecha de nacimiento, así como la fecha de consulta y el facultativo que llevó a cabo la exploración del individuo. Estos datos sólo se emplearon en la identificación inicial de cada individuo, pero no se reflejaron en

MATERIAL Y MÉTODOS

ningún otro momento a lo largo del estudio o del análisis, que se realizó aplicando un sistema de disociación de datos. Los estudios de laboratorio se realizaron desconociendo si la muestra procedía de un paciente o de un individuo del grupo control.

➤ CONTROLES

Se seleccionó un grupo control de 164 individuos que acudieron a consulta al Servicio de Alergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, que cumplían los siguientes criterios:

- ✓ Ausencia de enfermedades alérgicas.
- ✓ Ausencia de síntomas y antecedentes de otras enfermedades respiratorias.
- ✓ Ausencia de antecedentes familiares de enfermedades atópicas.
- ✓ Pruebas cutáneas negativas frente a una batería de aeroalérgenos habituales locales.

➤ VARIABLES

En el estudio se han incluido las siguientes variables:

- ✓ Edad y sexo.
- ✓ Antecedentes familiares y personales de atopia o enfermedades alérgicas.
- ✓ Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata frente a una batería de aeroalérgenos comunes de la zona de residencia.
- ✓ Niveles de inmunoglobulina E (IgE) total y de IgE específica para alguno de los antígenos probados, si fuere necesario.
- ✓ Rinitis alérgica según la última clasificación del ARIA(17).
- ✓ Los estudios necesarios para excluir un asma alérgica.
- ✓ Polimorfismos: -444A/C del gen *LTC4S*; 927C/T del gen *CYSLTR1*; -197T>C, -441C>T, -549T>C y -613C>T del gen *PTGDR*.

4.2. OBTENCIÓN DE DATOS DE FILIACIÓN Y CLÍNICOS

➤ Historia clínica

Los antecedentes familiares y personales, la edad y el sexo y cuantos otros datos se recogieron de forma protocolizada a partir de las historias clínicas.

➤ Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata

Las pruebas intraepidérmicas (*prick*) se realizaron siguiendo las recomendaciones para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la EAACI (*The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) (215) con una batería estandarizada de los aeroalérgenos más frecuentes en nuestro entorno, que incluía *Dermatophagoides pteronissynuss*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepigoglyphus destructor*, mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*, *Abedul*, *Parietaria*, *Chenopodium*, *Artemisia*, *Plantago*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, Profilina, LTP y epitelios de perro y gato. Se empleó una solución de histamina 10 mg/ml como control positivo y una solución salina como control negativo; todos los extractos utilizados procedían de ALK-Abelló, (Madrid, España). 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 (215). La punción en la epidermis se realizó mediante una lanceta de tipo Morrow-Brown, de ALK-Abelló (Madrid, España) con una punta estandarizada de un milímetro (figura 9).



MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 9. Representación del procedimiento de inyección de los extractos antigénicos y los controles (ALK-Abelló, Madrid, España).

Se consideró positiva una reacción frente al alérgeno si se producía una pápula de diámetro igual o superior a 3 mm respecto de esta misma medida realizada en el control negativo, en caso de producirse pápula en él. Se consideró que el paciente era atópico si presentaba al menos una prueba positiva frente a un alérgeno de las pruebas cutáneas. Se consideró que el paciente presentaba alergia frente a un determinado alérgeno si, además de una prueba positiva, existían manifestaciones clínicas concordantes.

➤ Niveles de IgE total e IgE específica

A todos los pacientes se les realizó una extracción de suero, con el fin de determinar los niveles de IgE mediante la prueba *ImmunoCAP Total IgE* y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) (216).

Dicha prueba consiste en un enzimoimmunoanálisis en el cual los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los reactivos del *ImmunoCAP*, reaccionan con la IgE total del suero del paciente. Tras añadir anticuerpos anti-IgE (β -galactosidasa-anti-IgE, anticuerpos monoclonales de ratón, 2 $\mu\text{g/ml}$) marcados enzimáticamente se forma un inmunocomplejo de tipo sándwich. El exceso de anticuerpo unido a la enzima se elimina en una serie de lavados anteriores a la incubación con la solución que contiene el sustrato de dicha enzima. Trascurrido el tiempo establecido para la reacción, ésta se detiene y posteriormente se mide la fluorescencia del producto originado en la misma (figura 10). Utilizando una curva patrón se interpolan las unidades de respuesta y se obtienen las concentraciones de IgE de las muestras de suero.

En función del resultado de las pruebas cutáneas se realizó una determinación de IgE específica (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España) (216).

MATERIAL Y MÉTODOS

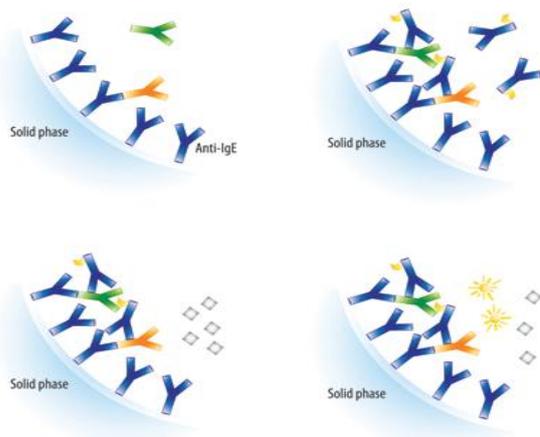


Figura 10. Enzimoimmunoanálisis para la determinación de IgE total. Se representan los pasos del ensayo ordenados de arriba abajo y de izquierda a derecha. En azul los anticuerpos anti-IgE unidos covalentemente a los reactivos en naranja y verde se muestra la IgE total del suero del paciente a determinar y en azul con amarillo los anticuerpos anti-IgE marcados enzimáticamente (Thermo Fisher Scientific, Phadia ImmunoCAP, Barcelona, España).

➤ Espirometría

Se realizó mediante un espirómetro con neumotacógrafo (Jaeger de Viasys, Hoechberg, Alemania) siguiendo las recomendaciones de la SEPAR (84). Con el fin de excluir el asma, se realizaron pruebas de broncodilatación y de provocación bronquial inespecífica con metacolina cuando fue necesario.

Se realizó la prueba de metacolina en los pacientes con clínica sospechosa para descartar asma; esta prueba sólo resultó necesaria en 3 pacientes, que tenían síntomas de rinitis alérgica (prurito nasal, estornudos, congestión nasal, conjuntivitis y tos irritativa faríngea), para descartar que tuviesen asma, ya que los positivos, no se incluyeron en el estudio y los que no presentaban síntomas de vías respiratorias inferiores, y la espirometría era normal, no precisaron la realización de dicha prueba. Se utilizó la técnica dosimétrica (217), mediante un dosímetro, que consta de una válvula solenoide que se activa eléctricamente y que controla el paso de aire a través del nebulizador de Vilbiss, generando el aerosol de forma intermitente. La prueba se interrumpe cuando el FEV1 cae un 20% respecto al FEV1 basal. Se preparan diluciones partiendo de un vial de

MATERIAL Y MÉTODOS

metacolina de 100mg cada una en 3ml, utilizando el protocolo de 5 diluciones. Previamente se realiza una inhalación con suero salino isotónico, y posteriormente ya se realizan las inhalaciones con las siguientes diluciones: A- 0,0625 mg/ml, B-0,25 mg/ml, C-1mg/ml, D-4mg/ml, K-16 mg/ml. Al finalizar la prueba, si es necesario se administra un broncodilatador de acción corta el salbutamol y se vuelve a repetir la espirometría. Se consideró positiva una PC20 metacolina <16mg/ml. En los 3 pacientes que se incluyeron no hubo caída del FEV1 del 20%, la prueba fue negativa.

4.3. ESTUDIO MOLECULAR

Se realizaron los siguientes pasos:

Inicialmente se procedió a la extracción de ADN de sangre total, en un tubo vacío con EDTA como anticoagulante, de marca Vacuette (GreinerBio-One, kremsmünster, Australia).

Se procedió a continuación a la amplificación de los fragmentos de ADN que incluían las regiones promotoras del gen *PTGDR* y las regiones intragénicas del resto de los genes *LTC4S* y *CYSLTR1* mediante técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), empleando los cebadores que flanqueaban las regiones de interés. Se empleó una ADN polimerasa termoestable, que minimizó el riesgo de contaminaciones y cuyo efecto de inicio a elevada temperatura (*hot start*) impide su actuación a bajas temperaturas, con lo que se obtiene así una mayor especificidad.

Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosaNuSieve® de alta resolución, con el porcentaje adecuado al tamaño de los fragmentos. Los productos de PCR se visualizaron con bromuro de etidio y RedSafe un colorante que permite visualizar los ácidos nucleicos porque se intercala entre la doble hebra y es visible a la luz UV. Una vez confirmada la amplificación del gen en cuestión se procedió al genotipado mediante secuenciación directa empleando el método ABI system, de los fragmentos de PCR, previamente purificados mediante columnas (218).

4.3.1. ANÁLISIS MOLECULAR

4.3.1.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

A todos los pacientes se les realizó una extracción de una muestra de sangre periférica, recogida en un tubo de vacío con EDTA como anticoagulante y almacenada a -20° C hasta el momento de la extracción del ADN.

Se han seguido dos protocolos diferentes de extracción del ADN a partir de sangre total: uno de ellos utilizando el kit comercial DNAPURE “SSS” (Genedan S.L, España); y otro utilizando el sistema automático *MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I- LargeVolume* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El *MagnaPure Compact* es un robot automatizado que permite la extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre total y de una amplia variedad de otros tipos de muestras.

Mediante este sistema se obtiene ADN genómico de gran calidad, adecuado para su uso en reacciones de PCR. Se trata de un sistema de partículas magnéticas contenidas en un cartucho que cuenta con una serie de pocillos en los que se encuentran los reactivos necesarios para la extracción. Se precisó un *rack* de puntas de pipeta estériles con filtro, cuya función es aspirar la muestra y pasarla por los distintos pocillos que contienen dichos reactivos. Las alícuotas de algo más de 1 mL de sangre, almacenadas a -20° C, se descongelaron a temperatura ambiente. Se encendió el instrumento y se seleccionó el protocolo “*DNA blood 1000*”, con el cual se trabaja con un volumen inicial de sangre total de 1 mL y un volumen de elución final de 200 µL. Se introdujeron en el carrusel los cartuchos de reactivos tras la lectura de su código de barras. Se identificaron debidamente los criotubos a los que se añadió 1 mL de la muestra de sangre correspondiente y se colocaron en la parte posterior del *rack* de muestras. Dicha identificación se introducía también en el ordenador del instrumento. Los tubos de elución se colocaron en la parte delantera del *rack* de muestras correctamente identificados, no sólo a través del número de laboratorio de la muestra, sino también mediante la lectura de su código de barras en el ordenador del instrumento. Una vez identificados todos los componentes, se introdujeron en el aparato y se inició la extracción automática, que dura unos treinta y cinco minutos aproximadamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo emplea un tampón de lisis que contiene proteinasa K para destruir proteínas y Tritón X-100, detergente que facilita la disrupción de las membranas celulares e inhibidores de desoxirribonucleasas y ribonucleasas. Dicha solución se incuba con la muestra de sangre total y, tras una incubación posterior a temperatura elevada, se añade una solución con partículas magnéticas e isopropanol, con el fin de aislar las moléculas de ácidos nucleicos en estas partículas. Tras una serie de lavados se procede a la separación del ADN de la partícula magnética por calor y elución con Tris-EDTA en el tubo de elución (figura11).

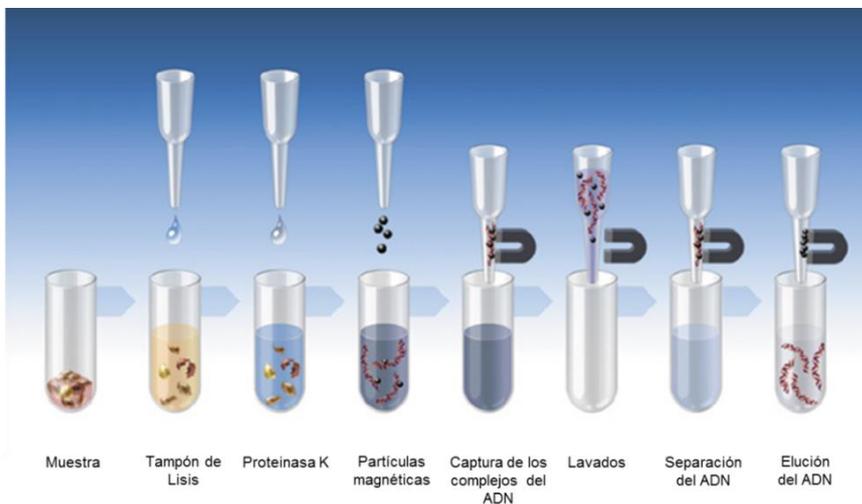


Figura 11. Secuencia de los pasos del procedimiento de extracción del *MagnaPure Compact*.

Una vez extraído el ADN de las muestras se evaluó el rendimiento de la extracción mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) con el fin de analizar la cantidad y calidad de ADN extraído. Para ello se determinó la absorbancia de las muestras diluidas al 1/50 con agua destilada en un volumen final de 100 μ L. Las mediciones de la absorbancia a 260 nm y el ratio 260/280 se realizaron por triplicado, con el fin de calcular los valores promedio de las mismas. En cuanto a la calidad del ADN se consideraron válidos cocientes 260/280 entre 1,8 y 2.

4.3.1.2. AMPLIFICACIÓN

Las muestras de ADN obtenidas a partir de sangre periférica siguiendo los protocolos de extracción fueron amplificadas en las regiones correspondientes a los genes estudiados mediante PCR con cebadores que flanquean específicamente dicha región (Tabla IX).

Tabla IX. Oligonucleótidos y secuencia de los genes analizados

GENES	Oligonucleótidos	Secuencia
<i>PTGDR</i>	<i>PTGDR-F</i>	5' CTCAGTTTCCTCGCCTATGC3'
	<i>PTGDR-R</i>	3' CTTCCGCAGCCTTCACTCC5'
<i>LTC4S</i>	<i>LTC4S-F</i>	5' CTCCATTCTGAAGCCAAA3'
	<i>LTC4S-R</i>	3' AAGTGGTGAGGCGGTCT5'
<i>CYSLTR1</i>	<i>CYSLTR1-F</i>	5' AAATCATGTTTTGGTCTTGC3'
	<i>CYSLTR1-R</i>	3' CAGTCCAAACCAATGAAAAT5'

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L. En 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* DNA polimerasa), 7,5 μ L de agua libre de nucleasas, 20 ng de ADN genómico y 1,25 pmol de cada oligonucleótido cebador (sentido y antisentido). Como control negativo en cada serie se empleó un tubo con todos los componentes de la reacción menos el ADN. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de MWG-BIOTECH (Biothech, Ebersberg, Alemania).

Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR, se presentan en la tabla IX siendo -F el cebador *forward* (sentido 5'→3') complementario de la hebra 3'→5' de ADN y -R el cebador *reverse* (antisentido) complementario de la hebra 5'→3'. Todos ellos fueron diseñados a partir de la secuencia de los

MATERIAL Y MÉTODOS

genes 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 destilada libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, EEUU) y almacenados en alícuotas a -20°C.

✓ PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

El programa de PCR para la amplificación de la región de interés de cada gen fue determinado mediante varios ensayos de puesta a punto del mismo y se detalla a continuación (Tabla X).

Tabla X. Programa de PCR empleado para la amplificación. Aquí están representados la temperatura y el tiempo empleado en cada fase de la amplificación para cada gen: Desnaturalización, anillamiento y extensión.

GENES	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	Extensión
<i>PTGDR</i>	1º) 94°C-5min			
	2º) 94°C-30seg	61°C-30seg	72°C-30seg	
	x 35 ciclos			3º) 72°C-7min
<i>LTC4S</i>	1º) 94°C-5min			
	2º) 94°C-30seg	59.5°C-30seg	72°C-30seg	
	x 35 ciclos			3º) 72°C-7min
<i>CYSLTR1</i>	1º) 94°C-5min.			
	2º) 94°C-30seg	60°C-30seg	72°C-30seg	
	x 35 ciclos			3º) 72°C-7min

4.3.1.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

MATERIAL Y MÉTODOS

Los productos de PCR fueron separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2% y tampón TAE al 0,5X. Para su preparación se utilizó agarosa NuSieve® 3:1 Agarose (CambrexBioScience Rockland, Inc, EEUU) y tampón TAE *Buffer* al 10X (Promega, Madison, WI, EEUU), compuesto por 400 mM de Tris-acetato y 10 mM de EDTA a pH 8,2-8,4; que se diluyó al 0,5X con agua destilada.

La agarosa se disolvió en el TAE 0,5X calentando la mezcla en un horno microondas. Posteriormente se dejó enfriar hasta 50-60°C, se añadieron 5 µL de RedSafe al 2% por cada 100 mL de gel y se depositó en la cubeta de electroforesis, colocando a continuación el peine de pocillos. El RedSafe actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al ser iluminado con luz ultravioleta (254 nm), de manera que a través de este compuesto se visualizan el o los fragmentos de ADN presentes en la muestra, incluyendo el exceso de los cebadores de la PCR en caso de haberlos. Transcurridos aproximadamente 40 minutos, dependiendo de las condiciones ambientales del laboratorio, se solidificó el gel y la cubeta se sumergió en TAE 0,5X.

Se procedió a cargar un volumen de 5 µL de cada uno de los productos de PCR previamente mezclados con 1 µL de tampón de carga *DNA Loading Buffer Red* (Bioline) que migra en un gel de agarosa al 2% con los fragmentos de 300 pb, con el fin de monitorizar la migración del ADN (figura 12). En todos los geles se cargó un marcador de peso molecular, concretamente el *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), cuyo patrón se muestra en la figura 12. Esto permitió contrastar en paralelo el tamaño del producto de PCR obtenido y estimar su calidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

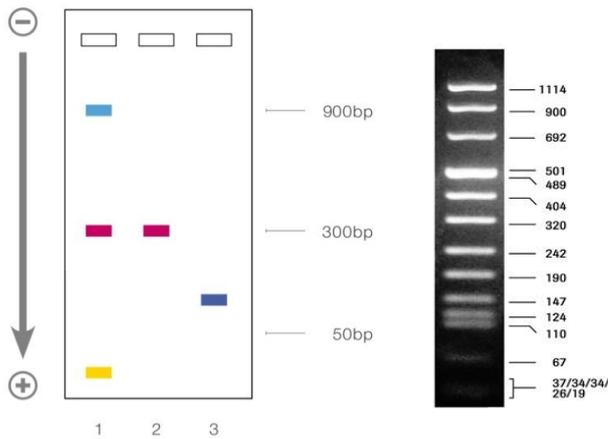


Figura 12. Tampones de carga *DNA Loading Buffer* (izquierda) y patrón de bandas del *Marker VII* (derecha) en geles de agarosa al 2%.

Tras aplicar al gel una corriente eléctrica de 120 Voltios durante 30 minutos, el gel fue analizado en un transiluminador de luz ultravioleta con el sistema fotográfico VisiDoc-It™ *Imaging System* (Uplant, CA, EEUU).

1. GEN *PTGDR*

Se analizó un fragmento de 642 pares de bases (pb) de la región promotora de *PTGDR* en un total de 195 pacientes, con el fin de determinar 4 polimorfismos ya descritos en la bibliografía dentro de esta región -613 C>T(rs34236606), -549T>C (rs8004654), -441C>T (rs803010) y -197T>C (rs11157907) (figura 13).

MATERIAL Y MÉTODOS

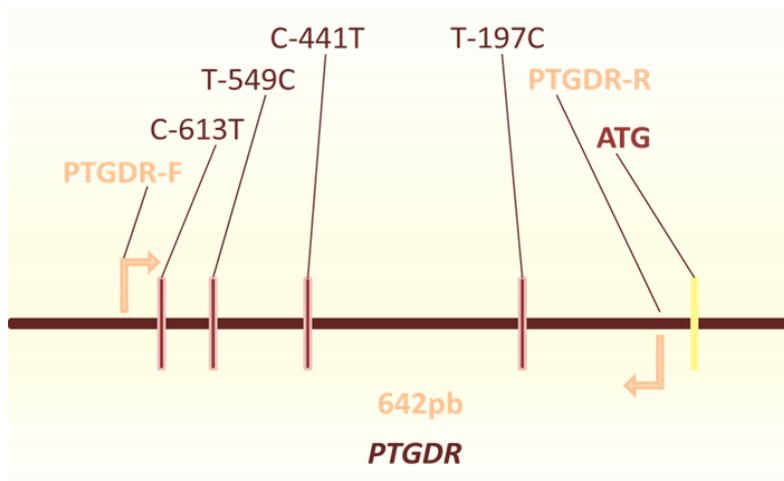


Figura 13. Esquema de la región promotora de *PTGDR*. Se representan los polimorfismos, el punto de inicio de la transcripción y la localización de los cebadores para la amplificación de esta región.

Los genotipos se determinaron mediante PCR (oligonucleótidos subrayados) y posteriormente se realizó la secuenciación (figura 14).

CTCAGTTTCCTCGCCTATGCaatggagatgaccgtgaatgccccaaattg**c**gctgatct
 agtagagaagaggagctaaggctcaggggctttccagacgtgagttatctttacc**t**ttc
 cttgactagctaatcaagacaactaggtagaagccctttctcagcctccccctcttcgc
 tcatcttttcgagttcttggccacccccagttcaaacaccagcaccac**c**tgccctcctctca
 ggtggctgctgcttaatttcccctccacttttagtagttcttctcttgccctcgctagaag
 gactgggtggttggtgcttggattctggctattttctcctgcccgttccgactcggcac
 cagagtctgtctctactgagaacgcagcgcgtcagggccgagctcttcaactggcctgct
 ccgctcttcaatgccagcgcagggcgtcaccctgcagagcgtcccgcctc**t**caag
 aggggtgtgaccgcgagtttagataggaggttctgcccgtggggaacacccccgccgc
 ctccggagctttttctgtggcgcagcttctccgccga**g**ccgcgcgaggagctgccgggg
 gctccttagcaccgcgggcgcggggccctcgccCTTCCGCAGCCTTCACTCC

Figura 14. Secuencia correspondiente a la región promotora del gen *PTGDR* amplificada por PCR y analizada por secuenciación automática. Se señalan en mayúscula la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación y en amarillo las posiciones de los polimorfismos analizados el orden es -613C>T, -549T>C, -441C>T, -197T>C y -95G>T.

Para la reacción de la PCR, se utilizó en el programa del termociclador una temperatura de anillamiento de 61°Cx35 ciclos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente se preparó un gel de agarosa para analizar los productos resultantes de la amplificación, separando los ácidos nucleicos según su carga. En un transiluminador se determinó la amplificación y el tamaño de las bandas correspondientes a los productos amplificados, así como la ausencia de bandas inespecíficas y de contaminaciones en el control negativo de la amplificación. Las muestras quedaron almacenadas según la fecha del experimento concordante con este dato en el cuaderno de trabajo (figura 15).

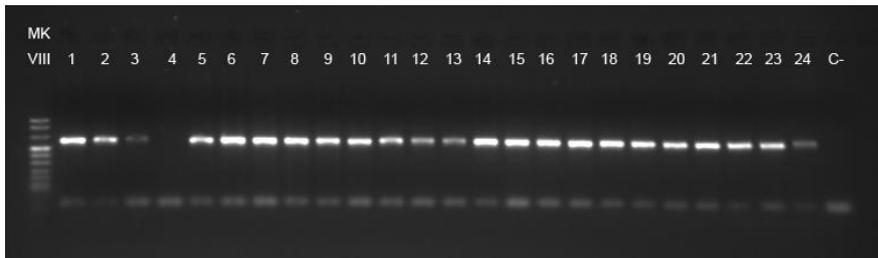


Figura 15. Electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR del promotor de *PTGDR*. Se visualizaron las bandas correspondientes al amplicón de 642 pb entre los fragmentos del patrón de bandas (MK VIII) de 692 y 509 pb, excepto en la muestra 4 en la cual no hay amplificación y en el pocillo del control negativo (C-). En todas ellas, incluido el (C-) se observó el exceso de cebadores de un tamaño de 20pb.

Tras visualizar en el gel el correcto resultado de la reacción de PCR se procedió a la purificación de las reacciones de PCR según se describe en el apartado 4.3.1.4. Posteriormente las muestras comprobadas y purificadas se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca según se describe en el apartado 4.3.1.5.

2. GEN *LTC4S*

Se analizó el polimorfismo -444A/C, localizado en la región promotora del gen *LTC4S* en un total de 195 pacientes.

Los genotipos se determinaron mediante PCR y posteriormente se realizó la secuenciación (figura 16).

MATERIAL Y MÉTODOS

CTCCATTCTGAAGCCAAAggcactggaagggttccgcagaggagggttggcagggg
ttgccaggaacagcctggatggggaca**g**gggaacagataagggtgggtggaggagttagcc
gggagcctggggctggctccagcatgatgtgggggtctgcaaggccctggagaaagtgg
ggtggtgcagcagggggcacacccacagctggagctgaccagatggacagcttgggct
ctgccacgcgggactaggcaaggaaggggcacgaacaagcagg**AAGTGGTGAGGCGGTC**
T

Figura 16. Secuencia de la región amplificada en el gen *LTC4S* donde se indica en negrita los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR y en amarillo se señala la posición del polimorfismo analizado

Se realizó la PCR, se utilizó en el programa del termociclador una temperatura de anillamiento de 59.5°Cx35 ciclos. Se preparó un gel de agarosa para analizar los productos resultantes de la amplificación según se ha descrito en el apartado anterior.

Tras visualizar en el gel el correcto resultado de la reacción de PCR se procedió a la purificación de las reacciones de PCR según se describe en el apartado 4.3.1.4. Posteriormente las muestras comprobadas y purificadas se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca según se describe en el apartado 4.3.1.5.

3. GEN *CYSLTR1*

Se analizó el polimorfismo 927C/T, localizado en la región codificante del gen *CYSLTR1* en un total de 195 pacientes, para ver si mostraban asociación con la patología de nuestros pacientes de RA.

Los genotipos se determinaron mediante PCR (oligonucleótidos en negrita) y posteriormente se realizó la secuenciación (figura 17).

MATERIAL Y MÉTODOS

AAATCATGTTTTGGTCTTGCattatgtgtcattgtttggtggctttatcatcccttttg
ttattataattgtctgttacacaatgatcattttgaccttactaaaaaatcaatgaaa
aaaaatctgtcaagtcataaaaaggctataggaatgatcatggctcgtgaccgctgcctt
tttagtcagtttcatgccatcatatattcaacgtaccattcaccttcattttttacaca
atgaaactaaaccctgtgattctgtccttagaatgcagaagtccgtgggcataaccttg
tctctggctgcatccaattgttgctttgaccctctcctatattttcttttctggggtaa
cttaggaaaaggctgtctacattCagaaagcattctttgtccagcgtgacttatgtac
ccagaaagaaggcctctttgccagaaaaaggagagaataatgtaaagtatagtttaa
cccatttc**CAGTCCAACCAATGAAAAT**

Figura 17. Secuencia de la región amplificada en el gen *CYSLTR1* donde se indica en negrita los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR y en amarillo se señala la posición del polimorfismo analizado.

Se realizó la PCR, para la que se utilizó en el programa del termociclador una temperatura de anillamiento de 60°Cx35 ciclos. Se preparó un gel de agarosa para analizar los productos resultantes de la amplificación según se ha descrito en apartados anteriores.

Tras visualizar en el gel el correcto resultado de la reacción de PCR se procedió a la purificación de las reacciones de PCR según se describe en el apartado 4.3.1.4. Posteriormente las muestras comprobadas y purificadas se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca según se describe en el apartado 4.3.1.5.

4.3.1.4. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

- **EXOSAP-IT**

El kit ExoSAP-IT es un sistema de purificación de ADN innovador y rápido. Contiene, en un tampón especial, dos enzimas con actividades hidrolíticas completarias; la Exonucleasa I y la Fosfatasa Alcalina de camarón (*Pandalusborealis*) que actúan en la mezcla de PCR procesando los fragmentos de ADN de cadena sencilla de pequeño tamaño como los oligonucleótidos y los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP) sobrantes en la reacción hasta nucleósidos y fosfato libre (figura 18). Posteriormente, las enzimas se inactivan mediante calor (80° C), quedando el fragmento de interés libre de interferencias para evitar fondo en la posterior reacción de secuenciación.

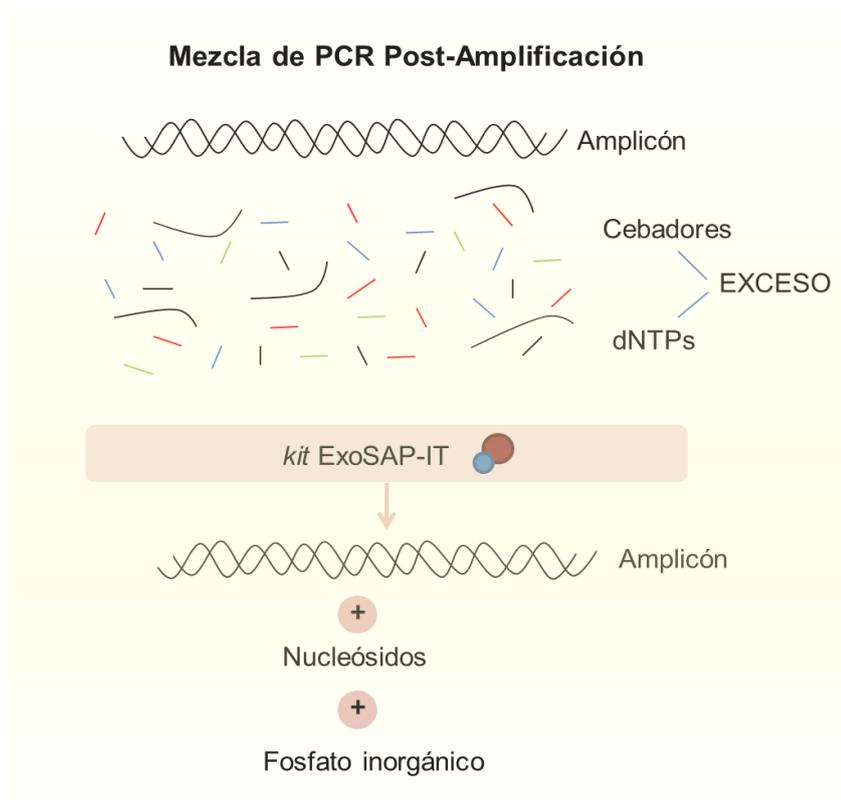


Figura 18. Principio de purificación del kit ExoSAP-IT.

La purificación se llevó a cabo en un volumen final de 5 μ L. En cada reacción se añadió 1 μ L de ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA) y 4 μ L de la reacción de PCR obtenida. Las reacciones de hidrólisis e inactivación se llevaron a cabo en un termociclador de MWG-BIOTECH (Biothech, Ebersberg, Alemania) (figura 19).



Figura 19. Programa de purificación de ExoSAP-IT. Aquí están representados la temperatura y el tiempo empleado en la purificación y en la inactivación enzimática.

4.3.1.5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN

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* (Lifetechnologies, 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 prepararon en un volumen final de 8 μ L, añadiendo 3 μ L de cebador de interés a una concentración de 1 μ M y 5 μ L de muestra de PCR purificada.

4.3.1.6. ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

El análisis de las secuencias obtenidas se ha llevado a cabo a través de diferentes programas informáticos. La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó mediante los programas ChromasPro 1.32 (TechnelysiumPtv. Ltd, Tewantin, Australia) y Chromas 2.3 (TechnelysiumPty. Ltd, Tewantin, Australia) (figura 20).

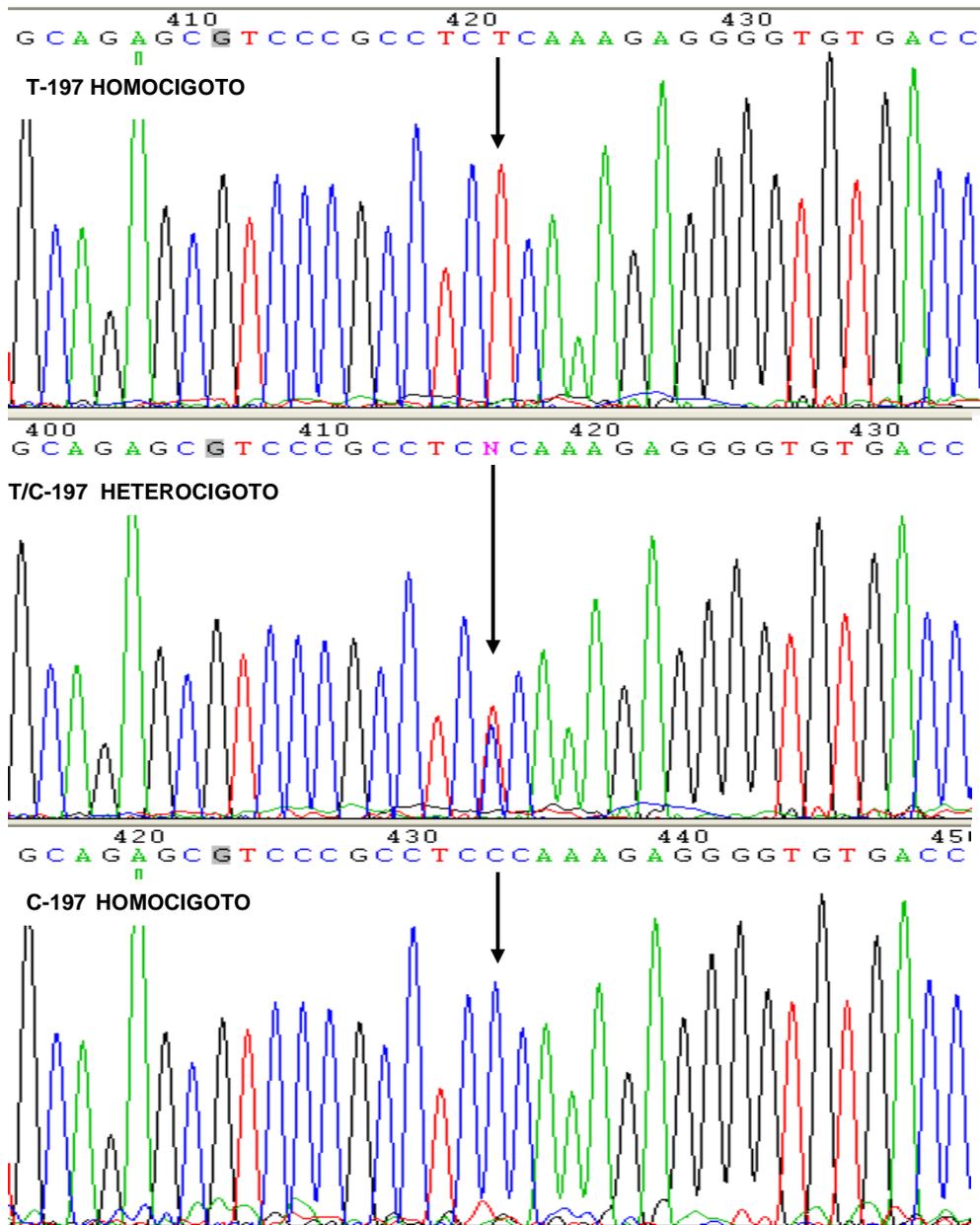


Figura 20. Análisis de las secuencias obtenidas en el programa ChromasPro 1.32. Cromatograma resultado de la secuenciación que muestra el polimorfismo -197T>C del gen *PTGDR*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La homología con la secuencia depositada en la base de datos GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) se analizó con el programa BLAST de los servidores www2.ebi.ac.uk/fasta3 y www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html.

El alineamiento de las secuencias de ADN se llevó a cabo en el programa AlingX (VectorNTI Advance 10, Invitrogen CA, EEUU) (figura 21).

```
1                                     100
Cons. (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
A (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
B (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
C (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
D (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
E (1) CCCGCCTCCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
F (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
G (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
H (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
I (1) CCCGCCTCCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
J (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
K (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
L (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
M (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
N (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
O (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
```

Figura 21. Ejemplo del alineamiento de las secuencias obtenidas en el programa AlingX. El alineamiento se realizó a partir de 15 secuencias (A-O) y la secuencia consenso (Cons.). Se representa una región con que comprende las posiciones -197T>C (T/Y/C) y -95G>T (G/K) coloreadas dentro del amplicón de 642 pb del promotor de *PTGDR*, donde se detectan las variantes respecto a la secuencia consenso.

✓ CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO

Durante la realización de este estudio se siguieron las recomendaciones de control de calidad de la *European Genetics Quality Network* (219) en todos los procedimientos analíticos del mismo.

Los procedimientos de la fase preanalítica garantizaron la identificación inequívoca de las muestras y su correcto almacenamiento. En el momento de su recepción en el laboratorio cada muestra llegó junto con la hoja de recogida de datos clínicos, ambas identificadas con una etiqueta portadora del mismo código de barras. El registro se realizó mediante una identificación secundaria

MATERIAL Y MÉTODOS

a través de un código de laboratorio alfanumérico, adjudicado a la muestra y a la hoja de datos, a partir del cual se introdujo la información relativa al paciente en una base de datos general almacenada en un ordenador del Servicio de Inmunoalergia con acceso restringido; excluyendo los datos personales identificativos. Las hojas de recogida de datos quedaron archivadas a partir de ese momento y las muestras de sangre fueron alicuotadas en criotubos (1mL de sangre por criotubo) debidamente identificados con el número de laboratorio, y almacenadas a -20° C. Se dispensaron tres alícuotas por muestra, una para la extracción del ADN y al menos dos para archivo de seguridad; identificadas como una serie (A1, A2, A3).

La extracción del ADN se realizó minimizando el riesgo de contaminación de las muestras en todo momento. Se dispuso de un laboratorio destinado exclusivamente a la extracción del ADN, utilizando en toda circunstancia material estéril y puntas con filtro, además de hacer una revisión de dichas identificaciones en varios puntos del proceso tanto con el sistema automático como con el protocolo manual de extracción.

Se habilitó un área aislada para realizar las PCR en cabina de flujo laminar esterilizada periódicamente con luz UV y se emplearon pipetas dedicadas exclusivamente a esa función y puntas de pipeta con filtro de un solo uso para evitar posibles contaminaciones.

En el estudio se utilizaron controles negativos y marcadores de peso molecular apropiados. Las muestras procedentes de sujetos control y de pacientes se trataron conjuntamente desconociendo su condición en todo el proceso de genotipado. La interpretación de los resultados obtenidos mediante secuenciación se realizó en todos los casos por duplicado. Las secuencias fueron almacenadas en una carpeta en el ordenador de Inmunoalergia con acceso restringido.

4.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN GÉNICA

4.4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois, EEUU). El análisis de variables cuantitativas se realizó a través de medidas de tendencia central como la media o mediana, según las características de la variable y las medidas de dispersión como la desviación estándar. Por su parte, las variables cualitativas fueron descritas en forma de proporciones en los diferentes grupos.

4.4.2. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

Se llevó a cabo un análisis estadístico comparando la distribución de los diferentes polimorfismos entre el grupo de controles y los distintos grupos de pacientes en función de sus características clínicas, con el fin de determinar una posible asociación entre ellos. Las diferencias se establecieron a partir de un nivel de significación de p -Fisher $< 0,05$. Las asociaciones significativas se confirmaron a través de una regresión logística binaria ajustando por edad y sexo, con el fin de descartar la posible influencia de estas variables en la asociación; todo ello utilizando el paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois, EEUU). Para estimar el riesgo derivado de las diferencias significativas se calculó la *Odds Ratio* (OR) con intervalo de confianza al 95%. Además se calculó el poder estadístico de la asociación encontrada en relación al tamaño muestral, utilizando la plataforma *on-line* <http://statpages.org/proppowr.html> basada en *Statistical Methods for Rates and Proportions* por Joseph L. Fleiss.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.3. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

Con el objetivo de estudiar posibles diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los controles y los distintos grupos de pacientes, se realizó la comparación de dichas frecuencias mediante un test de contingencia tipo χ^2 utilizando la plataforma estadística *on-line* SHEsis (220) (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>). Se determinó la situación de equilibrio poblacional mediante una prueba χ^2 para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weimberg.

4.4.4. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

En este estudio se ha determinado la asociación de los haplotipos de los polimorfismos -197T>C, -441C>T, -549T>C y -613C>T del gen *PTGDR*; respecto de las diferentes características clínicas de los pacientes. Para ello se han utilizado las siguientes herramientas estadísticas:

-Plataforma estadística *on-line* SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>): En la comparación entre controles y pacientes de las frecuencias de los diferentes haplotipos (221).

-SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois, EEUU): En el estudio de la posible influencia de la presencia de un diplotipo determinado en la patología y para determinar el modelo de herencia, dominante o recesiva, de la presencia de un determinado haplotipo respecto de una característica clínico-biológica.



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Se procedió al análisis de los resultados en un total de 359 individuos, de los cuales 195 fueron casos y 164 fueron controles.

5.1. ESTUDIO ESTADÍSTICO DESCRIPTIVO

5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL

La población control se compuso de 164 individuos, caracterizados por parte del equipo de facultativos del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca de acuerdo con los criterios previamente descritos en el apartado 4.1 de la sección de material y métodos. Ninguno de ellos presentaba síntomas de enfermedades alérgicas o respiratorias, ni tampoco antecedentes familiares de las mismas.

La media de edad de la de la población control fue de 44 años. La distribución por sexos fue de un 35 % para el sexo masculino frente a un 65 % para el sexo femenino.

Los niveles medios de la IgE total fueron de 75 kU/L; todos los controles tuvieron una IgE sérica total < 100 kU/L (Tabla XI) al ser este un criterio de selección.

Tabla XI. Análisis descriptivo de los casos y controles incluidos en el estudio.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO	CASOS N=195	p	CONTROLES N=164
SEXO	VARONES 46 % MUJERES 54 %	0,041*	VARONES 35 % MUJERES 65 %
EDAD	Media: 33,26 Desviación típica: 12,17		Media: 44,01 Desviación típica: 18,10
IgE total	Media: 141 kU/L	<0,001*	Media: 75 kU/L

(*p=significación estadística)

5.1.2. DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA

En este trabajo se han estudiado un total de 195 pacientes con diagnóstico clínico de rinitis alérgica por sensibilización a pólenes, todos ellos mayores de 18 años, y con un mínimo de dos años de evolución de síntomas de rinitis alérgica, que fueron evaluados en el Servicio de Alergia del Hospital del Bierzo, siguiendo los criterios previamente descritos en el apartado 4.1 de la sección de material y métodos.

La media de edad de la de la población con RA fue de 33 años. La distribución por sexos fue de un 45 % para el sexo masculino frente a un 55 % para el sexo femenino. Los niveles medios de la IgE total fueron de 141 kU/L (tabla XI).

➤ **ANTECEDENTES FAMILIARES**

Se recogieron los antecedentes familiares (AF) de atopia de los 195 pacientes; un 77,9 % (152 pacientes) no presentaba antecedentes familiares de atopia. Lo más frecuente fueron los maternos (11,30 %) (figura 22).

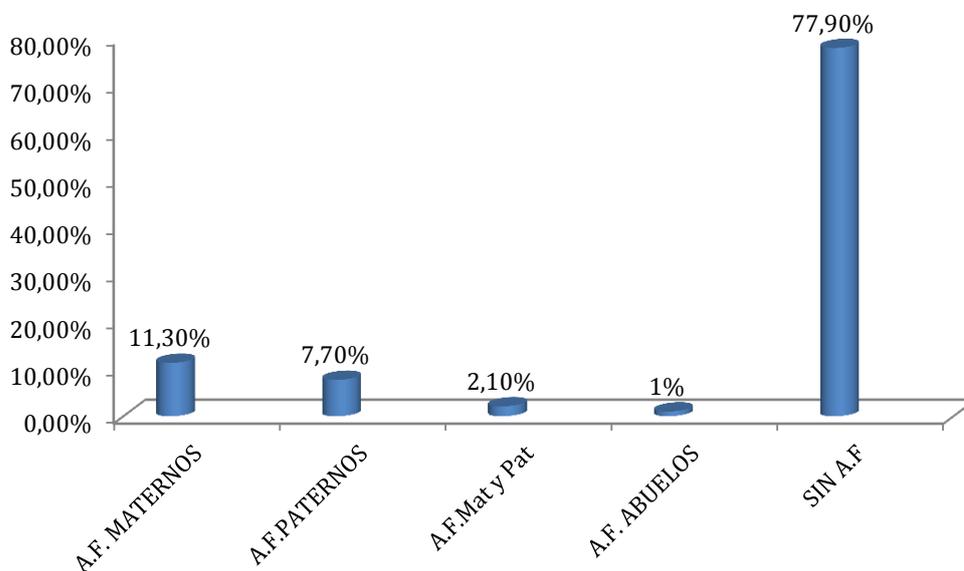


Figura 22. Antecedentes familiares (AF) de atopia.

RESULTADOS

➤ ANTECEDENTES PERSONALES DERMATITIS ATÓPICA

De los 195 pacientes 176 (90,3 %) no presentaban antecedentes personales de dermatitis atópica, mientras que 19 (9,7 %) pacientes sí los referían.

➤ GRAVEDAD DE LA RINITIS ALÉRGICA

La gravedad de la RA se valoró según las categorías establecidas por el documento ARIA (figura 23). Un 17 % presentaba RA intermitente leve, un 17 % padecía RA intermitente moderada-grave, un 24,5 % RA persistente leve y un 41,5 % RA persistente moderada-grave.

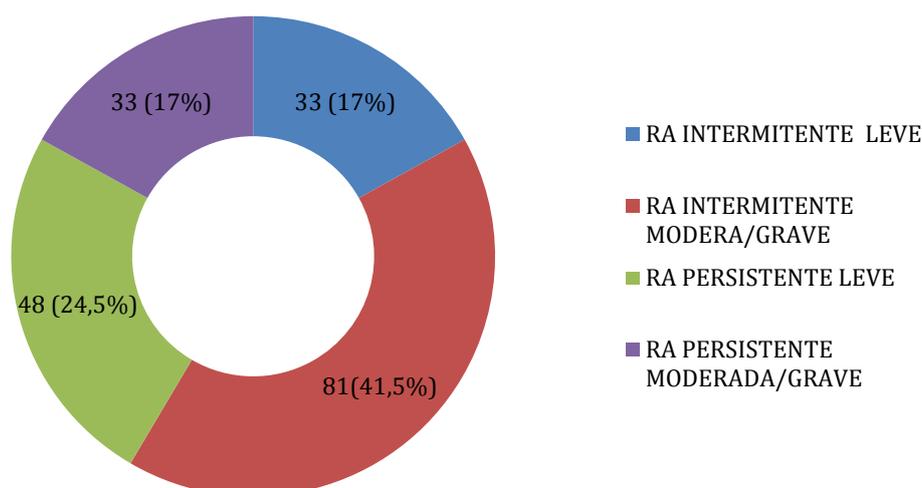


Figura 23. Gravedad de la RA en los pacientes.

➤ PRUEBAS CUTÁNEAS

La positividad en las distintas pruebas cutáneas intraepidérmicas frente a los aeroalérgenos de la batería utilizada en el estudio se refleja en la figura 24. Se consideraron positivos si se producía una pápula de diámetro igual o superior a

RESULTADOS

3 mm, descartando siempre el dermatografismo. Los tres alérgenos más importantes fueron los pólenes de gramíneas, *Plantago*, abedul y olivo.

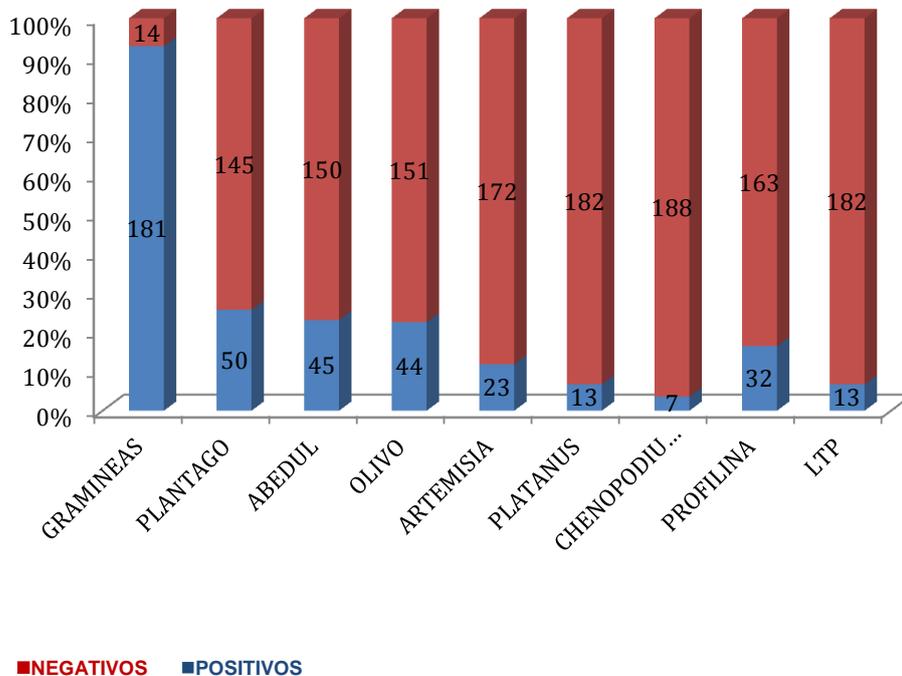


Figura 24. Pruebas cutáneas en el grupo completo de pacientes. Se representan el número de pacientes con pruebas cutáneas positivas y negativas para cada uno de los aeroalérgenos.

➤ ANALISIS DE LAS SENSIBILIZACIONES

Se analizaron los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados de acuerdo a las pruebas cutáneas. Se consideraron monosensibilizados cuando existía positividad a un único alérgeno en las pruebas cutáneas; el resultado fue de 87 (45 %) pacientes monosensibilizados (tabla XII), de los cuales 78 fueron monosensibles al polen de las gramíneas, 5 al polen del olivo, 3 al del abedul y 1 al de artemisia. Al resto de los 108 pacientes (55 %), que presentaron más de una prueba cutánea positiva se les consideró polisensibilizados.

RESULTADOS

Dentro de los pacientes polisensibilizados el resultado obtenido fue el siguiente: 52 pacientes (26,7 %) estaban sensibilizados a 2 pólenes, 28 pacientes (14,4 %), a 3 pólenes, 17 pacientes (8,7 %) a 4 pólenes, a 5 pólenes fueron 4 pacientes (2,1 %) y a 6 pólenes, 5 pacientes (2,6 %). En estos resultados influye la posible reactividad cruzada (tabla XIII).

Tabla XII. Distribución de las monosensibilizaciones.

MONOSENSIBILIZADOS	N= 87	% frente al total de monosensibilizados	% *
GRAMINEAS	78	89,6 %	40,3 %
OLIVO	5	5,8 %	2,6 %
ABEDUL	3	3,5 %	1,6 %
ARTEMISIA	1	1,1 %	0,5 %

* Respecto al 45 % de prevalencia de polisensibilización en la muestra de pacientes

Tabla XIII. Distribución de los polisensibilizaciones.

POLISENSIBILIZADOS	N=108	% frente al total de polisensibilizados	%*
2 Pólenes	52	43,2 %	26,7 %
3 Pólenes	28	30 %	14,4 %
4 Pólenes	17	16 %	8,7 %
5 Pólenes	4	4 %	2,1 %
6 Pólenes	5	5 %	2,6 %
7 Pólenes	2	1,8 %	1,0 %

* Respecto al 55 % de prevalencia de polisensibilización en la muestra de pacientes

RESULTADOS

Se realizó el análisis de los monosensibilizados frente polisensibilizados en relación a las pruebas cutáneas positivas obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en las pruebas cutáneas positivas a olivo- $p < 0,001$, no hubo significación estadística frente a gramíneas (tabla XIV).

Tabla XIV. Análisis de monosensibilizados frente a polisensibilizados con pruebas cutáneas positivas a gramíneas y olivo.

Pruebas cutáneas positivas	Monosensibilizados		Polisensibilizados		p
	n=87	%	n=108	%	
GRAMINEAS n total =181	n=78	(43 %)	n=103	(56 %)	0,16
OLIVO n total=44	n=5	(11%)	n=39	(89%)	<0,001*

(* $p < 0,001$)

Se analizaron también los pacientes monosensibilizados frente a los polisensibilizados frente a la IgE específica de gramíneas y olivo (tabla XV)

Tabla XV. Análisis de monosensibilizados frente a polisensibilizados con IgE específica a gramíneas y olivo.

IgE específica	Monosensibilizados		Polisensibilizados		p
	Media	DT	Media	DT	
GRAMINEAS	19,67kU/L	23,56	27,97kU/L	31,74	0,41
OLIVO	1,34kU/L	1,01	6,75kU/L	10,99	0,11

(DT=Desviación típica)

➤ IgE ESPECÍFICA

En los pacientes que presentaban pruebas cutáneas positivas se determinaron los niveles de IgE específica para cada polen mediante InmunoCap (Tabla XVI).

RESULTADOS

Tabla XVI. Valores de IgE específica (kU/L) para los distintos pólenes.

POSITIVOS	N	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DT*	Q1-Q3
GRAMINEAS	181	0,17	101	24,42	11,20	28,83	37,71
PLANTAGO	50	0,17	32,71	4,41	1,75	6,82	3,52
ABEDUL	45	0,31	101	11,24	4,91	17,61	12,85
OLIVO	44	0,17	42,41	6,13	2,29	10,48	4,23
ARTEMISIA	23	0,41	17,81	3,57	1,61	4,99	2,53
PLATANUS	13	0,44	9,21	3,15	3,14	2,42	3,14
CHENOPO- DIUM	7	0,93	5,71	3,01	2,34	1,83	3,34
PROFILINA	32	0,17	4,34	0,84	0,34	1,08	0,92
LTP	13	0,17	33	5,02	3,34	9,64	8,01

(*DT = Desviación típica)

En los pacientes que presentaban pruebas cutáneas positivas se agruparon los valores en clases de IgE específica para cada polen de acuerdo a las clases del InmunoCap (Tabla XVII). Las clases fueron las especificadas por el fabricante: clase 0 (<0.35 kU/L), clase 1 (0,35-0,7 kU/L), clase 2 (0,7-3,5 kU/L), clase 3 (3,5-17,5 kU/L), clase 4 (17,5-50 kU/L), clase 5 (50-100 kU/L), clase 6 (>100 kU/L).

RESULTADOS

Tabla XVII. Clases de IgE específica para los distintos aeroalérgenos.

POSITIVOS	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Clase 5	Clase 6
GRAMINEAS n=181	14 (8 %)	34 (19 %)	44 (25 %)	44 (25 %)	27 (15 %)	7 (4 %)
PLANTAGO n=50	9 (18 %)	24 (48 %)	10 (20 %)	5 (10 %)		
ABEDUL n=45	2 (4,4 %)	14 (31,1%)	20 (44,4 %)	6 (13,3 %)	1 (2,2 %)	1 (2,2 %)
OLIVO n=44	5 (11,3 %)	20 (45,4 %)	12 (27,2 %)	5 (11,4 %)		
ARTEMISIA n=23	6 (26 %)	12 (52,2 %)	4 (17,4 %)	1 (4,3%)		
PLATANUS n=13	2 (15,4 %)	5 (38,4 %)	6 (46,1 %)			
CHENOPODIUM n=7		4 (57,2 %)	3 (42,8 %)			
PROFILINA n=32	1 (3,1 %)	12 (37,5%)	1 (3,1%)			
LTP n=13	1 (7,7 %)		3 (23 %)	1 (7,7 %)		

Como se ha indicado en el apartado de material y métodos, no se seleccionaron los pacientes con hipersensibilidad a alérgenos perennes: ácaros, hongos y epitelios.

➤ IgE SÉRICA TOTAL

En el caso de la IgE total, dada su ausencia de normalidad estadística, se calculó el logaritmo en base 10 de la IgE total a fin de normalizar los valores (tabla XIV).

Tabla XIV. Valores de IgE total e IgE total normalizada (\log_{10} IgE TOTAL).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica.	Q3-Q1
IgE total (kU/L)	195	2,47	1055	141,21	171,14	150,80
\log_{10} IgE Total	195	0,39	3,02	1,87	0,52	2,63

RESULTADOS

Respecto a los niveles de IgE total, se obtuvieron unos niveles medios de 141,21 kU/L (figura 25) en los pacientes con RA, mientras que en los controles este valor fue de 75 kU/L (ver tabla XI).

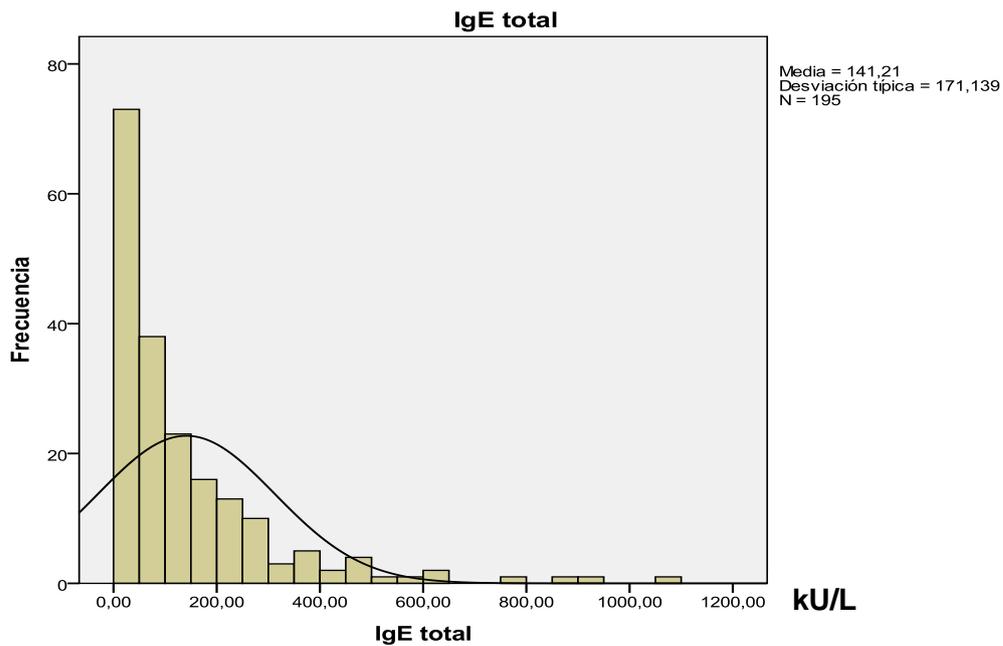


Figura 25. IgE total de los 195 pacientes; se obtuvo una media de 141,21 kU/L.

Se realizó el \log_{10} de la IgE total obteniéndose una media de \log_{10} 1,87 kU/L, con una desviación típica de \log_{10} 0,52 y RI de 2,63 (figura 26).

RESULTADOS

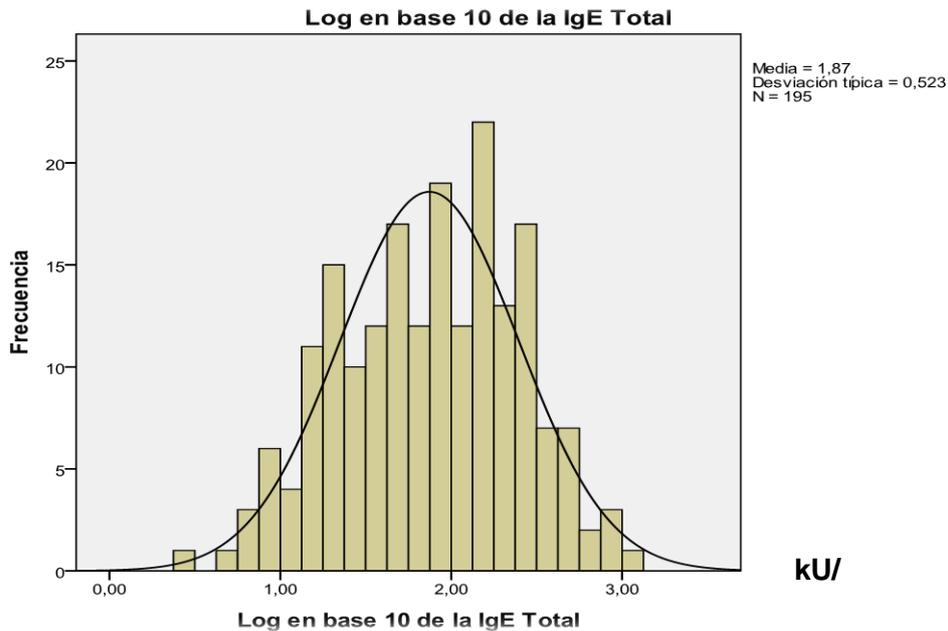


Figura 26. IgE total, \log_{10} con una media de 1,87 kU/L.

➤ DISTRIBUCIÓN DE LOS NIVELES DE IgE SÉRICA TOTAL SEGUN LA GRAVEDAD DE LA RINITIS ALÉRGICA

Se analizó la IgE total en relación con la gravedad de la RA (tabla XV), sin que se obtuviera significación estadística, si bien el valor de p estuvo muy próximo a la significación ($p=0,06$).

Tabla XV. Gravedad de la RA y valores de IgE total*.

Gravedad RA	N	IgE Total
Intermitente leve	33	120,9kU/L
Intermitente moderada-grave	81	128,06kU/L
Persistente leve	48	152,2kU/L
Persistente moderada-grave	33	177,5kU/L

(* $p=0,06$)

RESULTADOS

También se obtuvo significación estadística entre el análisis de la IgE total y los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados ($p=0.008$)

➤ DISTRIBUCIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA RA EN LOS PACIENTES MONOSENSIBILIZADOS Y POLISENSIBILIZADOS

Se analizó la gravedad de la RA en los pacientes monosensibilizados y en los polisensibilizados, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,02$) (tabla XVI).

Tabla XVI. Gravedad de la RA y grado de sensibilización.

Gravedad RA	Monosensibilizados	Polisensibilizados
Intermitente leve (n=33)	n=21 63,6%	n=12 36,36%
Intermitente moderada-grave (n=81)	n=39 48,1%%	n=42 51,9,9%
Persistente leve (n=48)	n=16 33,3%	n=32 66,7%
Persistente moderada-grave (n=33)	n=11 33,33%	n=22 66,66%

➤ DISTRIBUCIÓN DE LOS NIVELES DE IgE ESPECIFICA SEGUN LA GRAVEDAD DE LA RA

Al correlacionar los niveles de IgE específica de los diferentes pólenes con la gravedad de la RA, en el caso de las gramíneas se objetivó una media de 30,72 kU/L, que fue más elevada en los pacientes con RA persistente moderada-grave. Para la IgE específica al plantago, la media más elevada fue de 6,60 kU/L, que se observó en los pacientes con RA intermitente leve. En lo referente a la IgE específica al abedul, la media más elevada fue de 17,57 kU/L, que correspondió a los pacientes con RA persistente leve; y para la IgE específica al olivo la media más elevada fue de 13,47 kU/L en los pacientes

RESULTADOS

con RA persistente leve (tabla XVII). Solamente se obtuvieron resultados estadísticamente significativos respecto a la IgE específica frente a gramíneas $p < 0,01$ y a la IgE específica frente al *Chenopodium* $p = 0,002$.

Tabla XVII. Gravedad de la Rinitis Alérgica y niveles de IgE específica.

IgE específica (kU/L) p	RA Intermitente Leve	RA Intermitente Mod-Grave	RA Persistente Leve	RA Persistente Mod-Grave
GRAMINEAS p=<0,01	n=25 Media: 8,53	n=77 Media: 27,03	n=47 Media: 24,18	n=32 Media: 30,72
OLIVO p=0,22	n=6 Media: 1,42	n=17 Media: 3,67	n=9 Media: 13,47	n=12 Media: 6,49
PLATANUS p=0,90	n=0	n=6 Media: 2,86	n=2 Media: 2,99	n=5 Media: 3,57
ABEDUL p=0,48	n=5 Media: 10,76	n=16 Media: 5,96	n=14 Media: 17,57	n=8 Media: 12,00
ARTEMISIA p=0,67	n=3 Media: 2,06	n=11 Media: 3,65	n=2 Media: 1,91	n=7 Media: 4,59
PLANTAGO p=0,85	n=6 Media: 6,60	n=18 Media: 3,18	n=16 Media: 5,12	n=10 Media: 4,18
CHENOPODIUM p=0,002	n=0	n=4 Media: 1,62	n=0	n=3 Media: 4,89
PROFILINA p=0,06	n=3 Media: 0,72	n=17 Media: 0,89	n=4 Media: 0,58	n=8 Media: 1,28
LTP p=0,38	n=3 Media: 14,98	n=7 Media: 2,95	n=1 Media: 0,34	n=2 Media: 0,34

5.2. ANALISIS GENOTÍPICO

En los siguientes apartados se detalla la estadística descriptiva univariante, el análisis de los 6 polimorfismos de los 3 genes analizados, el análisis multivariante y el estudio de haplotipos en cada uno de los grupos que se han incluido en el estudio, entre los pacientes con RA y los controles.

Se han calculado las frecuencias alélicas y genotípicas para la población control y para el grupo de pacientes con RA (tabla XVIII).

RESULTADOS

Tabla XVIII. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes con rinitis alérgica (RA) y en los controles.

GEN	SNP	Frecuencias Alélicas		Frecuencias Genotípicas	
		Controles	Pacientes RA	Controles	Pacientes RA
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,92	C: 0,91	CC: 0,84	CC: 0,84
		T: 0,08	T: 0,09	CT: 0,16	CT: 0,14
				TT: 0,00	TT: 0,02
	-549T>C	T: 0,47	T: 0,47	CC: 0,27	CC: 0,26
		C: 0,53	C: 0,52	CT: 0,52	CT: 0,53
				TT: 0,21	TT: 0,21
-441C>T	C: 0,76	C: 0,72	CC: 0,58	CC: 0,53	
	T: 0,23	T: 0,28	CT: 0,39	CT: 0,37	
			TT: 0,04	TT: 0,09	
-197T>C	T: 0,89	T: 0,85	CC: 0,04	CC: 0,01	
	C: 0,12	C: 0,14	CT: 0,15	CT: 0,27*	
			TT: 0,80	TT: 0,72	
	-95G>T	G: 0,98	G: 0,97	GG: 0,97	GG: 0,95
		T: 0,01	T: 0,02	GT: 0,03	GT: 0,04
				TT: 0,00	TT: 0,00
<i>LTC4S</i>	-444A/C	A: 0,75	A: 0,76	AA: 0,59	AA: 0,62
		C: 0,24	C: 0,23	AC: 0,32	AC: 0,29
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂C: 0,20	♂C: 0,16	♀CC: 0,09	♀CC: 0,08
		♀C: 0,22	♀C: 0,21	♀CT: 0,26	♀CT: 0,26
		♂T: 0,80	♂T: 0,84	♀TT: 0,64	♀TT: 0,66
		♀T: 0,77	♀T: 0,79		

* p de Fisher = 0,005

En lo referente al gen *PTGDR* sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes frente a los controles en la distribución de las frecuencias genotípicas del SNP -197T/C, siendo el genotipo heterocigoto C/T más frecuente en los pacientes (27,2 %) que en los controles (15,2 %), con una p de Fisher=0,005.

Para el resto de los polimorfismos analizados en el resto de los genes no se observaron diferencias significativas en cuanto a la distribución de las frecuencias alélicas ni genotípicas de los pacientes frente a los controles (ver tabla XVIII).

5.2.1. ANTECEDENTES FAMILIARES

Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes con antecedentes familiares alérgicos (43 casos) frente al grupo control (tabla XIX).

Tabla XIX. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes con antecedentes familiares de alergia (AF) respecto a los controles.

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes AF	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes AF
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,91	C: 0,88	CC: 0,83	CC: 0,79
		T: 0,08	T: 0,11	CT: 0,16	CT: 0,18
	-549T>C	T: 0,47	T: 0,43	CC: 0,26	CC: 0,32
		C: 0,53	C: 0,57	CT: 0,51	CT: 0,49
				TT: 0,21	TT: 0,18
-441C>T	C: 0,77	C: 0,79	CC: 0,58	CC: 0,63	
	T: 0,23	T: 0,21	CT: 0,38	CT: 0,32	
<i>LTC4S</i>	-197T>C	T: 0,89	T: 0,81	CC: 0,04	CC: 0,02
		C: 0,12	C: 0,18	CT: 0,15	CT: 0,32*
	-95G>T			TT: 0,80	TT: 0,65
		G: 0,98	G: 0,99	GG: 0,97	GG: 0,98
		T: 0,01	T: 0,01	GT: 0,03	GT: 0,02
-444A/C	A: 0,75	A: 0,79	AA: 0,59	AA: 0,65	
	C: 0,24	C: 0,21	AC: 0,33	AC: 0,28	
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂C: 0,20	♂C: 0,16	♀CC: 0,09	♀CC: 0,04
		♀C: 0,22	♀C: 0,10	♀CT: 0,26	♀CT: 0,12
		♂T: 0,80	♂T: 0,84	♀TT: 0,64	♀TT: 0,83
		♀T: 0,78	♀T: 0,90		

* p de Fisher = 0,033

El genotipo C/T del polimorfismo -197T/C de *PTGDR* resultó significativamente más frecuente en los pacientes con antecedentes familiares de alergia (32,6 %) que en los controles (15,2 %), con una p de Fisher de 0,033.

De estos casos con antecedentes familiares de alergia, 22 pacientes presentaban antecedentes familiares de primer grado exclusivamente maternos; en estos pacientes se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el SNP -613 C/T del gen *PTGDR*. El genotipo mutado -613TT resultó más frecuente en los

RESULTADOS

pacientes (4,5%) que en los controles (0 %), con una p de Fisher de 0,024); también se identificaron, en estos mismos casos, diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el SNP -197, siendo en este caso el genotipo heterocigoto C/T más frecuente en los pacientes (36,4 %) que en los controles (15,2 %) con una p de Fisher de 0,038.

Para el resto de la distribución de los AF no se identificaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles en ningunos de los SNP analizados en los tres genes.

También se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes sin antecedentes familiares de alergia, en esta ocasión, 152 pacientes frente al grupo control (tabla XX).

Tabla XX. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes sin antecedentes familiares de alergia (AF) respecto a los controles.

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes SIN AF	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes SIN AF
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,92 T: 0,08	C: 0,92 T: 0,08	CC: 0,84 CT: 0,16 TT: 0,00	CC: 0,85 CT: 0,13 TT: 0,01
	-549T>C	T: 0,47 C: 0,53	T: 0,49 C: 0,51	CC: 0,27 CT: 0,52 TT: 0,21	CC: 0,24 CT: 0,54 TT: 0,22
	-441C>T	C: 0,77 T: 0,23	C: 0,70 T: 0,30	CC: 0,58 CT: 0,38 TT: 0,04	CC: 0,51 CT: 0,39 TT: 0,10
	-197T>C	T: 0,88 C: 0,12	T: 0,86 C: 0,13	CC: 0,04 CT: 0,15 TT: 0,80	CC: 0,01 CT: 0,26* TT: 0,74
	-95G>T	G: 0,99 T: 0,01	G: 0,97 T: 0,03	GG: 0,97 GT: 0,03 TT: 0,00	GG: 0,95 GT: 0,05 TT: 0,01
<i>LTC4S</i>	-444A/C	A: 0,76 C: 0,24	A: 0,76 C: 0,24	AA: 0,59 AC: 0,33 CC: 0,08	AA: 0,61 AC: 0,29 CC: 0,10
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20 ♀ C: 0,22 ♂ T: 0,80 ♀ T: 0,78	♂ C: 0,16 ♀ C: 0,24 ♂ T: 0,84 ♀ T: 0,76	♀ CC: 0,09 ♀ CT: 0,26 ♀ TT: 0,64	♀ CC: 0,09 ♀ CT: 0,30 ♀ TT: 0,61

* p de Fisher = 0,012

RESULTADOS

En el caso del gen *PTGDR*, al comparar los pacientes sin antecedentes familiares de alergia respecto a los controles, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el SNP -197, siendo el genotipo heterocigoto C/T más frecuente en los pacientes (25,7 %) que en los controles (15,2 %), con una p de Fisher de 0,012.

Para el resto de los SNP no se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas

5.2.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE DERMATITIS ATÓPICA

Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica (n= 19) frente al grupo control (tabla XXI).

RESULTADOS

Tabla XXI. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica (DA).

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes con DA	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes con DA
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,92	C: 0,87	CC: 0,84	CC: 0,74
		T: 0,08	T: 0,13	CT: 0,16	CT: 0,26
	-549T>C	T: 0,47	T: 0,42	CC: 0,27	CC: 0,32
		C: 0,53	C: 0,58	CT: 0,52	CT: 0,53
	-441C>T	C: 0,77	C: 0,71	TT: 0,21	TT: 0,16
T: 0,23	T: 0,29	CC: 0,58	CC: 0,47		
			CT: 0,38	CT: 0,47	
			TT: 0,04	TT: 0,05	
<i>LTC4S</i>	-197T>C	T: 0,88	T: 0,76	CC: 0,04	CC: 0,05
		C: 0,12	C: 0,24*	CT: 0,15	CT: 0,37
	-95G>T	G: 0,99	G: 0,95	TT: 0,80	TT: 0,58
		T: 0,01	T: 0,05	GG: 0,97	GG: 0,89
				GT: 0,03	GT: 0,10
<i>LTC4S</i>	-444A/C	A: 0,76	A: 0,74	AA: 0,59	AA: 0,53
		C: 0,24	C: 0,26	AC: 0,33	AC: 0,42
				CC: 0,08	CC: 0,05
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20	♂ C: 0,00	♀ CC: 0,09	♀ CC: 0,15
		♀ C: 0,22	♀ C: 0,27	♀ CT: 0,26	♀ CT: 0,23
		♂ T: 0,80	♂ T: 1,00	♀ TT: 0,64	♀ TT: 0,61
		♀ T: 0,78	♀ T: 0,73		

* p de Fisher = 0,041

En los pacientes que presentaban antecedentes personales de dermatitis atópica se observaron, diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones de las frecuencias alélicas en el SNP -197 del gen *PTGDR*, siendo el alelo mutado C más frecuente en los pacientes (23,7 %) que en los controles (11,9 %), asociándose la presencia del alelo C con padecer la enfermedad, con una OR de 2,29; IC 95 % (1,01- 5,21); p de Fisher =0,041.

Para el resto de los polimorfismos no se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas ni genotípicas.

También se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes sin antecedentes personales de dermatitis atópica 176 casos frente al grupo control (tabla XXII).

RESULTADOS

Tabla XXII. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes sin antecedentes personales de dermatitis atópica (DA).

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes SIN DA	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes SIN DA
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,92	C: 0,92	CC: 0,84	CC: 0,74
		T: 0,08	T: 0,08	CT: 0,16	CT: 0,26
				TT: 0,00	TT: 0,02
	-549T>C	T: 0,47	T: 0,48	CC: 0,27	CC: 0,26
		C: 0,53	C: 0,52	CT: 0,52	CT: 0,53
			TT: 0,21	TT: 0,22	
-441C>T	C: 0,77	C: 0,72	CC: 0,58	CC: 0,54	
	T: 0,23	T: 0,28	CT: 0,38	CT: 0,36	
			TT: 0,04	TT: 0,10	
-197T>C	T: 0,88	T: 0,86	CC: 0,04	CC: 0,01	
	C: 0,12	C: 0,14	CT: 0,15	CT: 0,26*	
			TT: 0,80	TT: 0,73	
-95G>T	G: 0,99	G: 0,98	GG: 0,97	GG: 0,96	
	T: 0,01	T: 0,02	GT: 0,03	GT: 0,03	
			TT: 0,00	TT: 0,01	
<i>LTC4S</i>	-444A/C	A: 0,76	A: 0,77	AA: 0,59	AA: 0,63
		C: 0,24	C: 0,23	AC: 0,33	AC: 0,27
				CC: 0,08	CC: 0,10
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20	♂ C: 0,17	♀ CC: 0,09	♀ CC: 0,07
		♀ C: 0,22	♀ C: 0,20	♀ CT: 0,26	♀ CT: 0,27
		♂ T: 0,80	♂ T: 0,83	♀ TT: 0,64	♀ TT: 0,67
		♀ T: 0,76	♀ T: 0,80		

* p de Fisher = 0,005

En los pacientes que no presentaban antecedentes personales de dermatitis atópica, frente a los controles, en el caso del gen *PTGDR* se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el SNP -197T/C; en este caso, el genotipo heterocigoto C/T fue más frecuente en los pacientes (26,1 %) que en los controles (15,2 %) con una p de Fisher de 0,005.

Para el resto de los polimorfismos no se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas

RESULTADOS

5.2.3. PACIENTES POLISENSIBILIZADOS Y MONOSENSIBILIZADOS

Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes polisensibilizados (n=108) frente al grupo control (tabla XXIII).

Tabla XXIII. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes polisensibilizados.

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes Polisensibilizados	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes Polisensibilizados
<i>PTGDR</i>	613C>T	C: 0,92	C: 0,91	CC: 0,84	CC: 0,83
		T: 0,08	T: 0,09	CT: 0,16	CT: 0,15
	549T>C	T: 0,47	T: 0,48	TT: 0,00	TT: 0,02
		C: 0,53	C: 0,52	CC: 0,27	CC: 0,23
				CT: 0,52	CT: 0,58
441C>T	C: 0,77	C: 0,76	TT: 0,21	TT: 0,18	
	T: 0,23	T: 0,23	CC: 0,58	CC: 0,58	
197T>C	T: 0,88	T: 0,85	CT: 0,38	CT: 0,36	
	C: 0,12	C: 0,15	TT: 0,04	TT: 0,05	
95G>T	G: 0,98	G: 0,97	CC: 0,04	CC: 0,01	
	T: 0,01	T: 0,03	CT: 0,15	CT: 0,28*	
			TT: 0,80	TT: 0,71	
<i>LTC4S</i>	444A/C	A: 0,75	A: 0,74	GG: 0,97	GG: 0,94
		C: 0,24	C: 0,26	GT: 0,03	GT: 0,04
			TT: 0,00	TT: 0,01	
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20	♂ C: 0,16	♀ CC: 0,09	♀ CC: 0,07
		♀ C: 0,22	♀ C: 0,18	♀ CT: 0,26	♀ CT: 0,23
		♂ T: 0,80	♂ T: 0,84	♀ TT: 0,64	♀ TT: 0,70
		♀ T: 0,77	♀ T: 0,81		

* p de Fisher = 0,016

En lo referente al gen *PTGDR* se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas del SNP -197T/C, siendo el genotipo heterocigoto C/T fue más frecuente en los pacientes (27,8 %) que en los controles (15,2%), con una p de Fisher de 0,016.

Para el resto de los polimorfismos no se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas ni genotípicas

RESULTADOS

También se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes monosensibilizados (n=87 casos) frente al grupo control (tabla XXIV).

Tabla XXIV. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes monosensibilizados.

GEN	SNP	Frecuencias Controles	Alélicas Pacientes Monosensibi- lizados	Frecuencias Controles	Genotípicas Pacientes Monosensibi- lizados
<i>PTGDR</i>	613C>T	C: 0,92	C: 0,92	CC: 0,84	CC: 0,85
		T: 0,08	T: 0,08	CT: 0,16	CT: 0,14
				TT: 0,00	TT: 0,01
	549T>C	T: 0,47	T: 0,47	CC: 0,27	CC: 0,30
		C: 0,53	C: 0,53	CT: 0,52	CT: 0,46
				TT: 0,21	TT: 0,24
441C>T	C: 0,77	C: 0,67	CC: 0,58	CC: 0,47**	
	T: 0,23	T: 0,33*	CT: 0,38	CT: 0,39	
			TT: 0,04	TT: 0,14**	
197T>C	T: 0,88	T: 0,85	CC: 0,04	CC: 0,01	
	C: 0,12	C: 0,14	CT: 0,15	CT: 0,26	
			TT: 0,80	TT: 0,72	
<i>LTC4S</i>	-95G>T	G: 0,98	G: 0,98	GG: 0,98	GG: 0,96
		T: 0,01	T: 0,02	GT: 0,03	GT: 0,03
<i>LTC4S</i>	444A/C	A: 0,75	A: 0,79	AA: 0,59	AA: 0,65
		C: 0,24	C: 0,21	AC: 0,33	AC: 0,27
				CC: 0,08	CC: 0,07
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20	♂ C: 0,16	♀ CC: 0,09	♀ CC: 0,09
		♀ C: 0,22	♀ C: 0,24	♀ CT: 0,26	♀ CT: 0,30
		♂ T: 0,80	♂ T: 0,84	♀ TT: 0,64	♀ TT: 0,61
		♀ T: 0,77	♀ T: 0,76		

* p de Fisher = 0,014; ** p de Fisher = 0,017

En lo referente al gen *PTGDR* se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas del SNP -441C/T; en este caso el alelo mutado T resultó más frecuente en los pacientes (33,3 %) que en los controles (23,2 %) con una OR de 0,60; IC 95 % 0,4 – 0,9; p de Fisher = 0,014.

En este mismo gen *PTGDR* también se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas del SNP -441 entre los de pacientes monosensibilizados y los controles,

RESULTADOS

siendo el genotipo mutado T/T más frecuente en los pacientes (13,8 %) que en los controles (4,3 %); el genotipo no mutado (“silvestre”) C/C fue más frecuente en los controles (57,9%) que en los pacientes (47,1%), una p de Fisher = 0,017.

Para el resto de los polimorfismos no se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas ni genotípicas

De los 87 pacientes monosensibles, 78 fueron monosensibles a gramíneas. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas para la población de pacientes monosensibilizados a gramíneas (78 casos) frente al grupo control (tabla XXV).

Tabla XXV. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes monosensibilizados a gramíneas.

GEN	SNP	Controles Alélicas	Pacientes M. Gramíneas Alélicas	Controles Genotípicas	Pacientes M. Gramíneas Genotípicas
<i>PTGDR</i>	-613C>T	C: 0,92	C: 0,92	CC: 0,84	CC: 0,86
		T: 0,08	T: 0,08	CT: 0,16	CT: 0,13
				TT: 0,00	TT: 0,01
	-549T>C	T: 0,47	T: 0,48	CC: 0,27	CC: 0,29
		C: 0,53	C: 0,52	CT: 0,52	CT: 0,45
			TT: 0,21	TT: 0,25	
-441C>T	C: 0,77	C: 0,67	CC: 0,58	CC: 0,49	
	T: 0,23	T: 0,33*	CT: 0,38	CT: 0,37	
			TT: 0,04	TT: 0,14*	
-197T>C	T: 0,88	T: 0,85	CC: 0,04	CC: 0,01	
	C: 0,12	C: 0,15	CT: 0,15	CT: 0,27	
			TT: 0,80	TT: 0,72	
-95G>T	G: 0,99	G: 0,98	GG: 0,97	GG: 0,96	
	T: 0,01	T: 0,02	GT: 0,03	GT: 0,04	
<i>LTC4S</i>	-444A/C	A: 0,77	A: 0,79	AA: 0,59	AA: 0,65
		C: 0,24	C: 0,20	AC: 0,33	AC: 0,28
				CC: 0,08	CC: 0,06
<i>CYSLTR1</i>	927C/T	♂ C: 0,20	♂ C: 0,13	♀ CC: 0,09	♀ CC: 0,07
		♀ C: 0,22	♀ C: 0,24	♀ CT: 0,26	♀ CT: 0,34
		♂ T: 0,80	♂ T: 0,87	♀ TT: 0,64	♀ TT: 0,59
		♀ T: 0,77	♀ T: 0,76		

*p de Fisher=0,026; **p de Fisher=0,021

En lo referente al gen *PTGDR* se observaron diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones de las frecuencias alélicas del SNP -441C/T entre los pacientes monosensibilizados a gramíneas y los controles (p de

RESULTADOS

Fisher=0,026), siendo el alelo mutado T más frecuente en pacientes (33 %) que en controles (23 %). También se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el SNP - 441C/T, donde el genotipo mutado T/T más frecuente en pacientes (14,1 %) que en controles (4,3 %) con una p de Fisher de 0,021.

Tras el análisis realizado de los SNP en los otros genes no se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas ni genotípicas ente a los controles y los pacientes monosensibilizados a gramíneas.

Tampoco se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas ni genotípicas entre los controles y los pacientes monosensibilizados al olivo, o al abedul, o a la artemisia en ninguno de los SNP de los tres genes analizados.

5.3. ANALISIS DE HAPLOTIPOS

Se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de pacientes con RA en relación al grupo control (tabla XXVI). Se ha llevado a cabo un primer análisis comparando la distribución global de haplotipos entre los dos grupos y posteriormente un análisis de la frecuencia de cada haplotipo frente al resto.

Tabla XXVI. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con rinitis alérgica (RA).

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes con RA	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,13	0,23	1,34	(0,83-2,19)
	CCCCT	0,01	0,02	0,54	1,46	(0,43-4,95)
	CCCTG	0,33	0,28	0,23	0,82	(0,59-1,14)
	CTCTG	0,24	0,20	0,32	0,83	(0,58-1,20)
	TCCTG	0,09	0,09	0,98	0,99	(0,58-1,69)
	Global			0,50		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

Tras el análisis realizado de los haplotipos de *PTGDR*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos entre los pacientes con rinitis alérgica y los controles. Tampoco se

RESULTADOS

observaron diferencias significativas en la comparación de ninguno de los haplotipos por separado frente al resto (ver tabla XXVI).

5.3.1. ANTECEDENTES FAMILIARES

Se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 43 pacientes con antecedentes familiares de alergia en relación al grupo control (tabla XXVII).

Tabla XXVII. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con antecedentes familiares de alergia (AF).

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes con AF	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,17	0,05	1,92	(0,98-3,80)
	CCCCT	0,01	0,00	0,49	0,01	(0,00-0,18)
	CCCTG	0,33	0,28	0,38	0,79	(0,46-1,34)
	CTCCT	0,00	0,01	0,08	192,02	(8,05-4580,45)
	CTCTG	0,24	0,21	0,55	0,84	(0,47-1,60)
	CTTTG	0,23	0,21	0,70	0,89	(0,50-1,60)
	TCCTG	0,09	0,12	0,45	1,34	(0,62-2,91)
	Global			0,17		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En el análisis de la distribución global de los haplotipos, no se observaron diferencias significativas entre los controles y los pacientes con antecedentes familiares de alergia. Tampoco se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre este grupo de pacientes y los controles para ninguno de los haplotipos considerados de forma independiente frente al resto.

Se calcularon también las frecuencias haplotípicas del gen *PTGDR* para la población de 152 pacientes sin antecedentes familiares de alergia en relación al grupo control (tabla XXVIII).

Tabla XXVIII. Distribución de haplotipos en los pacientes sin antecedentes familiares de alergia (AF).

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes SIN AF	p-Fisher	OR	IC 95%
PTGDR	CCCCG	0,10	0,11	0,54	1,18	(0,70-1,99)
	CCCCT	0,01	0,02	0,44	1,63	(0,46-5,70)
	CCCTG	0,33	0,29	0,31	0,83	(0,59-1,18)
	CCTTG	0,00	0,01	0,29	2,90	(0,38-21,90)
	CTCTG	0,24	0,20	0,27	0,80	(0,54-1,19)
	CTTTG	0,23	0,28	0,14	1,32	(0,91-1,92)
	TCCTG	0,09	0,08	0,69	0,89	(0,50-1,59)
	Global			0,48		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes sin antecedentes familiares alérgicos, frente a los controles, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos considerados de forma aislada frente al resto.

5.3.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE DERMATITIS ATOPICA

Se han calculado las frecuencias de la distribución global de haplotipos y de cada uno de los haplotipos del gen *PTGDR* frente al resto para la población de 19 pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica en relación al grupo control (tabla XXIX).

Tabla XXIX. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica (DA).

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes con DA	p-Fisher	OR	IC 95%
PTGDR	CCCCG	0,10	0,18	0,11	2,06	(0,83-5,10)
	CCCCT	0,01	0,05	0,09	4,00	(0,70-22,67)
	CCCTG	0,33	0,21	0,14	0,54	(0,24-1,23)
	CTCTG	0,24	0,13	0,13	0,48	(0,18-1,27)
	CTTTG	0,23	0,29	0,41	1,37	(0,65-2,91)
	TCCTG	0,09	0,13	0,40	1,55	(0,56-4,31)
	Global			0,09		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

RESULTADOS

En los pacientes con antecedentes personales de dermatitis atópica frente a los controles no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos considerados de forma aislada frente al resto.

Se calcularon también las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 176 pacientes sin antecedentes personales de dermatitis atópica en relación al grupo control (tabla XXX).

Tabla XXX. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes sin antecedentes personales de dermatitis atópica (DA).

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes sin DA	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,12	0,36	1,26	(0,76-2,09)
	CCCCT	0,01	0,02	0,78	1,20	(0,33-4,35)
	CCCTG	0,33	0,29	0,33	0,84	(0,60-1,19)
	CCTTG	0,00	0,01	0,34	2,57	(0,34-19,26)
	CTCTG	0,24	0,21	0,45	0,87	(0,60-1,26)
	CTTTG	0,22	0,26	0,31	1,20	(0,84-1,73)
	TCCTG	0,09	0,08	0,79	0,93	(0,53-1,61)
	Global			0,73		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes sin antecedentes personales de dermatitis atópica frente a los controles no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos considerados de forma aislada.

5.3.3. PRUEBAS CUTÁNEAS

Se han evaluado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 181 pacientes con pruebas cutáneas positivas a gramíneas en relación al grupo control (tabla XXXI).

RESULTADOS

Tabla XXXI Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a gramíneas.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Gramíneas	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,13	0,22	1,36	(0,83-2,22)
	CCCCT	0,01	0,02	0,47	1,56	(0,46-5,31)
	CCCTG	0,33	0,28	0,17	0,79	(0,57-1,11)
	CCTTG	0,00	0,01	0,35	2,51	(0,34-18,77)
	CTCTG	0,24	0,21	0,44	0,87	(0,60-1,25)
	CTTTG	0,23	0,26	0,34	1,19	(0,83-1,71)
	TCCTG	0,09	0,09	0,91	0,97	(0,56-1,67)
	Global			0,52		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes con pruebas cutáneas positivas a gramíneas, comparados frente a los controles, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos considerados de forma aislada.

Se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 44 pacientes con pruebas cutáneas positivas a olivo, en relación al grupo control (tabla XXXII).

Tabla XXXII. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a olivo.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Olivo	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,15	0,21	1,56	(0,77-3,16)
	CCCCT	0,01	0,00	0,27	-	-
	CCCTG	0,33	0,30	0,58	0,86	(0,51-1,45)
	CTCTG	0,24	0,20	0,49	0,81	(0,45-1,46)
	CTTTG	0,23	0,26	0,52	1,19	(0,70-2,07)
	TCCTG	0,09	0,04	0,18	1,49	(1,65-1,44)
	CTTTT	0,00	0,04	0,0003	-	-
	Global			0,006		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

RESULTADOS

Se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución global de haplotipos entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas a olivo ($p=0,006$).

También se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo CTTTT entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas al polen del olivo, siendo este haplotipo más frecuente en los pacientes (4 %) que en los controles (0 %), con una p de Fisher de < 0.001 .

En cuanto a las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 43 pacientes con pruebas cutáneas positivas a abedul respecto al grupo control, se obtuvieron los resultados expresados en la tabla XXXIII.

Tabla XXXIII. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a abedul.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Abedul	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,17	0,05	1,93	(0,98-3,80)
	CCCCT	0,01	0,01	0,90	0,85	(0,13-5,47)
	CCCTG	0,33	0,28	0,38	0,79	(0,46-1,34)
	CTCTG	0,23	0,22	0,71	0,90	(0,50-1,60)
	CTTTG	0,22	0,21	0,70	0,89	(0,50-1,60)
	TCCTG	0,08	0,08	0,82	0,90	(0,38-2,16)
	CTTTT	0,00	0,02	0,009*		
	Global			0,09		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia $>1\%$.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos entre el grupo de pacientes positivas al abedul y el grupo control.

Se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución del haplotipo CTTTT frente al resto de haplotipos, siendo este haplotipo mayor en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al abedul (2 %) que en los controles (0 %) con una p de Fisher de 0,009.

RESULTADOS

También se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 51 pacientes con pruebas cutáneas positivas a *plantago*, en relación al grupo control (tabla XXXIV).

Tabla XXXIV. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a *plantago*.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes <i>Plantago</i>	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,11	0,79	1,10	(0,53-2,30)
	CCCCT	0,01	0,03	0,30	2,19	(0,48-9,96)
	CCCTG	0,33	0,26	0,23	0,73	(0,44-1,21)
	CTCTG	0,24	0,25	0,62	1,14	(0,68-1,91)
	CTTTG	0,23	0,26	0,46	1,21	(0,72-2,03)
	TCCTG	0,09	0,08	0,52	0,75	(0,32-1,79)
	Global				0,68	

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes con pruebas cutáneas positivas al *Plantago*, frente a los controles, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos considerados de forma aislada.

Se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 13 pacientes con pruebas cutáneas positivas al *platanero*, en relación al grupo control (tabla XXXV).

RESULTADOS

Tabla XXXV. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al *Platanus*.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes <i>Platanus</i>	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,05	0,47	0,53	(0,09-3,00)
<i>PTGDR</i>	CCCCT	0,01	0,00	0,55		
<i>PTGDR</i>	CCCTG	0,33	0,44	0,22	1,65	(0,73-3,70)
<i>PTGDR</i>	CTCCG	0,00	0,10	$1,96 \times 10^{-5}$ **	26,14	(2,93-233,38)
<i>PTGDR</i>	CTCTG	0,24	0,13	0,21	0,48	(0,15-1,55)
<i>PTGDR</i>	CTTTG	0,23	0,19	0,68	0,81	(0,29-2,22)
<i>PTGDR</i>	TCCTG	0,09	0,00	0,20	0,00	(0,00-0,00)
<i>PTGDR</i>	TCCCG	0,00	0,04	0,0007***		
<i>PTGDR</i>	TTTTG	0,00	0,04	0,0007***		
	Global			$2,56 \times 10^{-7}$*		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

Se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución global de haplotipos entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas al platanero con una p de Fisher < 0.001.

También se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo CTCCG entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas a platanero con una p de Fisher < 0.001, siendo este haplotipo mayor en los pacientes (10 %) que en los controles (0).

Además se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias del haplotipo TCCCG entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas al platanero, siendo este haplotipo mayor en los pacientes (4 %) que en los controles (0 %) con una p de Fisher < 0.001.

Igualmente se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo TTTTG entre los controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas al platanero, siendo este haplotipo más frecuente en los pacientes (4 %) que en los controles (0 %), una p de Fisher < 0.001.

RESULTADOS

Se calcularon asimismo las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 23 pacientes con pruebas cutáneas positivas a la artemisia, en relación al grupo control (tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a la artemisia.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Artemisia	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,12	0,83	1,11	(0,41-3,04)
	CCCCT	0,01	0,00	0,42		
	CCCTG	0,33	0,20	0,07	0,50	(0,23-1,07)
	CTCTG	0,24	0,33	0,21	1,53	(0,78-3,00)
	CTTTG	0,23	0,26	0,63	1,19	(0,58-2,42)
	TCCTG	0,09	0,11	0,67	1,25	(0,45-3,43)
	Global				0,49	

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes con pruebas cutáneas positivas a artemisia, frente a los controles, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos ni en ninguno de los haplotipos frente al resto.

Para el resto de los pólenes, no se presentan los datos debido al escaso tamaño muestral

5.3.4. POLISENSIBILIZADOS Y MONOSENSIBILIZADOS

Se han calculado las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 108 pacientes polisensibilizados en relación al grupo control (tabla XXXVII).

RESULTADOS

Tabla XXXVII. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes polisensibilizados.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Polisensibilizados	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,13	0,31	1,33	(0,76-2,32)
	CCCCT	0,01	0,02	0,53	1,55	(0,40-6,01)
	CCCTG	0,33	0,28	0,26	0,08	(0,55-1,18)
	CTCTG	0,24	0,24	0,99	1,00	(0,66-1,51)
	CTTTG	0,23	0,22	0,90	0,97	(0,64-1,48)
	TCCTG	0,09	0,11	0,71	1,12	(0,60-2,09)
	CTTTT	0,00	0,01	0,53		
	Global			0,47		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En los pacientes polisensibilizados, frente a los controles, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global ni en ninguno de los haplotipos considerados individualmente.

Se estudiaron las frecuencias de los haplotipos del gen *PTGDR* para la población de 87 pacientes monosensibilizados, en relación al grupo control (tabla XXXVIII).

Tabla XXXVIII. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes monosensibilizados.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes Monosensibilizados	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,13	0,34	1,33	(0,74-2,40)
	CCCCT	0,01	0,02	0,85	1,16	(0,25-5,47)
	CCCTG	0,33	0,29	0,35	0,82	(0,55-1,24)
	CCTTG	0,00	0,02	0,10	4,80	(0,63-36,81)
	CTCTG	0,24	0,16	0,03*	0,60	(0,37-0,98)
	CTTTG	0,23	0,31	0,04**	1,55	(1,01-2,35)
	TCCTG	0,09	0,08	0,71	0,88	(0,44-1,74)
	Global			0,09		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución global de haplotipos entre el grupo de pacientes y el grupo control.

Se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo CTCTG entre los controles y los pacientes

RESULTADOS

monosensibilizados con una p de Fisher=0,03 siendo este haplotipo menor en los pacientes (16 %) que en los controles (24 %) OR: 0,60; IC 95% 0,37-0,98.

También se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo CTTTG entre los controles y los pacientes monosensibilizados, siendo este haplotipo mayor en los pacientes (31 %) que en los controles (23 %), p de Fisher=0,04;OR: 1,55; IC 95% 1,01-2,35.

De los 87 pacientes monosensibilizados, 78 lo fueron a gramíneas y en estos pacientes también se calcularon las frecuencias haplotípicas en relación al grupo control (tabla XXXIX).

Tabla XXXIX. Distribución de haplotipos de *PTGDR* en los pacientes monosensibilizados a gramíneas.

GEN	Haplotipo	Controles	Pacientes M. Gramíneas	p-Fisher	OR	IC 95%
<i>PTGDR</i>	CCCCG	0,10	0,13	0,33	1,35	(0,74-2,48)
	CCCCT	0,01	0,02	0,74	1,30	(0,27-6,12)
	CCCTG	0,33	0,27	0,24	0,77	(0,50-1,19)
	CCTTG	0,00	0,02	0,07	5,45	(0,71-41,68)
	CTCTG	0,24	0,18	0,13	0,68	(0,42-1,20)
	CTTTG	0,23	0,30	0,08	1,48	(0,96-2,29)
	TCCTG	0,09	0,07	0,62	0,84	(0,41-1,71)
	Global			0,14		

Se indican los datos referentes a los haplotipos con una frecuencia >1%.

En estos pacientes monosensibles a gramíneas frente a los controles no se identificaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los haplotipos.



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio se ha analizado una población (n=195) con clínica de rinitis alérgica, perteneciente al área sanitaria del Bierzo, que está situada al noroeste de la Comunidad de Castilla y León y comprende las comarcas del Bierzo y Laciana, en la provincia de León, y que da cobertura a una población de más de 146.000 usuarios.

Los resultados generales, en cuanto a las características poblacionales, son los esperables en una muestra de este tipo. Así, encontramos un porcentaje significativamente superior de mujeres respecto a varones; estos datos coinciden con los resultados del estudio Alergológica 2005 (96), en el cual el sexo femenino predominó en la muestra de pacientes con rinoconjuntivitis alérgica.

La edad media de nuestros pacientes fue de 33,26; esta edad fue menor que la del grupo control; de nuevo, en comparación con Alergológica 2005 (96), la media de edad fue muy parecida (29,94 años en Alergol La edad superior de los controles se debe a que estos se seleccionaron principalmente de los pacientes que acudieron a realizarse un estudio de alergia a medicamentos, por ser estos pacientes los que mejor podían cumplir los requisitos exigidos al grupo control. En cualquier caso, la edad superior aporta la ventaja de que ha podido transcurrir más tiempo para que se manifestase una enfermedad atópica, lo que mejora la calidad de la muestra de controles. Lógicamente los niveles medios de IgE sérica total fueron más elevados en los casos que en los controles, al ser estos no atópicos.

En cuanto a la gravedad de la RA, según la clasificación del ARIA (18) la mayor prevalencia en nuestros pacientes fue de rinitis alérgica persistente moderada-grave, posiblemente porque los pacientes con rinitis alérgica leve no se derivan tanto al hospital y se controlen preferentemente en atención primaria. De todos modos, comparando nuestros datos con los de la prevalencia RA moderada-grave observada en el estudio Ibérico, realizado en España y Portugal y con una muestra de 2.115 pacientes (222), se observan cifras similares (36% en el estudio Ibérico frente a un 41,5% en nuestra población). No obstante, lo

DISCUSIÓN

porcentajes para otros tipos de rinitis no fueron similares, observándose en nuestra muestra un mayor porcentaje de pacientes con rinitis intermitente moderada-grave, que tal vez pudiera relacionarse con las características de nuestra región.

En cuanto a las sensibilizaciones a los distintos pólenes, si bien en España, el polen de gramíneas es el más relevante en las zonas central y norte y el polen de olivo lo es en la mitad sur (223), en la zona del Bierzo, situada en la zona noroccidental, a caballo entre Castilla y León y Galicia, la vegetación de la comarca es muy diversa, como corresponde a su posición de transición entre el área eurosiberiana que domina en las tierras de mayor altitud y el área de clima mediterráneo de la cuenca del río Sil de la cercana zona de Orense (224), encontrándonos en esta zona, pólenes gramíneas y también pólenes de árboles como el abedul, el platanero y el olivo, o de malezas como *Plantago* y *Chenopodium* y la artemisia. En el estudio Alergológica 2005 (96) los porcentajes de sensibilizaciones a pólenes más frecuentemente recogidos en pacientes con rinitis alérgica de Castilla y León fueron gramíneas, olivo, *Platanus*, *Cupressus* y *Chenopodium*. En cuanto a las pruebas cutáneas positivas a pólenes recogidos en este estudio en pacientes con RA se detectó a nivel nacional una frecuencia del polen de *platanus* de 7,7 %; *artemisia* 6,8 %; *plantago* 7,2 %; y *abedul* 0,7 %. El abedul tiene una escasa representación en España, limitada a algunas zonas del Norte de España y es más frecuente en el Norte de Europa (225). En el Bierzo, por ser una zona norte, se encuentran, los bosques autóctonos que son principalmente bosques de *Quercus pirenaica*, acompañados, en ocasiones, por *Prunus avium*, *Frangula alnus* y, en los suelos más húmedos, por *Betula alba* y *Salix* sp; los bosques de *Castanea sativa* son también frecuentes, además de los encinares (*Quercus ilex*) y alcornoques (*Quercus suber*), generalmente ubicados en las laderas abruptas y en las zonas de mayor influencia de clima mediterránea, mientras que en los valles de montaña de mayor influencia atlántica dominan los bosques de abedul (*Betula alba*), roble (*Quercus robur*), acebo (*Ilex aquifolium*). Además de la amplia variedad orográfica de árboles también hay una amplia vegetación de gramíneas, malezas (siendo muy frecuente el *Plantago*) y compuestas como la Artemisia.

DISCUSIÓN

En nuestra muestra de pacientes las sensibilizaciones más prevalentes en las pruebas cutáneas fueron a las gramíneas, Plantago, abedul y olivo.

➤ MONOSENSIBILIZACIÓN Y POLISENSIBILIZACIÓN

En nuestro estudio encontramos un mayor número de pacientes polisensibilizados (n=108) que monosensibilizados (n=87). En un estudio de Miguera y cols (226) se observó que, con el paso de los años, los pacientes que acudían a los ensayos clínicos presentaban un mayor número de sensibilizaciones, presentando, en la mayoría de los estudios, un predominio de polisensibilización del 50 al 80%.

No podemos saber si alguna de las polisensibilizaciones pueden ser por una reactividad cruzada, como en algunos estudios (227), o no, al no haber realizado diagnóstico molecular. En términos moleculares, la polisensibilización clínica puede dividirse en sensibilización cruzada (también conocida como reactividad cruzada, en la que la misma molécula de IgE se une a varios alérgenos con características estructurales comunes) y cosensibilización (la presencia simultánea de diferentes enlaces de IgE a alérgenos que no necesariamente puede tener características estructurales comunes).

En nuestro estudio, en ambos grupos, tanto en los pacientes monosensibilizados como en los polisensibilizados, se observó una significación estadística en el análisis de la prevalencia de la gravedad de la RA. Así, la mayor parte de los pacientes monosensibilizados (63,6%) presentaba RA intermitente leve, mientras que, por el contrario, la mayor parte de los polisensibilizados (66,6%) padecía RA persistente moderada-grave. Al comparar por los distintos pólenes los pacientes monosensibilizados frente a los polisensibilizados, encontramos resultados significativos para el polen de olivo, que fue más prevalente en los polisensibilizados.

También analizamos la gravedad de la RA y los niveles de IgE específica a los distintos pólenes y obtuvimos significación estadística en el análisis de IgE específica en el caso de las gramíneas y del *Chenopodium*. Respecto a los pacientes con IgE específica a gramíneas, la mayor parte presentaba RA intermitente moderada-grave y la media más elevada de IgE específica frente a

DISCUSIÓN

se observó en los que tenían RA persistente moderada-grave. Estos mismos datos fueron coincidentes con los de los pacientes sensibilizados al *Chenopodium* en los que la mayor parte padecía RA intermitente moderada-grave y en los que la media de los niveles de IgE específica fue más elevada en los que presentaban RA persistente moderada-grave. Comparando nuestros resultados con los obtenidos en el estudio Ibérico (222) en el que se estudiaron pacientes con pruebas cutáneas positivas y se recogió la gravedad de la RA, en el grupo de los pacientes de la zona Norte sensibilizados a las gramíneas, el 40 % padecía RA intermitente leve. En otro análisis de este mismo estudio (228) donde se evaluaba la asociación entre rinitis, asma y la sensibilización cutánea a aeroalergenos, los alérgenos más prevalentes fueron gramíneas y olivo (coincidiendo con nuestro estudio), observando que a mayor tiempo de evolución y mayor número de sensibilizaciones, mayor gravedad de la rinitis y mayor posibilidad de desarrollo de asma.

➤ NIVELES DE IGE

Se ha demostrado en varios estudios el aumento de IgE total en enfermedades alérgicas, rinitis y asma alérgico (229) encontrado diferencias en los niveles de la IgE total según la gravedad del asma a mayor IgE sérica los paciente tenían asma más grave. Así, se observó en nuestros pacientes que los niveles de IgE sérica total fueron más elevados en los pacientes con RA persistente moderada-grave, con valores muy próximos a la significación.

Davila y cols (230) evaluaron la asociación de los niveles séricos de IgE total con la gravedad del asma alérgica en adultos, con asma alérgica persistente, y observaron que los niveles séricos se iban elevando a medida que se incrementaba la gravedad del asma, aunque sin significación estadística. No obstante, encontraron un porcentaje significativamente superior de pacientes con asma grave con niveles superiores a 400 kU/L de IgE total.

También se ha observado una relación con los niveles de IgE en otros trabajos donde también se ha utilizado la IgE total entre otras pruebas como marcador de gravedad de la rinitis alérgica en pacientes menores de 15 años (231).

DISCUSIÓN

Por su parte, en el estudio de Pastorello y cols (232), los autores relacionaron los niveles de IgE específica con aumento de enfermedades alérgicas. Los investigadores evaluaron pacientes atópicos con pruebas cutáneas positivas que podrían presentar síntomas o ser asintomáticos, observando que la IgE específica se encontraba más elevada en los pacientes atópicos con síntomas. Este dato está en concordancia con el hecho de que nuestros pacientes que padecían formas de RA más graves presentaban niveles más elevados de IgE sérica y también con el hecho de que la media de IgE específica fuera más elevada en los pacientes sensibilizados a las gramíneas y al *Chenopodium*.

También se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados y la IgE total, estando la IgE sérica total más elevada en los pacientes polisensibilizados que en los monosensibilizados; estos resultados son coincidentes con los de otros estudios mencionados anteriormente (230), donde los pacientes con polisensibilizaciones (más de 2 sensibilizaciones) presentaban nivel de IgE sérica más elevados con significación estadística en adultos con asma alérgica persistente.

6.1. ESTUDIO GENETICO

En este trabajo se han estudiado 7 polimorfismos, 4 de ellos localizados en la región promotora del gen *PTGDR*: -613 C>T (rs34236606), -549 T>C (rs8004654), -441 C>T (rs803010) y -197 T>C (rs11157907), descritos anteriormente en la literatura por su asociación con la patología asmática y la alergia (212-214); además, a partir del análisis de las secuencias, hemos analizado una quinta variante génica, localizada a 95 pares de bases del inicio de la transcripción, correspondiente al polimorfismo -95G>T (rs41311438). Otro polimorfismo estaba localizado en la región promotora del gen *LTC4S*: A-444 A/C, que también se ha implicado en la genética del asma (206). Finalmente otro polimorfismo estaba localizado en la región codificante del gen *CYSLTR1*: 927 C/T (rs320995), descrito en la predisposición genética en el desarrollo del asma y la dermatitis atópica (209). Además, estos genes se eligieron por su participación en la etiopatogenia de las enfermedades alérgicas, como se

DISCUSIÓN

comentó en la introducción y se comentará de modo más sucinto a continuación.

Los 359 individuos que han participado en este estudio, de los cuales 195 fueron pacientes con rinitis alérgica y 164 fueron controles. Las variables analizadas, han originado un conjunto de datos; cuyo análisis será comentado a continuación para cada gen.

6.1.1. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN *PTGDR* CON LA RINITIS ALERGICA

Como se ha especificado, el receptor de la prostaglandina D2 (PGD₂), *PTGDR*, codificado por el gen homónimo, *PTGDR*, es responsable de algunas de las funciones efectoras de este mediador inflamatorio en el proceso fisiopatológico del asma y otras afecciones relacionadas, como la rinitis alérgica y la dermatitis atópica. Su activación contribuye a la vasodilatación pulmonar, la broncoconstricción, el reclutamiento de eosinófilos, linfocitos T y basófilos, y la potenciación de la síntesis de la propia PGD₂ (233). En la mucosa nasal la PGD₂ produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular produciéndose la síntesis *de novo* de otros mediadores, que actúan sobre los vasos sanguíneos y las glándulas induciendo congestión nasal y secreción de moco; se ha observado un aumento de los niveles de PGD₂ durante la fase tardía nasal de las provocaciones nasales (234).

Hemos encontrados varias asociaciones significativas de los polimorfismos localizados en la región promotora de este gen con distintas variables clínicas, pudiendo estar implicados estos SNP en la función de *PTGDR* y esta, a su vez, en el desarrollo de la rinitis alérgica.

6.1.2. POLIMORFISMO *PTGDR*-613C>T

El cambio de citosina por timina correspondiente al polimorfismo -613 de *PTGDR* (rs34236606), fue descrito por primera vez en una población infantil con asma (211) y posteriormente se ha confirmado su asociación con el asma (212, 214) y la poliposis nasal (161).

En nuestro grupo de pacientes con rinitis alérgica y antecedentes familiares de primer grado maternos se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas de este SNP. El genotipo homocigoto mutado (TT) fue más frecuente en los pacientes que en los

DISCUSIÓN

controles, esto implica que ser portador de este SNP puede suponer un incremento del riesgo de padecer rinitis alérgica.

En el trabajo llevado a cabo por Isidoro-García y cols. en 2011, se analizó la asociación de este SNP con el asma y la alergia (212); no se observó ninguna asociación significativa de este SNP con el asma, pero sí con la historia familiar de atopia y con la presencia de pruebas cutáneas positivas frente a ácaros y pólenes, tanto para la distribución genotípica como alélica de este polimorfismo. En estos pacientes se observó un aumento del alelo mutado T y de los genotipo portadores de este alelo CT y TT. Estos resultados concuerdan con los observados en el presente estudio y podrían indicar que la presencia del genotipo homocigoto mutado TT podría conllevar un cambio en la actividad promotora del gen que implicase una mayor actividad del mismo y esto, a su vez, podría estar relacionado con una mayor prevalencia de la enfermedad en este grupo de pacientes que comparte el fenotipo de atopia. De hecho, se ha descrito que la variante -613C<T es capaz de cambiar la afinidad de los factores de transcripción a esta región promotora y que esta posición coincide con una isla CpG que presenta distinto nivel de metilación entre la población control y los pacientes con asma alérgica (15).

6.1.3. POLIMORFISMO *PTGDR*-549T>C

Este polimorfismo, localizado a 549 pb del inicio de la transcripción de *PTGDR* (rs8004654), supone el cambio de una timina por una citosina en ese punto de la región promotora. En estudios previos se ha estudiado la asociación de este polimorfismo con el asma y la atopia (212, 214) sin obtener significación estadística en la distribución de las frecuencias alélicas ni genotípicas en este SNP (10). Tampoco se obtuvo significación con la poliposis nasal con asma bronquial, ni en intolerantes a AINE, ni en pacientes con triada del ASA (161).

En el estudio de Oguma y cols (235) donde los autores estudiaron la función de *PTGDR* en pacientes asmáticos, si bien sin especificar sensibilizaciones, se encontró una significación estadística también en el caso del genotipo TT que fue más frecuente en los controles que en los pacientes y también encontraron diferencias significativas en la actividad del promotor en el análisis de haplotipos. Además, los autores realizaron un estudio funcional de

DISCUSIÓN

la actividad promotora de los haplotipos TCT, TTT, CCC Y CCT encontrando que el haplotipo CCC era el que presenta una mayor actividad promotora y la presencia de al menos una copia de este haplotipo aumentaba significativamente el riesgo de desarrollar asma. Por su parte el haplotipo TCT era el que presentaba la menor actividad promotora y la presencia de al menos una copia de este haplotipo estaba significativamente asociada a un menor riesgo de desarrollar asma.

En nuestro grupo de pacientes con rinitis alérgica tanto en las frecuencias alélicas C y T como las frecuencias genotípicas CC, CT y TT no se observó ninguna significación en ninguna de las variables analizadas para este polimorfismo, concordando así estos resultados con los obtenidos previamente en otras poblaciones españolas con asma alérgica antedichas.

6.1.4. POLIMORFISMO *PTGDR*-441C>T

El polimorfismo *PTGDR*-441C>T (rs803010), supone el cambio de citosina por timina en dicha posición de la región promotora de *PTGDR*.

En este estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias alélicas entre los pacientes monosensibilizados y el grupo control, siendo el alelo mutado T más frecuente en los pacientes que en los controles.

Igualmente se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas entre los pacientes monosensibilizados y los controles: el genotipo mutado (TT) resulto más frecuente en los pacientes que en los controles.

También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes monosensibilizados a gramíneas, siendo, nuevamente, el alelo mutado T más frecuente en pacientes que en controles. Además se identificó en estos mismos casos, diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas en el genotipo homocigoto mutado (TT) que fue más frecuente en los pacientes que en los controles. Estos resultados podrían indicar que la presencia del alelo mutado T y/o del genotipo mutado TT podrían dar lugar a un cambio en la actividad promotora del gen que implicase una mayor actividad del mismo y esto, a su vez, podría estar

DISCUSIÓN

relacionado con una mayor prevalencia de la enfermedad en este grupo de pacientes que comparte el fenotipo de atopia.

En trabajos anteriores, se ha descrito una asociación significativa de los genotipos portadores de una o más copias del alelo T de este polimorfismo *PTGDR* -441 con un mayor riesgo de padecer asma (235). En este estudio se comparó una población asmática alérgica con dos grupos, uno de ellos caucásico y el otro afroamericano, evaluando las diferencias genéticas en las diferentes etnias y confirmándose que tanto la presencia del alelo mutado (T) como del genotipo homocigoto mutado (TT) era significativamente mayor en los pacientes con asma alérgica. En este trabajo se describió, además, cómo la presencia de este SNP daba lugar a cambios en los patrones de unión de factores transcripcionales a esta región promotora (235, 236). Estos resultados concuerdan con los nuestros y parecen indicar que la presencia del alelo mutado y/o del genotipo mutado puede influir en un mayor riesgo de desarrollar la RA y tal vez pudiera tener relación con el desarrollo de monosensibilización (en este caso a las gramíneas) en estos pacientes.

6.1.5. POLIMORFISMO *PTGDR*-197T>C

El polimorfismo *PTGDR* -197 (rs11157907) produce el cambio de timina por citosina en dicha posición de la región promotora de *PTGDR*. En este polimorfismo se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas, siendo el genotipo heterocigoto (CT) más frecuente en los pacientes con rinitis alérgica, con antecedentes familiares alérgicos (y dentro de estos los exclusivamente maternos), también en los pacientes con RA sin antecedentes familiares alérgicos, en los pacientes que tenían antecedentes personales de dermatitis atópica e igualmente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a gramíneas, a olivo, a abedul y en los pacientes polisensibilizados, todos estos grupos comparados con el grupo control. En gran parte estos resultados pueden estar relacionados entre sí, pero parecen indicar que la presencia de este polimorfismo podría estar aumentando el riesgo de presentar rinitis alérgica, y quizás más en algunos subgrupos concretos.

DISCUSIÓN

En otros trabajos realizados (212) también se encontró una amplia asociación de este SNP en la frecuencia del genotipo (CT) en pacientes con asma alérgica y no alérgica, con antecedentes familiares de asma y con antecedentes familiares de atopia. En este estudio, sin embargo, sus autores no encontraron una asociación estadísticamente significativa con las variables sensibilización a pólenes, ni a ácaros, indicando estos resultados que la asociación de este SNP parece tener más que ver con el asma.

6.1.6. POLIMORFISMO *PTGDR* -95G>T

En este estudio se analizó por primera vez en pacientes de origen caucásico con rinitis alérgica, un polimorfismo caracterizado por el cambio de la guanina de la posición -95 de la región promotora del gen *PTGDR* por una timina. Tanto en las frecuencias alélicas G y T como en las frecuencias genotípicas GG, GT y GT no se ha podido demostrar asociación estadísticamente significativa en nuestros pacientes. Esta variante del gen promotor de *PTGDR* sí que ha sido estudiada en pacientes con asma (237). En este estudio los autores realizaron comparaciones con las distintas etnias de pacientes americanos de origen portorriqueño, mejicano y afroamericano, siendo esta variante del promotor de *PTGDR* estudiada junto con otras once; de los 12 SNP que se identificaron, seis se describieron como nuevos polimorfismos, entre ellos el de la posición -95 de la región promotora de este gen. Sin embargo, ninguna de estas nuevas variantes fue incluida en el estudio de asociación con el asma, dada su baja frecuencia, menor del 5 % en el conjunto de las tres poblaciones estudiadas en dicho trabajo.

6.2. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN *LTC4S* CON LA RINITIS ALERGICA

Los leucotrienos son importantes mediadores implicados en la fisiopatología del asma y la RA. La LTC₄ sintasa es la enzima más importante de la vía de los leucotrienos y el polimorfismo -444 A/C del gen *LTC4* se ha implicado en el desarrollo de asma.

6.2.1. POLIMORFISMO *LTC4S* -444A/C

Este polimorfismo del gen *LTC4S*, se produce por un cambio de adenina por citosina en la región promotora de dicho gen.

Isidoro-Garcia y cols (238), encontraron significación estadística al comparar la distribución genotípica del polimorfismo -444A/C entre en una población española de pacientes asmáticos y de controles.

Sanak y cols (239) estudiaron este gen en pacientes con asma inducida por aspirina, y observaron un incremento estadísticamente significativo del alelo C en los pacientes respecto a los controles. Estos resultados pueden sugerir que la presencia de alelo C podría provocar modificación transcripcional que dé lugar a un mayor riesgo de desarrollar asma.

En un estudio realizado por Eskandari y cols (208) en pacientes con RA se observó una asociación entre este SNP y la RA al observar que las frecuencias genotípicas (AC y CC) fueron significativamente más frecuentes en los pacientes con RA.

En este estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas consistentes para las frecuencias alélicas ni genotípicas de este polimorfismo entre los controles y los distintos grupos de pacientes.

6.3. ASOCIACIÓN GENICA DEL GEN *CYSLTR1* CON LA RINITIS ALERGICA

Los leucotrienos cisteinílicos ejercen su acción a través de los receptores *CYSLTR1* y *CYSLTR2*; la activación de *CYSLTR1* por el *LTC4* produce contracción y proliferación del musculo liso y edema y migración de los eosinófilos al pulmón, y se ha observado expresión de estos receptores en las células epiteliales de la mucosa nasal en pacientes con rinitis (240).

6.3.1. POLIMORFISMO *CYSLTR1* 927C>T

En este estudio se analizó este polimorfismo, caracterizado por el cambio de la citosina de la posición 927 de la región codificante del gen *CYSLTR1* por una timina. Al estar localizado en el cromosoma X el análisis de este polimorfismo se realizó por separado en la población masculina y en la femenina. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna las variables analizadas: ni en los antecedentes familiares, ni en los antecedentes de atopia,

DISCUSIÓN

ni en ninguna de las pruebas cutáneas positivas a ningún alérgeno. Tanto en las frecuencias alélicas C y T como las frecuencias genotípicas CC, CT y TT no se pudo demostrar asociación estadísticamente significativa en nuestros pacientes.

El grupo español de Arriba y cols (241) demostraron que había una asociación significativa entre los varones portadores del alelo C con el desarrollo de asma persistente en población infantil. Sin embargo, Zhang y cols (174) estudiaron este polimorfismo y otros 3 más (c.-618-434T/C, c.-618-275C/A, c.-618-136G/A) del gen *CYSLTR1* y no encontraron ninguna asociación con el asma ni con la rinitis. No hemos encontrado estudios en rinitis alérgica.

6.4. ESTUDIO DE LOS HAPLOTIPOS

Todos los trabajos realizados anteriormente de los haplotipos del gen *PTGDR* se han estudiado en pacientes con asma (211-213, 236); en estos pacientes se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con los haplotipos TCCTG, CTCT TCCT en relación a la sensibilización a ácaros del polvo.

En otros estudios realizados en pacientes con poliposis nasal (161) en los que aproximadamente un tercio de los pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas, se encontró una asociación con el diplotipo CCCT/CCCC, pero no encontraron asociaciones significativas con los haplotipos, con lo cual no disponemos de estudios comparativos en pacientes con RA para poder comparar nuestros resultados.

En nuestro estudio de los haplotipos del gen *PTGDR* se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución de las frecuencias del haplotipo TTTTG, que se observó con mayor frecuencia en los pacientes que en los controles en los siguientes grupos clínicos: pacientes con pruebas cutáneas positivas al platanero y en los pacientes monosensibilizados a olivo. No obstante, estos resultados deben de ser considerados con mucha cautela, dado el limitado tamaño muestral

Igualmente, el haplotipo CTTTT se ha observado con mayor frecuencia en los pacientes con RA que en los controles e igualmente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al olivo y en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al abedul. En estos casos rigen las mismas circunstancias anteriormente señaladas.

DISCUSIÓN

Por su parte, el haplotipo CTTTG fue más frecuente en los pacientes monosensibilizados que en el grupo control, también con un tamaño muestral limitado.

Este grupo de haplotipos, no obstante, tienen en común el hecho de compartir la T en los SNP -549, -441 y -197, por lo que esta combinación podría estar relacionada con un mayor riesgo de padecer rinitis alérgica en pacientes monosensibilizados y con pruebas cutáneas positivas a los árboles del olivo y abedul.

En el caso del haplotipo CTCCG, que resultó significativamente más frecuente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al platanero que en el grupo control. Además, se detectó una asociación estadísticamente significativa en la distribución del haplotipo TCCCG, que fue más frecuente que en el grupo control. Aunque en este grupo de pacientes los haplotipos comparten la C en las posiciones -441 y -197 y la G en la posición -95, el tamaño muestral impide sacar conclusión alguna.

Por el contrario, los siguientes haplotipos se han observado más en controles que en pacientes, por lo que podrían sugerir un efecto protector de los mismos:

- El haplotipo CCCTG fue significativamente menos frecuente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas al *Chenopodium*.
- El haplotipo CTCTG fue menos frecuente entre los pacientes monosensibilizados.

Estos dos grupos comparten en los haplotipos la C en -613 y -441, pudiendo tener esta combinación un efecto protector y evitar en los pacientes el riesgo de desarrollar rinitis alérgica, si bien también en esta ocasión rigen las circunstancias anteriormente mencionadas.

En un estudio de haplotipos de *PTGDR* realizado en pacientes asmáticos con sensibilización a ácaros y pólenes (213) se detectó una mayor frecuencia de los haplotipos TCCTG (-613/-549/-441/-197/-95) y TCCT (-613/-441/-197). Posiblemente, en estos haplotipos de *PTGDR* la presencia de T en -613 podría suponer aumento del riesgo de asma en pacientes alérgicos y la T en -549, -441 podría suponer aumento del riesgo de rinitis alérgica.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Entre las limitaciones del presente estudio cabe señalar que el número de casos válidos se redujo bastante al subagrupar algunas variables clínicas: este hecho fue, como se ha insistido, más notable en los estudios de haplotipos, por lo que los resultados obtenidos en este apartado deberían tomarse con precaución y confirmarse en poblaciones de mayor tamaño.

Otra limitación puede haber sido el número de pacientes con rinitis alérgica (n=195); en principio se podría pensar que es una n pequeña, respecto a otros trabajos, pero en este caso se ha seguido unos criterios muy estrictos en la selección de los pacientes, excluyendo rigurosamente que tuviesen asma y que presentasen sensibilización a alérgenos perennes (ácaros, hongos y epitelios). Debido a estos motivos el tamaño muestral se redujo, pero se prefirió realizar una selección más estricta de pacientes con rinitis alérgica exclusivamente por pólenes.

Otro posible factor limitante es que no se ha realizado un diagnóstico molecular, por lo que la reactividad cruzada puede haber influido en el número de sensibilizaciones. No obstante, se evaluó la sensibilización a profilina, que apareció en un 16 % de la muestra, por lo que es posible que no hubiera demasiada reactividad cruzada, aunque otras fuentes no están descartadas. De todos modos, para evitar este problema, la comparación se realizó entre pacientes monosensibilizados a un polen frente a pacientes polisensibilizados minimizando así el problema.

Por último, aunque para la mayor parte de los genes implicados no se hayan encontrado asociaciones estadísticamente significativas, creemos que es importante presentar los resultados negativos, para evitar así el sesgo de publicación.



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con RA la detección de valores elevados de IgE parece asociarse a una mayor gravedad de la RA y a un mayor riesgo de presentar polisensibilización.
2. El polimorfismo -197T>C del gen *PTGDR* se asoció con la RA por hipersensibilidad a pólenes. Dicha asociación ha sido identificada previamente en población de pacientes con asma y especialmente en aquellos con asma alérgica, resaltando la importancia de este gen en estudios genéticos de asociación con sensibilización alérgica.
3. En nuestra población de pacientes con RA el polimorfismo -197T>C del gen *PTGDR* se asoció con la polisensibilización, mientras que el polimorfismo -441 se asoció con la monosensibilización. Este resultado parece indicar que las distintas variantes génicas de la región promotora de *PTGDR* podrían relacionarse con distintos tipos de sensibilizaciones.
4. Las combinaciones haplotípicas del gen *PTGDR* que comparten la T en las posiciones -549, -441 y -197 podrían estar relacionadas con un mayor riesgo de padecer rinitis alérgica en pacientes monosensibilizados y con la presencia de pruebas cutáneas positivas a los pólenes de olivo y abedul, si bien, debido al reducido número de casos presentes en nuestra población, esta conclusión debería confirmarse en estudios con un mayor tamaño muestral.
5. Las asociaciones detectadas permiten identificar un aumento en el riesgo de padecer rinitis alérgica con sensibilización a pólenes en los individuos portadores de algunas variantes génicas en la región promotora del gen *PTGDR*. Este riesgo podría ser debido a las modificaciones que las variantes polimórficas inducen en la unión de los factores de transcripción determinantes de la expresión del gen *PTGDR*, lo que refuerza la propuesta de esta región promotora como posible diana terapéutica.

CONCLUSIONES

6. No se han detectado asociaciones significativas en ninguno de los grupos clínicos para los polimorfismos -444A/C del gen *LTC4S* ni 927C/T del gen *CYSLTR1*, por lo que la presencia de dichas variantes no parece suponer un factor de riesgo en el desarrollo de RA ni de ninguno de los subgrupos clínicos analizados.



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

APÉNDICE

8. APÉNDICE

➤ **FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS DE LOS PACIENTES**

PACIENTE:

Nº

-Antecedentes familiares atópicos

- NO SI 1GRADO PADRE MADRE
 2GRADO PADRE MADRE

-Antecedentes Personales de atopia: Dermatitis atópica

- NO SI

-Pruebas cutáneas con pólenes ambientales: positivas IgE específica

GRAMÍNEAS CULTIVADAS		
GRAMÍNEAS SALVAJES		
OLEA EUROPEA		
PLATANUS ACERIFOLIA		
CUPRESUS ARIZONICA		
BETULA VERRUCOSA		
QUERQUS ILEX		
ARTEMISIA VULGARIS		
PLANTAGO OVALATA		
CHENOPODIUM ALBUM		
PARIETARIA JUDAICA		
SALSOLA KALI		
PROFILINA		
LTP		

-IgE total:

-Espirometría basal con broncodilatación:

-Prueba de hiperreactividad bronquial SI NO

APÉNDICE

➤ BATERÍA ESTÁNDAR DE AEROALÉRGENOS EMPLEADA EN LAS PRUEBAS CUTÁNEAS (ALK-ABELLÓ, MADRID, ESPAÑA)

Control Positivo	Histamina 10 mg/ml
Control Negativo	Solución salina
ÁCAROS	<i>Dermatophagoides pteronissynuss</i> <i>Dermatophagoides farinae</i> <i>Lepidoglyphus destructor</i>
HONGOS	<i>Alternaria alternata</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
PÓLENES	Gramíneas salvajes Gramíneas cultivadas <i>Olea europea</i> <i>Platanus acerifolia</i> <i>Cupresus arizonica</i> <i>Betula verrucosa</i> <i>Quercus ilex</i> <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Plantago ovalata</i> <i>Chenopodium album</i> <i>Parietaria judaica</i> <i>Salsola kali</i>
Profilina	
LTP	
EPITELIOS	Perro Gato



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Pelta R, Negro J. Rinitis Alergica Mecanismos y tratamiento. mra ediciones ed2004. 13-24.
2. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz A, Denburg J, Fokkens W, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008. *Allergy*. 2008;63(s86):8-160.
3. Simons F, Estelle F. EDS. Ancestor of Allergy1994.
4. Soubiran A, De Kearney J. El Diario de la Medicina1963.
5. Folch G, Suñe J, Valverde J, Puerto F. Historia General de la Farmacia (el medicamento a través del tiempo)1986.
6. López Piñeiro J. La Medicina en la historia. 2002.
7. Sanchez-Cuenca B. Polinosis(Asma de heno). Estudio botánico y clínico del problema1934.
8. Bostock J. Of the Catharrus Aestivus or Summer Catarrh. *Med Chir Trans London* 1828. p. 437.
9. Blackley C. Experimental Researches on the Causes and Natura of Catarrhus Aestivus.1873.
10. Farmer L, Hexter G. ¿Cuál es su alergia? . Colección Austral Madrid: Espasa-Calpe 1953.
11. Allemany Vall R, Planas J, Parés R. Fiebre del heno por *Parietaria Officinalis* en Barcelona1949. 3 p.
12. Peláez A, Morales C. Tratado de Alergología. Ergon ed2007. 493-516 p.
13. Lund V. Report of the international rhinitis management working group. *Allergy*. 1994;91:1-34.
14. Van-Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Bousquet J, Canonica G, Durham S, et al. Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. EAACI Position paper. *Allergy*. 2000;55:116-34.
15. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz A, Denburg J, Fokkens W, Togias A, et al. World health organization; GALEN (2) ; AllerGen. allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the world health organization, GA (2) LEN and AllerGen). 2008.

BIBLIOGRAFÍA

16. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A, Tosca M, Passalacqua G, Pallesstrini E, et al. Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? *Allergy*. 2005;60(7):882-7.
17. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334.
18. Bousquet J, Schunemann HJ, Samolinski B, Demoly P, Baena-Cagnani CE, Bachert C, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA): achievements in 10 years and future needs. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1049-62.
19. Valero A, Munoz-Cano R, Sastre J, Navarro AM, Marti-Guadano E, Davila I, et al. The impact of allergic rhinitis on symptoms, and quality of life using the new criterion of ARIA severity classification. *Rhinology*. 2012 Mar;50(1):33-6.
20. del Cuvillo A, Montoro J, Bartra J, Valero A, Ferrer M, Jáuregui I, et al. Validation of ARIA duration and severity classifications in Spanish allergic rhinitis patients the ADRIAL cohort study. *Rhinology*. 2010;48(2):201.
21. Valero A, Ferrer M, Sastre J, Navarro AM, 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;120(2):359-65.
22. Valero A, Ferrer M, Baró E, Sastre J, Navarro A, Martí-Guadaño E, et al. Discrimination between moderate and severe disease may be used in patients with either treated or untreated allergic rhinitis. *Allergy*. 2010;65(12):1609-13.
23. Montoro J, Del Cuvillo A, Mullol J, Molina X, Bartra J, Dávila I, et al. Validation of the modified allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) severity classification in allergic rhinitis children: the PEDRIAL study. *Allergy*. 2012;67(11):1437-42.
24. Gregory C, Cifaldi M, Tanner LA. Targeted intervention programs: creating a customized practice model to improve the treatment of allergic rhinitis in a managed care population. *The American journal of managed care*. 1999;5(4):485-96.

BIBLIOGRAFÍA

25. Lundbäck B. Epidemiology of rhinitis and asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1998;28:3-10.
26. Charpin D, Sibbald B, Weeke E, Wüthrich B. Epidemiologic identification of allergic rhinitis. *Allergy*. 1996;51(5):293-8.
27. Zacharasiewicz A, Douwes J, Pearce N. What proportion of rhinitis symptoms is attributable to atopy? *Journal of clinical epidemiology*. 2003;56(4):385-90.
28. Tschopp J, Sistek D, Schindler C, Leuenberger P, Perruchoud A, Wüthrich B, et al. Current allergic asthma and rhinitis: diagnostic efficiency of three commonly used atopic markers (IgE, skin prick tests, and Phadiatop®). *Allergy*. 1998;53(6):608-13.
29. Kurz T, Altmueller J, Strauch K, Rüschenhoff F, Heinzmann A, Moffatt M, et al. A genome-wide screen on the genetics of atopy in a multiethnic European population reveals a major atopy locus on chromosome 3q21. *Allergy*. 2005;60(2):192-9.
30. Lee HM, Park SA, Chung SW, Woo JS, Chae SW, Lee SH, et al. Interleukin-18/-607 gene polymorphism in allergic rhinitis. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2006;70:1085-8.
31. Joki-Erkkilä V-P, Karjalainen J, Hulkkonen J, Pessi T, Nieminen MM, Aromaa A, et al. Allergic rhinitis and polymorphisms of the interleukin 1 gene complex. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2003;91(3):275-9.
32. Barnes K, Marsh D. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today*. 1998;19:325-32.
33. Kabesch M, Depner M, Dahmen I, Weiland S, Vogelberg C, Niggemann B, et al. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. *Allergy*. 2007;62(4):423-8.
34. Andiappan AK, Nilsson D, Hallden C, Yun WD, Sall T, Cardell LO, et al. Investigating highly replicated asthma genes as candidate genes for allergic rhinitis. *BMC medical genetics*. 2013;14:51.
35. Platts-Mills TA. The allergy epidemics: 1870-2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(1):3-13.
36. Strachan D. Is allergic disease programmed in early life? *Clin Exp Allergy*. 1994;24:603-5.

BIBLIOGRAFÍA

37. Holt PG, Strickland DH. Soothing signals: transplacental transmission of resistance to asthma and allergy. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(13):2861-4.
38. Åberg N. Birth season variation in asthma and allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*. 1989;19(6):643-8.
39. Bellanti JA, Wallerstedt DB, editors. Allergic rhinitis update: epidemiology and natural history. *Allergy and Asthma Proceedings*; 2000: OceanSide Publications, Inc.
40. Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Halonen M, Morgan W, Taussig LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics*. 1994 Dec;94(6 Pt 1):895-901.
41. Svanes C, Jarvis D, Chinn S, Burney P. Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Mar;103(3 Pt 1):415-20.
42. Ramasamy A, Curjuric I, Coin LJ, Kumar A, McArdle WL, Imboden M, et al. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Nov;128(5):996-1005.
43. Gillam SJ, Jarman B, White P, Law R. Ethnic differences in consultation rates in urban general practice. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989 Oct 14;299:953-7.
44. Tedeschi A, Barcella M, Dal Bo G, Miadonna A. Onset of allergy and asthma symptoms in extra-European immigrants to Milan, Italy: possible role of environmental factors. *Clinical & Experimental Allergy*. 2003;33(4):449-54.
45. Meseguer J, Caravaca F, Ortiz J, Negro J. Rinitis Alérgica Mecanismos y tratamiento 2ª Edición 2004. 25-32 .
46. Bunyavanich S, Shargorodsky J, Celedón JC. A meta-analysis of Th2 pathway genetic variants and risk for allergic rhinitis. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(4):378-87.
47. Savolainen J, Viander M, Koivikko A. IgE-, IgA- and IgG-antibody responses to carbohydrate and protein antigens of *Candida albicans* in asthmatic children. *Allergy*. 1990;45(1):54-63.

BIBLIOGRAFÍA

48. Johansson S, Hourihane JB, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001;56(9):813-24.
49. Gordon S, Jones M, Tee R, Newman Taylor A. Review: The biochemistry of common aeroallergens. CA Stewart and PJ Thompson, September 1996; 26: 1020–44. *Clinical & Experimental Allergy*. 1997;27(6):714.
50. Kellberger J, Dressel H, Vogelberg C, Leupold W, Windstetter D, Weinmayr G, et al. Prediction of the incidence and persistence of allergic rhinitis in adolescence: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb;129(2):397-402.
51. Sposato B, Liccardi G, Russo M, Folletti I, Siracusa A, Scichilone N, et al. Cypress pollen: an unexpected major sensitizing agent in different regions of Italy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(1):23-8.
52. Chen W-Y, Tseng H-I, Wu M-T, Hung H-C, Wu H-T, Chen H-L, et al. Synergistic effect of multiple indoor allergen sources on atopic symptoms in primary school children. *Environmental research*. 2003;93(1):1-8.
53. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;160(1):1-9.
54. Molfino NA, Slutsky AS, Zamel N. The effects of air pollution on allergic bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1992 Jul;22(7):667-72.
55. Baldini M, Carla Lohman I, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1999;20(5):976-83.
56. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy*. 1999 Jan;29(1):28-34.
57. Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *The lancet*. 1997;350(9071):85-90.

BIBLIOGRAFÍA

58. Bibi H, Shoseyov D, Feigenbaum D, Nir P, Shiachi R, Scharff S, et al. Comparison of positive allergy skin tests among asthmatic children from rural and urban areas living within small geographic area. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2002;88(4):416-20.
59. Maio S, Simoni M, Baldacci S, Sherrill D, Viegi G. Indoor Air Pollution and Airway Disease. *Allergy Frontiers: Epigenetics, Allergens and Risk Factors*: Springer; 2009. p. 387-401.
60. Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Garcia R, Sanchez G, Barragan G, Camacho R, et al. Human nasal mucosal changes after exposure to urban pollution. *Environmental health perspectives*. 1994 Dec;102(12):1074-80.
61. Keles N, Ilicali C, Deger K. The effects of different levels of air pollution on atopy and symptoms of allergic rhinitis. *American journal of rhinology*. 1999 May-Jun;13(3):185-90.
62. Corbo GM, Forastiere F, Dell'Orco V, Pistelli R, Agabiti N, De Stefanis B, et al. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(4):616-23.
63. Wongsurakiat P, Maranetra KN, Nana A, Naruman C, Aksornint M, Chalermpanyakorn T. Respiratory symptoms and pulmonary function of traffic policemen in Thonburi. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet thangphaet*. 1999;82(5):435-43.
64. Liao MF, Liao MN, Lin SN, Chen JY, Huang JL. Prevalence of allergic diseases of schoolchildren in central taiwan. From ISAAC surveys 5 years apart. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*. 2009;46(6):541-5.
65. Shusterman DJ, Murphy MA, Balmes JR. Subjects with seasonal allergic rhinitis and nonrhinitic subjects react differentially to nasal provocation with chlorine gas. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101:732-40.
66. Murray AB, Morrison BJ. It is children with atopic dermatitis who develop asthma more frequently if the mother smokes. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;86(5):732-9.
67. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto J, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. 2006;27(3):542-6.

BIBLIOGRAFÍA

68. Corbo G, Forastiere F, Agabiti N, Dell'Orco V, Pistelli R, Aebischer M, et al. Effect of gas cooking on lung function in adolescents: modifying role of sex and immunoglobulin E. *Thorax*. 2001;56(7):536-40.
69. Von Mutius E, Illi S, Nicolai T, Martinez FD. Relation of indoor heating with asthma, allergic sensitisation, and bronchial responsiveness: survey of children in south Bavaria. *BMJ (Clinical research ed)*. 1996;312:1448-50.
70. Saxon A, Diaz-Sanchez D. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nature immunology*. 2005;6(3):223-6.
71. Riedl M, Diaz-Sanchez D. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):221-8.
72. Kongerud J, Madden MC, Hazucha M, Peden D. Nasal responses in asthmatic and nonasthmatic subjects following exposure to diesel exhaust particles. *Inhalation toxicology*. 2006;18(9):589-94.
73. Mamessier E, Nieves A, Vervloet D, Magnan A. Diesel exhaust particles enhance T-cell activation in severe asthmatics. *Allergy*. 2006;61(5):581-8.
74. Knox R, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson H, Peng J, et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clinical & Experimental Allergy*. 1997;27(3):246-51.
75. Lubitz S, Schober W, Pusch G, Effner R, Klopp N, Behrendt H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel emissions exert proallergic effects in birch pollen allergic individuals through enhanced mediator release from basophils. *Environmental toxicology*. 2010;25(2):188-97.
76. Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;95(1):103-15.
77. Bartra J, Mullol J, Del Cuvillo A, Dávila I, Ferrer M, Jáuregui I, et al. Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(Suppl 2):3-8.
78. Oryszczyn M-P, Annesi-Maesano I, Charpin D, Paty E, Maccario J, Kauffmann F. Relationships of active and passive smoking to total IgE in adults of the Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(4):1241-6.

BIBLIOGRAFÍA

79. Lin SY, Reh DD, Clipp S, Irani L, Navas-Acien A. Allergic rhinitis and secondhand tobacco smoke: a population-based study. *American journal of rhinology & allergy*. 2011;25(2):e66-71.
80. Calverley AE, Rees D, Dowdeswell RJ, Linnett PJ, Kielkowski D. Platinum salt sensitivity in refinery workers: incidence and effects of smoking and exposure. *Occupational and environmental medicine*. 1995;52(10):661-6.
81. Vinke JG, KleinJan A, Severijnen LW, Fokkens WJ. Passive smoking causes an 'allergic' cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 1999;51(2):73-81.
82. Weiland SK, Mundt KA, Ruckmann A, Keil U. Self-reported wheezing and allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence. *Annals of epidemiology*. 1994;4(3):243-7.
83. Leaderer BP, Belanger K, Triche E, Holford T, Gold DR, Kim Y, et al. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. *Environmental health perspectives*. 2002;110(4):419.
84. D'amato G, Cecchi L. Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*. 2008;38(8):1264-74.
85. García-Mozo H, Galán C, Jato V, Belmonte J, de la Guardia CD, Fernández D, et al. Quercus pollen season dynamics in the Iberian Peninsula: response to meteorological parameters and possible consequences of climate change. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2006;13(2):209.
86. Ziska LH, Gebhard DE, Frenz DA, Faulkner S, Singer BD, Straka JG. Cities as harbingers of climate change: common ragweed, urbanization, and public health. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(2):290-5.
87. D'amato G, Cecchi L, D'amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2010;20(2):95-102.
88. Ariano R, Canonica GW, Passalacqua G. Possible role of climate changes in variations in pollen seasons and allergic sensitizations during 27 years. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2010;104(3):215-22.

BIBLIOGRAFÍA

89. Jessen M, Malrn L. Definition, prevalence and development of nasal obstruction. *Allergy*. 1997;52(s40):3-6.
90. Katelaris C, Lee B, Potter P, Maspero J, Cingi C, Lopatin A, et al. Prevalence and diversity of allergic rhinitis in regions of the world beyond Europe and North America. *Clinical & Experimental Allergy*. 2012;42(2):186-207.
91. Strachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 1997;8(4):161-76.
92. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet*. 2006;368(9537):733-43.
93. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *The European respiratory journal*. 1996;9(4):687-95.
94. Bauchau V, Durham S. Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis. *Allergy*. 2005;60(3):350-3.
95. Azpiri A, Alonso E, Gamboa P, Jauregui I, Antepará I, Fernández E, et al. Prevalence of pollinosis in the Basque Country. *Allergy*. 1999;54(10):1100-4.
96. Navarro A, Colas C, Anton E, Conde J, Davila I, Dordal MT, et al. Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: *Alergologica-2005*. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19 Suppl 2:7-13.
97. Jáuregui I, Dávila I, Sastre J, Bartra J, del Cuvillo A, Ferrer M, et al. Validation of ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) classification in a pediatric population: the PEDRIAL study. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(4):388-92.
98. Rondon C, Campo P, Togias A, Fokkens WJ, Durham SR, Powe DG, et al. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):

BIBLIOGRAFÍA

99. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. *Current allergy and asthma reports*. 2005;5(3):252-8.
100. Skoner DP. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;108(1):S2-S8.
101. Romagnani S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy*. 2006;61(1):3-14.
102. Smurthwaite L, Walker SN, Wilson DR, Birch DS, Merrett TG, Durham SR, et al. Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients. *European journal of immunology*. 2001;31(12):3422-31.
103. Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, Fear DJ, Banfield GK, Carr VA, et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *The Journal of Immunology*. 2005;174(8):5024-32.
104. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S73-S80.
105. Zubeldia JM, Senent CJ, Baeza IJtML. Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA: Fundacion BBVA; 2012.
106. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(5):997-1008.
107. Francis J, Lloyd C, Sabroe I, Durham S, Till S. T lymphocytes expressing CCR3 are increased in allergic rhinitis compared with non-allergic controls and following allergen immunotherapy. *Allergy*. 2007;62(1):59-65.
108. Toppila-Salmi S, van Drunen CM, Fokkens WJ, Golebski K, Mattila P, Joenvaara S, et al. Molecular mechanisms of nasal epithelium in rhinitis and rhinosinusitis. *Current allergy and asthma reports*. 2015;15(2):1-9.
109. Mulla J, Valero A. Actualización 2008 de ARIA. Manejo de la rinitis alérgica y su repercusión en el asma. 2012.
110. de Pediatría SA, Subcomisiones C. Consenso nacional de rinitis alérgica en pediatría. *Arch Argent Pediatr*. 2009;107(1):67-81.
111. Pawankar R. Mast cells in allergic airway disease and chronic rhinosinusitis. 2005.

BIBLIOGRAFÍA

112. Nouri-Aria KT, Pilette C, Jacobson MR, Watanabe H, Durham SR. IL-9 and c-Kit+ mast cells in allergic rhinitis during seasonal allergen exposure: effect of immunotherapy. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(1):73-9.
113. Eliashar R, Levi-Schaffer F. The role of the eosinophil in nasal diseases. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2005;13(3):171-5.
114. Quraishi SA, Davies MJ, Craig TJ. Inflammatory responses in allergic rhinitis: traditional approaches and novel treatment strategies. *Journal-American Osteopathic Association*. 2004:S7-S15.
115. Peters-Golden M, Gleason M, Togias A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2006;36(6):689-703.
116. Oehling AG, Pascual MJ. *Tratado de Alergología*. Ergon ed2007. 538-40.
117. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(6):1958-62.
118. Lee T, Ying S, Meng Q, Corrigan C. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(1):S292.
119. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*. 2006;38(4):441-6.
120. Basu K, Palmer C, Lipworth B, Irwin McLean W, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma exacerbations in children and young adults. *Allergy*. 2008;63(9):1211-7.
121. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet*. 2005;46(1):93-104.
122. Gohlke H, Illig T, Bahnweg M, Klopp N, André E, Altmüller J, et al. Association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(11):1217-23.

BIBLIOGRAFÍA

123. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nature genetics*. 2003;35(3):258-63.
124. Yang K, Liu CA, Chang JC, Chuang H, Ou CY, Hsu TY, et al. Polymorphism of the immune-braking gene CTLA-4 (+ 49) involved in gender discrepancy of serum total IgE levels and allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*. 2004;34(1):32-7.
125. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and immunity*. 2006;7(2):95-100.
126. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *Journal of Allergy and clinical Immunology*. 2004;114(1):80-7.
127. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):747.
128. Cameron L, Webster RB, Strepel JM, Kiesler P, Kabesch M, Ramachandran H, et al. Th2 cell-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C> T, a polymorphism associated with allergic inflammation. *The Journal of Immunology*. 2006;177(12):8633-42.
129. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, et al. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(4):965-9.
130. Walley AJ, Chavanas S, Moffatt MF, Esnouf RM, Ubhi B, Lawrence R, et al. Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nature genetics*. 2001;29(2):175-8.
131. Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Sylvia JS, Lazarus R, Drazen JM, Lange C, et al. Family-based association analysis of β 2-adrenergic receptor polymorphisms in the childhood asthma management program. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(5):870-6.
132. Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, Shibuya K, Shibuya A, Bannai M, et al. Positional identification of an asthma susceptibility gene on human

BIBLIOGRAFÍA

- chromosome 5q33. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005;172(2):183-8.
133. Witte JS, Palmer LJ, O'connor R, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFa-308 and risk of asthma. Eur J Hum Genet. 2002;10(1):82-5.
134. Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005;172(6):687-92.
135. Shiina T, Inoko H, Kulski J. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. Tissue antigens. 2004;64(6):631-49.
136. Wang TN, Chen WY, Wang TH, Chen CJ, Huang LY, Ko YC. Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: tumour necrosis factor- α -308 and lymphotoxin- α -Ncol in Taiwan's children. Clinical & Experimental Allergy. 2004;34(2):184-8.
137. Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. The American Journal of Human Genetics. 2005;76(2):349-57.
138. Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petäys T, et al. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. Nature genetics. 2001;28(1):87-91.
139. Pykäläinen M, Kinos R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. Journal of allergy and clinical immunology. 2005;115(1):80-7.
140. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, et al. Association between atopy and variants of the β subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. Nature genetics. 1994;7(2):125-30.
141. Blumenthal JB, Blumenthal MN. Genetics of asthma. Medical Clinics of North America. 2002;86(5):937-50.

BIBLIOGRAFÍA

142. Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, et al. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nature genetics*. 2009;41(5):596-601.
143. Brasch-Andersen C, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers. *Human mutation*. 2004;24(3):208-14.
144. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, et al. Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(1):117-22.
145. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res*. 2003;4(1):14.
146. Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nature genetics*. 2003;34(2):181-6.
147. 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;59(10):876-82.
148. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Human molecular genetics*. 2004;13(4):397-403.
149. Wei X, Zhang Y, Fu Z, Zhang L. The Association between Polymorphisms in the MRPL4 and TNF- α Genes and Susceptibility to Allergic Rhinitis. *PloS one*. 2013;8(3):e57981.
150. Jongepier H, Boezen H, Dijkstra A, Howard T, Vonk J, Koppelman G, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2004;34(5):757-60.
151. Andiappan AK, Wang DY, Anantharaman R, Parate PN, Suri BK, Low HQ, et al. Genome-wide association study for atopy and allergic rhinitis in a Singapore Chinese population. *PloS one*. 2011;6(5):e19719.

BIBLIOGRAFÍA

152. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(5):356-69.
153. Nilsson D, Andiappan AK, Halldén C, Tim CF, Säll T, Wang DY, et al. Poor reproducibility of allergic rhinitis SNP associations. *PloS one*. 2013;8(1):e53975.
154. Dávila I, Isidoro M. Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA: Fundacion BBVA; 2012.
155. Bonnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP, Alves AC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nature genetics*. 2013 Aug;45(8):902-6.
156. Nilsson D, Henmyr V, Halldén C, Säll T, Kull I, Wickman M, et al. Replication of genomewide associations with allergic sensitization and allergic rhinitis. *Allergy*. 2014;69(11):1506-14.
157. Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68(1):92-100.
158. Li J, Zhang Y, Zhang L. Discovering susceptibility genes for allergic rhinitis and allergy using a genome-wide association study strategy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2015;15(1):33-40.
159. Bunyavanich S, Schadt EE, Himes BE, Lasky-Su J, Qiu W, Lazarus R, et al. Integrated genome-wide association, coexpression network, and expression single nucleotide polymorphism analysis identifies novel pathway in allergic rhinitis. *BMC medical genomics*. 2014;7(1):48.
160. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S81-S94.
161. Pescador DB, Isidoro-García M, García-Solaesa V, de Pedro MP, Sanz C, Hernández-Hernández L, et al. Genetic association study in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):331-40.
162. Yazdani N, Amoli M, Naraghi M, Mersaghian A, Firouzi F, Sayyahpour F, et al. Association Between the Functional Polymorphism C-159T in the CD14 Promoter Gene and Nasal Polyposis: Potential Role in Asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2012;22(6):406.

BIBLIOGRAFÍA

163. Kayserova J, Sismova K, Zentsova-Jaresova I, Katina S, Vernerova E, Polouckova A, et al. 3 A Prospective Study in Children With a Severe Form of Atopic Dermatitis: Clinical Outcome in Relation to Cytokine Gene Polymorphisms. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2012;22(2):92.
164. Gharagozlou M, Farhadi E, Khaledi M, Behniafard N, Sotoudeh S, Salari R, et al. Association Between the Interleukin 6 Genotype at Position-174 and Atopic Dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):89-93.
165. Dávila I, Mullol J, Ferrer M, Bartra J, Del Cuvillo A, Montoro J, et al. Genetic aspects of allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(Suppl 1):25-31.
166. Andiappan AK, Nilsson D, Halldén C, De Yun W, Säll T, Cardell LO, et al. Investigating highly replicated asthma genes as candidate genes for allergic rhinitis. *BMC medical genetics*. 2013;14(1):51.
167. Steinke JW, Borish L, Rosenwasser LJ. 5. Genetics of hypersensitivity. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(2):S495-S501.
168. Haagerup A, Borglum AD, Binderup HG, Kruse TA. Fine-scale mapping of type I allergy candidate loci suggests central susceptibility genes on chromosomes 3q, 4q and Xp. *Allergy*. 2004;59:88-94.
169. Dizier MH, Bouzigon E, Guilloud-Bataille M, Betard C, Bousquet J, Charpin D, et al. Genome screen in the French EGEA study: detection of linked regions shared or not shared by allergic rhinitis and asthma. *Genes and immunity*. 2005;6:95-102.
170. Bu LM, Bradley M, Soderhall C, Wahlgren CF, Kockum I, Nordenskjold M. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosome 21 in a Swedish population. *Allergy*. 2006;61:617-21.
171. Brasch-Andersen C, Haagerup A, Børglum AD, Vestbo J, Kruse TA. Highly significant linkage to chromosome 3q13. 31 for rhinitis and related allergic diseases. *Journal of medical genetics*. 2006;43(3):10.
172. Tang X, Tang H, Sun L, Xiao F, Zhang Z, Li Y, et al. Genetic variant rs4982958 at 14q11. 2 is associated with allergic rhinitis in a Chinese Han population running title: 14q11. 2 is a susceptibility locus for allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(1):55-62.

BIBLIOGRAFÍA

173. Nakamura H, Higashikawa F, Nobukuni Y, Miyagawa K, Endo T, Imai T, et al. Genotypes and haplotypes of CCR2 and CCR3 genes in Japanese cedar pollinosis. *International archives of allergy and immunology*. 2007;142:329-34.
174. Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E. Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2006;17:242-9.
175. Kim JJ, Lee JH, Jang CH, Kim YS, Chae SC, Chung HT, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphisms in allergic rhinitis. *The Laryngoscope*. 2004;114:666-9.
176. Sebelova S, Izakovicova-Holla L, Stejskalova A, Schuller M, Znojil V, Vasku A. Interleukin-18 and its three gene polymorphisms relating to allergic rhinitis. *Journal of human genetics*. 2007;52:152-8.
177. Chae SC, Park YR, Li CS, Lee JH, Yang YS, Zhang Q, et al. Analysis of the variations in IL-28RA gene and their association with allergic rhinitis. *Experimental & molecular medicine*. 2006;38:302-9.
178. Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E, Kawakami Y. Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:1746-9.
179. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritzsche C, et al. A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:893-8.
180. Suzuki I, Yamaguchi E, Hizawa N, Itoh A, Kawakami Y. A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. *Immunogenetics*. 1999;49:738-9.
181. Isidoro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Lorente F, Gonzalez-Sarmiento R. [IL4RA gene polymorphism (Q576R) is associated with higher total IgE levels in Spanish patients with family history of atopy]. *Medicina clinica*. 2005;124:211-2. El polimorfismo Q576R del gen IL4RA se asocia con valores elevados de IgE total en pacientes con antecedentes familiares de atopia.
182. Kim JJ, Min JY, Lee JH. Polymorphisms in the IL-13 and IL-4 receptor alpha genes and allergic rhinitis. *European archives of oto-rhino-laryngology :*

BIBLIOGRAFÍA

official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery. 2007;264:395-9.

183. Nakamura H, Miyagawa K, Ogino K, Endo T, Imai T, Ozasa K, et al. High contribution contrast between the genes of eosinophil peroxidase and IL-4 receptor alpha-chain in Japanese cedar pollinosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:1127-31.

184. Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, et al. Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. *International archives of allergy and immunology.* 2006;139:25-30.

185. Noguchi E, Yokouchi Y, Shibasaki M, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, et al. Identification of missense mutation in the IL12B gene: lack of association between IL12B polymorphisms and asthma and allergic rhinitis in the Japanese population. *Genes and immunity.* 2001;2:401-3.

186. Nieters A, Linseisen J, Becker N. Association of polymorphisms in Th1, Th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:346-53.

187. Ying XJ, Zhao SW, Wang GL, Xie J, Xu HM, Dong P. Association of interleukin-13 SNP rs20541 with allergic rhinitis risk: a meta-analysis. *Gene.* 2013;521:222-6.

188. Bunyavanich S, Shargorodsky J, Celedon JC. A meta-analysis of Th2 pathway genetic variants and risk for allergic rhinitis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology.* 2011 Jun;22(4):378-87.

189. Llanes E, Quiralte J, Lopez E, Sastre B, Chacartegui M, del Pozo V, et al. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. *International archives of allergy and immunology.* 2009;148:228-38.

190. Lu MP, Chen RX, Wang ML, Zhu XJ, Zhu LP, Yin M, et al. Association study on IL4, IL13 and IL4RA polymorphisms in mite-sensitized persistent allergic rhinitis in a Chinese population. *PloS one.* 2011;6:e27363.

191. Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, et al. Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergology International.* 2011;60(1):87.

BIBLIOGRAFÍA

192. Micheal S, Minhas K, Ishaque M, Ahmed F, Ahmed A. IL-4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):107-11.
193. Ku MS, Lue KH, Li C, Sun HL, Chou MC. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and childhood allergic rhinitis in Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. *Wei mian yu gan ran za zhi*. 2006;39:297-301.
194. Lue KH, Ku MS, Li C, Sun HL, Lee HS, Chou MC. ACE gene polymorphism might disclose why some Taiwanese children with allergic rhinitis develop asthma symptoms but others do not. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2006;17:508-13.
195. Chae SC, Park YR, Oh GJ, Lee JH, Chung HT. The suggestive association of eotaxin-2 and eotaxin-3 gene polymorphisms in Korean population with allergic rhinitis. *Immunogenetics*. 2005;56:760-4.
196. Hrdlickova B, Izakovicova-Holla L. Association of single nucleotide polymorphisms in the eosinophil peroxidase gene with allergic rhinitis in the Czech population. *International archives of allergy and immunology*. 2009;150(2):184-91.
197. Kang HJ, Choi YM, Chae SW, Woo JS, Hwang SJ, Lee HM. Polymorphism of the CD14 gene in perennial allergic rhinitis. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2006;70:2081-5.
198. Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, et al. Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1192-201.
199. Li CS, Chae SC, Lee JH, Zhang Q, Chung HT. Identification of single nucleotide polymorphisms in FOXP1 and their association with allergic rhinitis. *Journal of human genetics*. 2006;51:292-7.
200. Gulen F, Tanac R, Altinoz S, Berdeli A, Zeyrek D, Koksoy H, et al. The Fc gammaRIIa polymorphism in Turkish children with asthma bronchial and allergic rhinitis. *Clinical biochemistry*. 2007;40:392-6.
201. Mou Z, Shi J, Tan Y, Xu R, Zhao Z, Xu G, et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(1):3-8.

BIBLIOGRAFÍA

202. Yuan B, Chen R, Hsieh K, Yang M, Lung F. ATT Polymorphisms in Intron 20 of *NOS1* Confer Vulnerability to Mite- Induced Allergic Rhinitis in Chinese Patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(1):63-79.
203. Zihlif M, Mahafza T, Obeidat NM, Froukh T, Shaban M, Al-Akhras FM, et al. Frequency of genetic polymorphisms of ADAM33 and their association with allergic rhinitis among Jordanians. *Gene*. 2013;531(2):462-6.
204. Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Deng J. A disintegrin and metalloprotease 33 (*ADAM33*) gene polymorphisms and the risk of asthma: A meta-analysis. *Human immunology*. 2013;74(5):648-57.
205. Nasiri R, Amirzargar AA, Movahedi M, Hirbod-Mobarakeh A, Farhadi E, Behniafard N, et al. Single-Nucleotide Polymorphisms of TNFA and IL1 in Allergic Rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(7):455-61.
206. Kedda MA, Shi J, Duffy D, Phelps S, Yang I, O'Hara K, et al. Characterization of two polymorphisms in the leukotriene C4 synthase gene in an Australian population of subjects with mild, moderate, and severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:889-95.
207. Isidoro-Garcia M, Davila I, Moreno E, Lorente F, Gonzalez-Sarmiento R. Analysis of the leukotriene C4 synthase A-444C promoter polymorphism in a Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:206-7.
208. Eskandari HG, Unal M, Ozturk OG, Vayisoglu Y, Muslu N. Leukotriene C4 synthase A-444C gene polymorphism in patients with allergic rhinitis. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2006;134:997-1000.
209. Arriba-Mendez S, Sanz C, Isidoro-Garcia M, Davila I, Laffond E, Horeno E, et al. 927T>C polymorphism of the cysteinyl-leukotriene type-1 receptor (CYSLTR1) gene in children with asthma and atopic dermatitis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2006;17:323-8.
210. Garcia-Solaesa V, Sanz-Lozano C, Padron-Morales J, Hernandez-Hernandez L, Garcia-Sanchez A, Rivera-Reigada ML, et al. The prostaglandin D2 receptor (PTGDR) gene in asthma and allergic diseases. *Allergologia et immunopathologia*. 2014;42(1):64-8.
211. Sanz C, Isidoro-Garcia M, Davila I, de Pedro MP, Mendez Sde A, Padron J, et al. A new PTGDR promoter polymorphism in a population of children with

BIBLIOGRAFÍA

- asthma. *Pediatric allergy and immunology* : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology. 2009;20:151-6.
212. Isidoro-García M, Sanz C, García-Solaesa V, Pascual M, Pescador DB, Lorente F, et al. PTGDR gene in asthma: a functional, genetic, and epigenetic study. *Allergy*. 2011;66(12):1553-62.
213. 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. *Allergologia et immunopathologia*. 2014;42(1):64-8.
214. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. PTGDR polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2013;40(3):2195-203.
215. Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG, et al. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clin Transl Allergy*. 2011;1(1):2.
216. Archila LD, Jeong D, Pascal M, Bartra J, Juan M, Robinson D, et al. Jug r 2–reactive CD4+ T cells have a dominant immune role in walnut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015.
217. 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. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(1):309.
218. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-7.
219. Patton S SS. Draft Best Practice Guidelines for Laboratory Internal Quality Control. European Molecular Genetics Quality Network. 2002.
220. Yong Y, Lin H. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell research*. 2005;15(2):97-8.
221. Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic

BIBLIOGRAFÍA

- markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). Cell research. 2009;19(4):519-23.
222. Pereira C, Valero A, Loureiro C, Davila I, Martinez-Cocera C, Murio C, et al. Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. European annals of allergy and clinical immunology. 2006;38(6):186.
223. Subiza F, Pola J, Feo F, Moral A. Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. Tratado de Alergología. 2007:425-46.
224. Dacosta N. Aeropalinología de Pobra de Trives (Ourense)-2002. Engineering Degree Thesis, University of Vigo, Spain (in Spanish). 2003.
225. D'amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. Allergy. 2007;62(9):976-90.
226. 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;4(16):10.1186.
227. Ipsen H, Løwenstein H. Basic features of crossreactivity in tree and grass pollen allergy. Clinical reviews in allergy and immunology. 1997;15(4):389-96.
228. 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. 2009.
229. Kerkhof M, Dubois A, Postma D, Schouten J, Monchy J. Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults. Allergy. 2003;58(9):905-11.
230. Davila I, Valero A, Entrenas L, Valveny N, Herráez L. Relationship between serum total IgE and disease severity in patients with allergic asthma in Spain. Journal of investigational allergology & clinical immunology. 2014;25(2):120-7.
231. González Saldaña FP. Evaluación del uso de ige sérica, ige sérica total y eosinófilos en sangre total como marcadores diagnósticos de rinitis alérgica en menores de 15 años con sintomatología sospechosa de rinitis alérgica frente al uso de ige específica contra dermatophagoides pteronyssinus, dermatophagoides farinae, abedul, artemisa, pasto timothy, centeno, alternaria alternata, caspa de gato, caspa de perro, Azogues 2013. 2014.

BIBLIOGRAFÍA

232. Pastorello EA, Incorvaia C, Ortolani C, Bonini S, Canonica GW, Romagnani S, et al. Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1995;96(5):580-7.
233. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(7):1187-205.
234. Gelfand EW. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;114(5):S135-S8.
235. Oguma T, Palmer LJ, Birben E, Sonna LA, Asano K, Lilly CM. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(17):1752-63.
236. Oguma T, Asano K, Ishizaka A. Role of prostaglandin D₂ and its receptors in the pathophysiology of asthma. *Allergology International*. 2008;57(4):307-12.
237. Tsai YJ, Choudhry S, Kho J, Beckman K, Tsai H-J, Navarro D, et al. The PTGDR gene is not associated with asthma in 3 ethnically diverse populations. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;118(6):1242-8.
238. Isidoro-García M, Dávila I, Moreno E, Lorente F, González-Sarmiento R. Analysis of the leukotriene C₄ synthase A-444 C promoter polymorphism in a Spanish population. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(1):206-7.
239. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C₄ synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;23(3):290-6.
240. Davila I, Mullol J, Ferrer M, Bartra J, Del Cuvillo A, Montoro J, et al. Genetic aspects of allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(Suppl 1):25-31.
241. Arriba-Méndez S, Sanz C, Isidoro-García M, Pascual M, Avila C, Dávila I, et al. Analysis of 927T> C CYSLTR1 and -444A> C LTC₄S polymorphisms in children with asthma. *Allergologia et immunopathologia*. 2008;36(5):259-63.

BIBLIOGRAFÍA