

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

***CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA DE LA  
ENFERMEDAD ALÉRGICA EN NUESTRA POBLACIÓN.  
ANÁLISIS DE FENOTIPOS EN EL ASMA ALÉRGICA***

**Memoria presentada por Dña. María Paz Sendín Hernández  
para optar al Grado de Doctor**

**2015**

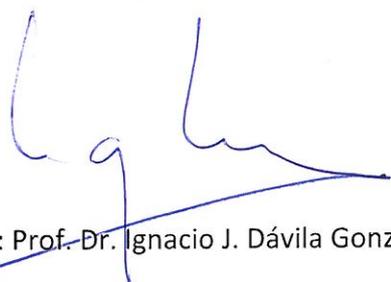


El Prof. Dr. D. Ignacio J. Dávila González, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, el Prof. Dr. D. Carmelo A. Ávila Zarza, Profesor Titular del Departamento de Estadística y la Prof<sup>a</sup>. Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Microbiología y Genética,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado ***Caracterización clínico-biológica de la enfermedad alérgica en nuestra población. Análisis de fenotipos en el asma alérgica***, que presenta la licenciada en Medicina Doña María Paz Sendín Hernández 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 1 de Diciembre de 2015.



Fdo: Prof. Dr. Ignacio J. Dávila González



Fdo: Prof. Dr. Carmelo A. Ávila Zarza



Fdo: Prof<sup>a</sup>. Dra. Catalina S. Sanz Lozano



A mis padres

A mis hijos

A Toni



*Si no fuera por la gran variabilidad entre los individuos, la Medicina podría ser una ciencia y no un arte.*

Sir William Osler (1849–1919)



# Agradecimientos



Escribir la memoria de una Tesis Doctoral requiere muchas ayudas, por ello quiero agradecer a todas aquellas personas, que de una alguna forma, han hecho posible la consecución de este trabajo.

A mis directores de Tesis, los doctores Ignacio Dávila González, Catalina Sanz Lozano y Carmelo Ávila Zarza por introducirme en el mundo de la investigación, por su disponibilidad, sus enseñanzas, su ejemplo de trabajo y sobre todo, por su trato cordial.

A la Dra. María Isidoro-García, por todas las horas que me ha dedicado, por todo lo que me ha enseñado, por sus palabras de aliento y por haber creído en mí desde el primer día que nos conocimos.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunoalergia, Laura, Choni, Iñaki y Elena, por tantos momentos compartidos, por enseñarme las técnicas de laboratorio, por dejar que formara parte de su equipo de trabajo y sobre todo, por su amistad. A Carmen, que siempre está en la puerta de enfrente, con una palabra de ánimo y una sonrisa.

A todo el personal del Servicio de Inmunoalergia, a los facultativos por su atención y por acogerme desde el primer; al equipo de enfermería, especialmente a María José, por su disponibilidad y su escucha; al personal auxiliar y administrativo, María Jesús, Marina, Juan, José y Carlos, por todo lo que me han ayudado en la petición y localización de historias clínicas y por cuidarme a diario.

A todos los pacientes participantes por su colaboración desinteresada en nuestro estudio.

A todos los integrantes del Servicio de Análisis y Bioquímica Clínica por su apoyo diario y su ánimo continuo, en especial, a Paqui, Belén, Carlos, Isabel, Teresa, Marisa, Amador y Pilar, por todo lo que me han enseñado en estos años de residencia y el cariño que me han dado. A mis residentes pequeñas, Ana y María José, con las que he tenido la suerte de compartir tantas horas de guardia, por su ayuda para que este proyecto pudiera llegar a su fin y por su amistad.

A todos mis familiares y amigos de mi querido pueblo, Villarino de los Aires, por su preocupación continua y su ayuda desinteresada, en especial a Maribel y José Ramón.

A mis padres, Manolo y Pepa, por su continuo apoyo, dedicación, amor y por inculcarme la capacidad de sacrificio y por ser un ejemplo vivo de capacidad de trabajo y honestidad.

A mis adorados hijos, José Javier y Manuel, a los que durante estos últimos años de trabajo no he podido dedicarles todo el tiempo que se merecían, por las horas que han pasado conmigo en el laboratorio revisando historias y por su amor incondicional.

Y por último, pero no por eso menos importante, a Toni, que es mi apoyo en todo momento, que me alienta en los tiempos difíciles y ante todo, que me quiere.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ATOPIA .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Definición, epidemiología, recuerdo histórico.....	3
1.1.2. Diagnóstico de atopia.....	4
1.1.2.1. Pruebas cutáneas intraepidérmicas o <i>prick-tests</i> .....	4
1.1.2.2. Determinación de IgE total.....	4
1.1.3. Polisensibilización/monosensibilización.....	5
1.1.4. Dermatitis atópica.....	6
<b>1.2. RINITIS ALÉRGICA .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Definición.....	8
1.2.2. Clasificación.....	9
1.2.3. Prevalencia.....	9
1.2.4. Etiopatogenia.....	10
<b>1.3. ASMA ALÉRGICA .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Definición.....	11
1.3.2. Epidemiología.....	12
1.3.3. Factores implicados en el asma.....	13
1.3.3.1. Sexo.....	13
1.3.3.2. Obesidad.....	13
1.3.3.3. Componente genético.....	14

1.3.3.4. Prematuridad.....	15
1.3.3.5. Tabaquismo.....	15
1.3.3.6. Dieta.....	15
1.3.3.7. Infecciones respiratorias.....	16
1.3.4. Patogenia.....	17
1.3.4.1. Inflamación de las vías respiratorias.....	17
1.3.4.2. Remodelación de las vías respiratorias.....	19
1.3.4.3. Hiperrespuesta bronquial (HRB).....	19
1.4. FENOTIPOS Y ENDOTIPOS .....	20
1.5. GENÉTICA Y EPIGENÉTICA .....	23
1.5.1. Epigenética.....	24
1.5.1.1. Metilación del ADN.....	25
1.5.1.2. Histonas.....	26
1.5.1.3. MicroARN (miARN).....	27
1.6. PTGDR .....	28
1.6.1. Prostaglandina D2 y receptor PTGDR.....	28
1.6.2. Gen <i>PTGDR</i> y enfermedades alérgicas.....	31
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES .....	43
4.1.1. Datos recogidos.....	43
4.1.2. Variables.....	45

4.1.2.1. Antecedentes familiares de primer grado.....	45
4.1.2.2. Fumador.....	45
4.1.2.3. Intolerancia respiratoria a AINE.....	45
4.1.2.4. Poliposis.....	45
4.1.2.5. Antecedentes de atopia en la infancia.....	45
4.1.3. Sujetos.....	57
4.1.3.1. Pacientes.....	57
4.1.3.2. Controles.....	58
4.2. ANÁLISIS MOLECULAR .....	58
4.2.1. Extracción del ADN.....	58
4.2.2. Amplificación mediante PCR.....	62
4.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	65
4.2.4. Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR.....	66
4.2.5. Análisis bioinformático de las secuencias.....	68
4.2.6. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa.....	70
4.2.6.1. Extracción del ARN.....	70
4.2.6.2. Tratamiento con ADNasa.....	71
4.2.6.3. Cuantificación del ARN.....	71
4.2.6.4. Síntesis del ADN complementario (ADNc).....	72
4.2.6.5. Diseño de cebadores para qPCR.....	72
4.2.6.6. PCR a tiempo real (qPCR).....	73
4.2.7. Control de calidad del laboratorio.....	74

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	75
4.3.1. Análisis descriptivo.....	75
4.3.2. Estudio bivariante.....	76
4.3.2.1. Estudio de asociación genéticas-clínicas.....	77
4.3.3. Estudio multivariante.....	78
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
5.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO UNIVARIANTE .....	85
5.1.1. Controles.....	85
5.1.2. Pacientes con pruebas cutánea positivas.....	86
5.1.3. Pacientes con asma alérgica.....	90
5.2. ESTUDIO BIVARIANTE .....	95
5.2.1. Variables clínicas.....	95
5.2.2. Estudio de asociación génica.....	103
5.2.2.1. Niveles de expresión de <i>PTGDR</i> .....	103
5.2.2.2. Análisis de SNP.....	104
5.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS DATOS .....	108
5.3.1. Análisis global de todos los individuos del estudio.....	108
5.3.2. Pacientes con asma alérgica.....	119
5.3.3. Caracterización de fenotipos en pacientes con asma alérgica...	130
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>139</b>
6.1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO .....	141
6.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA .....	145
6.2.1. Niveles de expresión génica.....	145

6.2.2. Análisis de polimorfismos de <i>PTGDR</i> .....	147
6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS DATOS .....	150
6.3.1. Análisis global.....	150
6.3.2. Pacientes con asma alérgica.....	150
6.3.3. Estudio de fenotipos en el asma alérgica.....	151
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>
<b>APÉNDICE I .....</b>	<b>177</b>



# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. ATOPIA

### 1.1.1. DEFINICIÓN, EPIDEMIOLOGÍA, RECUERDO HISTÓRICO

El concepto de atopia hace referencia a la tendencia personal y/o familiar a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a dosis bajas de alérgenos comunes, y que se expresa clínicamente como dermatitis atópica, rinitis alérgica y/o asma alérgica [1]. Es aconsejable utilizar el término atopia solo para describir los rasgos clínicos y la tendencia ya descrita, y no para denominar enfermedades.

El término fue acuñado en 1923 por el médico Arthur Fernández Coca (1875-1959), quien, asesorado por su profesor de griego, tomó la palabra *atopos*, que significa comportamiento extraño en una enfermedad, para referirse a los padecimientos de ciertos sujetos que presentaban asma y/o fiebre del heno y en los que existía un condicionante hereditario.

La prevalencia de la atopia se incrementa con la edad y tiene un importante componente hereditario; así, el riesgo de desarrollar alergia mediada por la inmunoglobulina E (IgE) es del 60-70 % para un niño con ambos padres atópicos y del 30-40 % si solo está afectado uno de los progenitores.

Diferentes estudios demuestran que la atopia comienza en la vida fetal y se modula posteriormente según factores genéticos y ambientales [2]. En el hígado fetal se inicia la síntesis de IgE alrededor de la decimoprimer semana de gestación. Los niveles de IgE son bajos en la sangre de cordón, pero su existencia demuestra la capacidad del feto para producirla, ya que no cruza la placenta. La atopia está presente en la mayoría de niños asmáticos de más de tres años de edad y la presencia de sensibilización a alérgenos específicos es uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de asma.

### 1.1.2. DIAGNÓSTICO DE ATOPIA

Para el diagnóstico de atopia, como en toda patología médica, se debe de realizar una adecuada historia clínica, en la que queden reflejados los síntomas del paciente, así como sus antecedentes personales y familiares. Tras la sospecha de atopia se realizará un diagnóstico más dirigido mediante las pruebas intraepidérmicas o *prick-tests* y la determinación de IgE.

#### 1.1.2.1. PRUEBAS CUTÁNEAS INTRAEPIDÉRMICAS O *PRICK-TESTS*

Las pruebas cutáneas como método diagnóstico empezaron a emplearse en el siglo XIX, en concreto por Blackley [3]. La técnica de las pruebas intraepidérmicas fue descrita por vez primera en 1924 por Lewis y Grant, generalizándose su uso como prueba diagnóstica tras las modificaciones introducidas por Pepys en los años setenta [4].

Estas pruebas se fundamentan en reproducir la reacción de hipersensibilidad tipo I (mediada por IgE) al introducir en la epidermis un alérgeno [5]. Se trata de pruebas rápidas, de bajo coste y con elevada sensibilidad, si bien la especificidad no es tan buena [6]. Son prácticamente indoloras para el paciente, y seguras por sus escasos efectos adversos (aunque no exentas de riesgo). Además, se dispone de una valoración inmediata de las mismas y resultan muy útiles para confirmar la sospecha de atopia [7]. No obstante, conviene indicar que su resultado debe valorarse junto con la historia clínica de cada paciente.

#### 1.1.2.2. DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL

En febrero de 1968, en el Centro de Referencia de Inmunoglobulinas de la OMS (Lausana, Suiza), se reunieron los investigadores de dos grupos y acordaron que, con los datos que disponían, podían declarar el aislamiento de una nueva inmunoglobulina: la IgE. Se trata de una inmunoglobulina monomérica con una masa molecular de 190 kD.

La IgE no atraviesa la barrera placentaria y su vida media plasmática es de 2 o 3 días. Sus principales funciones derivan de su participación en la reacción alérgica y en la defensa contra parásitos, principalmente los helmintos intestinales [8]. En suero su concentración es muy baja y depende de la edad. Se incrementa durante la infancia y alrededor de los 10 años alcanza los valores de la edad adulta [9].

Asimismo, la IgE tiene una alta especificidad para unirse a alérgenos. Su vida media libre en sangre es corta, pero es capaz de unirse, mediante receptores específicos, a los mastocitos y basófilos. Éstos quedan sensibilizados, y cuando se une de nuevo la IgE a su alérgeno específico y se adhiere este conjunto a las células activadas se produce la liberación de mediadores inflamatorios. La unión a los mastocitos y basófilos prolonga su vida media notablemente. Mediante fluoroenzimoimmunoensayo se puede cuantificar la concentración de IgE total presente en el suero, que normalmente es expresada en kU/L.

### **1.1.3. POLISENSIBILIZACIÓN/MONOSENSIBILIZACIÓN**

Se puede definir la polisensibilización como la presencia de sensibilización (confirmada mediante pruebas cutáneas o determinación de IgE específica) frente a dos o más aeroalérgenos, en el caso de la alergia respiratoria [10]. Muchas veces se ha hablado de polisensibilización refiriéndose a fuentes alérgicas. A diferencia, la monosensibilización sería la existencia confirmada, mediante IgE específica o prueba cutánea, de sensibilización frente a un único alérgeno (o fuente alérgica).

La polisensibilización es muy prevalente en pacientes alérgicos; si bien, depende de la población y la región geográfica. Además, los pacientes tienen tendencia a

sensibilizarse frente a nuevos alérgenos a lo largo del tiempo. Se ha descrito que los síntomas clínicos son más graves en pacientes polisensibilizados que en pacientes monosensibilizados [11].

#### 1.1.4. DERMATITIS ATÓPICA

La dermatitis atópica se define como una enfermedad crónica de la piel que cursa en brotes y se caracteriza por la presencia de eccema. Aparece mayoritariamente en niños con predisposición genética o con antecedentes familiares o personales de asma y/o rinitis alérgicas.

Su prevalencia en España es entre un 6 y un 15 %. No existen diferencias significativas en relación con el sexo. Como todo proceso crónico tiene importantes repercusiones económicas y sociales porque altera la calidad de vida de los niños y de sus familias [12].

En su etiopatogenia convergen la inflamación persistente de la dermis con infiltrado linfocitario (inicialmente Th2 y posteriormente Th1), la existencia de predisposición genética por mutaciones de genes que intervienen en el funcionamiento y la estructura de la epidermis, y la disfunción de la barrera cutánea que permite la entrada de alérgenos [13,14].

En 1977 Hanifin y Rajka establecieron los criterios diagnósticos de la dermatitis atópica, diferenciando entre criterios mayores y menores. Para el diagnóstico debían estar presentes tres criterios mayores y tres o más menores (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de dermatitis atópica (*sensu* Hanifin y Rajka).

<b>CRITERIOS MAYORES</b>
1. PRURITO
2. LESIONES DERMATOLÓGICAS TÍPICAS
3. CRONICIDAD DE LAS LESIONES
4. HISTORIA PERSONAL O FAMILIAR DE ATOPIA
<b>CRITERIOS MENORES</b>
1. XEROSIS
2. ICTIOSIS/HIPERLÍNEAS PALMARES/QUERATOSIS PILAR
3. AUMENTO SÉRICO DE IgE
4. REACTIVIDAD CRUZADA INMEDIATA A LA PRUEBA CUTÁNEA (TIPO I)
5. TEMPRANA EDAD DE COMIENZO
6. TENDENCIA A LAS INFECCIONES CUTÁNEAS
7. TENDENCIA A LA DERMATITIS INESPECÍFICA DE PIES Y MANOS
8. ECCEMA DE PEZÓN
9. QUEILITIS
10. CONJUNTIVITIS RECURRENTE
11. PLIEGUE DE DENNIE-MORGAN
12. QUERATOCONO
13. CATARATAS SUBCAPSULARES ANTERIORES
14. HIPERPIGMENTACIÓN PERIORBITARIA
15. PALIDEZ FACIAL/ERITEMA FACIAL
16. PITIARIS ALBA
17. PLIEGUE ANTERIOR DEL CUELLO
18. PRURITO SUDORAL
19. INTOLERANCIA A LA LANA Y SOLVENTES LIPÍDICOS
20. ACENTUACIÓN PERIFOLICULAR
21. INTOLERANCIA ALIMENTARIA
22. CURSO INFLUENCIADO POR FACTORES AMBIENTALES/EMOCIONALES
23.DERMOGRAFISMO BLANCO

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, ya que no existe ninguna prueba diagnóstica que certifique su presencia. Las manifestaciones clínicas típicas de la dermatitis atópica varían según la edad de afectación y se reconocen tres etapas: lactante, infantil y del adulto.

Posteriormente se han propuesto otros criterios clínicos diagnósticos; una revisión en 2008 concluyó que los criterios más ampliamente validados eran los del Grupo de Trabajo del Reino Unido (1994) [15]. Los pacientes deben presentar el criterio mayor y tres o más criterios menores (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criterios de dermatitis atópica (1994) [15].

<b>CRITERIO MAYOR</b>
PRURITO
<b>CRITERIOS MENORES</b>
HISTORIA DE COMPROMISO FLEXURAL
AFECTACIÓN VISIBLE DE LOS PLIEGUES CUTÁNEOS (EN MENORES DE 4 AÑOS: FRENTE, MEJILLAS Y SUPERFICIES DE EXTENSIÓN)
ASMA O RINOCONJUNTIVITIS ALÉRGICA (EN MENORES DE 4 AÑOS, ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA)
PIEL SECA DURANTE EL ÚLTIMO AÑO
INICIO ANTES DE LOS 2 AÑOS DE EDAD

## 1.2. RINITIS ALÉRGICA

### 1.2.1. DEFINICIÓN

La rinitis alérgica se define como un conjunto de síntomas mediados inmunológicamente, de tipo inflamatorio, provocados por la exposición al alérgeno,

consistentes en estornudos, obstrucción/congestión nasal, prurito y rinorrea/descarga posterior, que pueden revertir tras medicación o espontáneamente. Es la definición consensuada por el documento *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (ARIA) en 2008 [16].

### 1.2.2. CLASIFICACIÓN

La clasificación clínica de la rinitis alérgica, avalada por un amplio consenso internacional, es la propuesta por el citado documento ARIA. Según la duración de los síntomas se clasifica en **intermitente** (los síntomas están presentes  $\leq 4$  días a la semana o durante  $\leq 4$  semanas consecutivas) o **persistente** (los síntomas están presentes  $> 4$  días a la semana y  $> 4$  semanas consecutivas); y según la gravedad en **leve**, **moderada** o **grave**. Se puede decir que una rinitis es leve cuando los síntomas no afectan al sueño, ni al desarrollo de la actividades cotidianas, de ocio y/o deportivas, ni a las tareas escolares o laborales, y no son molestos. Se considera una rinitis moderada cuando están presentes uno, dos o tres de los ítems antes expuestos, y, finalmente, una rinitis es grave cuando están presentes los cuatro ítems [17].

### 1.2.3. PREVALENCIA

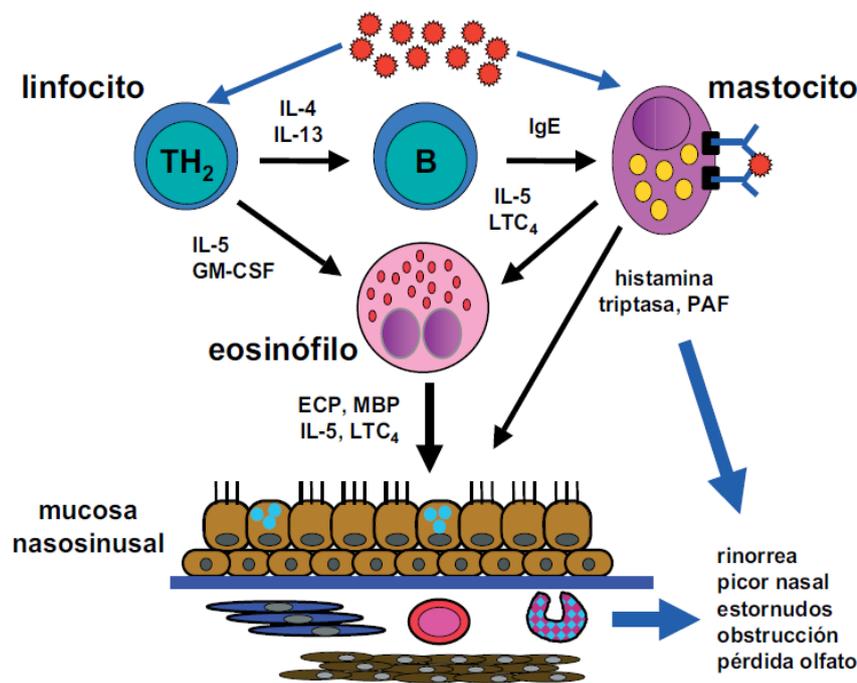
En los países desarrollados su prevalencia está en aumento, particularmente en las áreas urbanas. Es un problema de salud global que afecta a un 10-20 % de la población. Un estudio realizado en 2005 en nuestro país demostró que el motivo de consulta más frecuente en las consultas de Alergología era la rinitis (55,5 % del total) [18]. Se asocia frecuentemente con otras patologías como el asma, en un 37 %, o la conjuntivitis, en un 65 %. En el estudio epidemiológico ISAAC (*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) se estimó que la prevalencia de rinoconjuntivitis en los niños españoles de 6-7años fue del 7,9 % y en los de 13-14 años del 15 % [19].

#### 1.2.4. ETIOPATOGENIA

La rinitis alérgica es una patología en la que están implicados factores medioambientales, como pólenes o contaminantes ambientales, entre otros, y factores genéticos. En el estudio realizado en 2005 por Navarro *et al.* los aeroalérgenos implicados con más frecuencia en España fueron los pólenes (51 %), seguidos en importancia por los ácaros del polvo (42 %), epitelios (20 %) y hongos (6 %). Se encontró polisensibilización en un 31 % de los casos [18].

Como ya se ha señalado previamente, la rinitis alérgica es una patología mediada por IgE. Inicialmente se produce una activación de los linfocitos T, al reconocer fragmentos de los alérgenos presentes en las células presentadoras de antígenos (APC). Los linfocitos T proliferan y se diferencian hacia linfocitos T colaboradores (Th2), que liberan IL4, IL5 e IL13 que estimulan a los linfocitos B para la producción de IgE y a los eosinófilos. La IgE sintetizada se une a receptores específicos de membrana de los mastocitos y los sensibiliza. En un posterior contacto con el alérgeno implicado, los mastocitos sensibilizados se activan y liberan mediadores pro-inflamatorios como la histamina, responsable de los estornudos, el prurito y la congestión nasal y la rinorrea [20]. Ver figura 1.

Por la actividad de diferentes mediadores se produce la infiltración de la mucosa nasal por basófilos, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos [21,22]. Se mantiene la reacción inflamatoria por este infiltrado celular y la posterior liberación de mediadores, responsables de la congestión nasal [23].



**Figura 1.** Esquema de la patogénesis de la rinitis alérgica. Tomado de Mullol i Miret y Valero Santiago 2010 [24].

## 1.3. ASMA ALÉRGICA

### 1.3.1. DEFINICIÓN

El asma es un síndrome que incluye diferentes fenotipos que comparten manifestaciones clínicas similares, pero con probables etiologías diferentes, por lo que es difícil alcanzar una definición precisa que no sea meramente descriptiva [25]. Según la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA 4.0) se podría definir como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogénesis intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiperrespuesta bronquial (HRB) y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente [7].

Según el Consenso Internacional ERS/ATS (de la Sociedad Europea de Neumología y la Sociedad Americana de Neumología) el asma grave se define como: “asma que precisa tratamiento basal con altas dosis de esteroides inhalados asociados a  $\beta$ 2 agonistas inhalados de acción larga y antileucotrienos o teofilinas en el año previo, o corticoides sistémicos durante > 50 % del año anterior para prevenir un mal control, o que persiste mal controlada a pesar de esta medicación” [26].

Se debe tener en cuenta que el asma grave es una enfermedad heterogénea, que la mayor parte de ensayos clínicos han sido realizados en poblaciones pequeñas y que las recomendaciones que facilitan presentan calidad de evidencia baja o muy baja [27].

### 1.3.2. EPIDEMIOLOGÍA

El asma es un problema mundial, estimándose que existen alrededor de 300 millones de individuos afectados [28].

Entre 1998 y 2001 se desarrolló un estudio de seguimiento en 27 centros de Europa denominado *Estudio de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea-II* (ECRHS-II). En las ciudades de Albacete, Barcelona, Galdácano, Huelva y Oviedo se localizaban los centros participantes españoles. El estudio concluyó un aumento de la prevalencia del diagnóstico de asma y del tratamiento del asma, que no se acompañaba de un aumento de síntomas [29].

La prevalencia del asma, y en general de las enfermedades alérgicas, está aumentando en todo el mundo; si bien, de manera más acentuada en los países occidentales.

### 1.3.3. FACTORES IMPLICADOS EN EL ASMA

Se desconocen las causas concretas que desencadenan el asma. La interacción entre la predisposición genética del individuo y los factores ambientales produce la susceptibilidad a presentar la enfermedad.

Se diferencian factores de riesgo para el desarrollo del asma, que se relacionan con la aparición de la enfermedad asmática, y factores desencadenantes de síntomas de asma, cuya exposición origina la aparición de síntomas en pacientes con esta enfermedad crónica.

Entre los factores implicados en la aparición del asma se pueden destacar **factores del huésped** (sexo, obesidad o componente genético), **factores perinatales** (prematuridad, lactancia materna o exposición al tabaco durante la gestación) y **factores ambientales** (aeroalérgenos, infecciones respiratorias y tabaquismo). A continuación se detallan algunos de estos factores implicados.

#### 1.3.3.1. SEXO

Durante la infancia el asma es más frecuente en los niños que en las niñas, invirtiéndose esta relación a partir de la adolescencia [30]. Las mujeres adultas son más propensas que los hombres a presentar asma, según el Resumen de Estadísticas de Salud de los Estados Unidos (*National Health Interview Survey, 2002 y 2012*) [31,32].

#### 1.3.3.2. OBESIDAD

Según el Resumen de Estadísticas antes mencionado, en 2002 el 7 % de los adultos de más de 18 años habían sido informados en alguna ocasión por un médico u otro profesional de la salud de que tenían asma, mientras que en 2012 este porcentaje se

incrementó al 8 %. En ese mismo informe se documenta que en 2002 el 35 % de los adultos tenían sobrepeso y el 23 % eran obesos; mientras que en 2012 también el 35 % tenían sobrepeso, pero el porcentaje de obesidad subió hasta el 28 % [31,32]. De lo expuesto se puede deducir que existe un incremento, tanto del asma como de la obesidad, lo que ha llevado a postular que ambas entidades pudieran estar relacionadas y asociadas.

Diferentes investigaciones han identificado polimorfismos en regiones específicas de los cromosomas 5q, 6p, 11q13 y 12q, cada uno de los cuales contiene genes que codifican los receptores relevantes para el asma, la inflamación y trastornos metabólicos. No obstante, son necesarias nuevas investigaciones para comprender en su totalidad la relación asma-obesidad [33]. La leptina es una hormona producida por los adipocitos que se encuentra incrementada en los obesos; comparte homología estructural con citocinas como la IL6, y se ha demostrado que interviene en el reclutamiento y activación de monocitos y macrófagos y en la proliferación de células T [33].

La obesidad conduce a una serie de perturbaciones fisiológicas que podrían causar síntomas respiratorios, pero los estudios fisiológicos no soportan de manera uniforme la conclusión de que la obesidad conduce a una hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) [33].

#### 1.3.3.3. COMPONENTE GENÉTICO

El asma tiene un componente hereditario complejo, y se acepta que múltiples genes pueden estar involucrados en la patogénesis del asma. Posteriormente nos centraremos en el componente genético.

#### 1.3.3.4. PREMATURIDAD

Existen pruebas convincentes de que los partos pre-término incrementan el riesgo de asma. En una reciente revisión sistemática y meta-análisis, Been *et al.* (2014) concluyeron que, considerando el incremento global de la supervivencia de los prematuros pre-término, la investigación se debe centrar en la comprensión de los mecanismos subyacentes y en orientar los resultados a la prevención [34].

#### 1.3.3.5. TABAQUISMO

Son bien conocidos los efectos nocivos de la exposición al humo de tabaco, incluyendo un mayor riesgo de desarrollar síntomas similares al asma en la primera infancia. En el estudio de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea (ECRHS-II) se encontró una relación entre prevalencia de síntomas respiratorios y el tabaquismo; en la población que suspendió el hábito tabáquico esto tuvo un efecto beneficioso y en la que lo inició, o no lo abandonó, un impacto negativo, sobre todo en relación con tos y sibilancias [29].

El tabaquismo materno durante la gestación influye en el desarrollo pulmonar, los bebés de madres fumadoras son cuatro veces más propensos a desarrollar enfermedades con sibilancias en el primer año de vida; aunque existe poca evidencia de que el tabaquismo materno durante el embarazo tenga efecto sobre la sensibilización alérgica [35]. La exposición al humo de tabaco incrementa el riesgo de padecer enfermedades de las vías respiratorias inferiores en la infancia.

#### 1.3.3.6. DIETA

Se ha estudiado ampliamente el papel de la dieta en el desarrollo del asma, particularmente durante la lactancia. Los lactantes alimentados con lactancia artificial

tienen una mayor incidencia de enfermedades con sibilancias en la primera infancia que los alimentados con lactancia materna. Gdalevich *et al.* (2001) destacan la ventaja de la lactancia materna exclusiva durante los primeros meses de vida para disminuir la tasa de asma, sobre todo si existe historia familiar de atopía [36].

En las últimas décadas en los países desarrollados existe un incremento en el consumo de alimentos procesados y de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 (margarinas) y se ha producido una disminución en la ingesta de anti-oxidantes (fruta y verdura) y de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (pescado azul). Algunos estudios han revelado que este cambio en la dieta se asocia con incrementos en la presencia de asma y atopía [p.ej. 37].

#### 1.3.3.7. INFECCIONES RESPIRATORIAS

Algunas infecciones respiratorias víricas durante la infancia se han asociado con el inicio del asma. Varios estudios prospectivos de niños ingresados con infección por virus respiratorio sincitial (VRS) han demostrado que al menos el 40 % continuará con sibilancias o asma en la infancia tardía [38]. Sin embargo, en otros estudios algunas infecciones respiratorias en la primera etapa de la vida, como el sarampión e incluso el VRS, parecen proteger contra el asma [39].

La **hipótesis higienista** propone que la exposición a infecciones en la etapa temprana de la vida del niño influye en el desarrollo de su sistema inmune y conduce a un menor riesgo de asma y de otras enfermedades alérgicas [40]. Los niños pequeños con hermanos mayores, o los que asisten a guarderías, tienen mayor riesgo de infecciones, pero gozan de protección contra el desarrollo de enfermedades alérgicas [41]. Esta hipótesis continúa investigándose.

También se describen otro tipo de factores que se consideran desencadenantes. En este caso podemos hablar de **factores ambientales**, entre los que resaltamos factores

atmosféricos, domésticos (ácaros del polvo, epitelios de perro o gato) y agentes infecciosos (hongos); **factores laborales**, maderas y harinas, y **factores sistémicos**, entre los que es oportuno mencionar a los fármacos y alimentos [7].

#### 1.3.4. PATOGENIA

La principal característica patológica del asma es la obstrucción al flujo aéreo que se produce tanto por la inflamación de la pared de los bronquios como por la contracción del músculo liso debida a la hiperreactividad bronquial. También es necesario considerar la remodelación de las paredes de las vías respiratorias, frecuente en pacientes asmáticos y que tiene como consecuencia una obstrucción más o menos irreversible del flujo aéreo. Además, contribuyen también las secreciones de moco y detritus celulares que ocupan el espacio aéreo.

##### 1.3.4.1. INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

A pesar de la heterogeneidad del asma, la inflamación de las vías respiratorias es una característica patológica común; si bien, no se ha establecido una relación consistente entre la gravedad del asma y la intensidad de la inflamación [42]. En la mayoría de los pacientes asmáticos el patrón inflamatorio característico incluye un aumento del número de linfocitos T colaboradores (*helper*) de tipo 2 (Th2), eosinófilos activados, mastocitos y células citolíticas espontáneas (*natural killer*, NK) que liberan mediadores que ocasionan los síntomas de la enfermedad.

Los **linfocitos T** se encuentran elevados en las vías respiratorias y existe un predominio de Th2 que liberan citocinas específicas como IL4, 5, 9, y 13, que son responsables de la activación de los eosinófilos y de los linfocitos B que producirán IgE. Los linfocitos T reguladores están disminuidos y las células NK elevadas y suele existir un desequilibrio en la relación entre Th1/Th2 [43].

Los **eosinófilos** están también aumentados y existe relación entre su número y la gravedad del asma. Permanecen activados y liberan enzimas inflamatorias que lesionan las células epiteliales del árbol bronquial y mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria. Está inhibida su apoptosis [44].

Los **mastocitos** están incrementados en el epitelio bronquial e infiltran el músculo liso de la pared. Su activación se produce, principalmente, a través de receptores de alta afinidad para la IgE por estímulos osmóticos, alérgenos y/o conexiones neuronales, provocando la liberación de histamina, leucotrienos y prostaglandina D2 con efecto broncoconstrictor y proinflamatorio [45].

En algunos pacientes con asma grave y en asmáticos fumadores, se ha objetivado un aumento de **neutrófilos** en las vías respiratorias pero su papel fisiopatológico no está bien establecido [46].

Las **células dendríticas** son células presentadoras de antígenos, que capturan de la luz del tracto respiratorio o del interior, y activan la producción de linfocitos Th2 que inician y amplifican la respuesta inflamatoria [47].

Las células estructurales de la vía respiratoria también participan de manera directa y activa en el proceso inflamatorio. Las células del epitelio bronquial, en respuesta a cambios en su microambiente, secretan citocinas como IL25, IL33 y/o linfopoyetina tímica estromal (TSLP) que activan a los linfocitos innatos tipo 2 (ILC2) [48], que intervienen en la respuesta inmune, secretando IL5 e IL13, de forma que inician y mantienen la actividad inflamatoria pulmonar [49]. Por la acción de determinadas citocinas pro-inflamatorias, se activa la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, presente en las células epiteliales del tracto respiratorio, produciendo óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador [50] y que puede ser utilizado como marcador de la

inflamación. Desde los vasos de la vía aérea, las células endoteliales participan en el reclutamiento de células inflamatorias mediante la expresión de moléculas de adhesión.

#### 1.3.4.2. REMODELACIÓN DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

Los pacientes asmáticos presentan cambios estructurales en las vías respiratorias, entre los que cabe destacar los siguientes: hiperplasia e hipertrofia de la musculatura lisa bronquial, engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, dilatación y proliferación de los vasos, fibrosis subepitelial e hipersecreción de moco por la hiperplasia de las glándulas mucosas. Todo lo enumerado se puede asociar con una progresiva pérdida de la función pulmonar [51]. Estos cambios son secundarios a la respuesta reparadora a la inflamación crónica o pueden aparecer independientemente del proceso inflamatorio [52].

La hiperplasia e hipertrofia de las células de la musculatura lisa bronquial provoca un incremento en la rigidez de la pared; estas células también expresan mediadores pro-inflamatorios [53]. Los miofibroblastos y los fibroblastos producen proteoglicanos y colágenos tras la estimulación de mediadores inflamatorios, lo que favorece la rigidez de las vías respiratorias.

#### 1.3.4.3. HIPERRESPUESTA BRONQUIAL (HRB)

Otra característica de la fisiopatología del asma es la hiperrespuesta bronquial (HRB). Se produce un estrechamiento de las vías respiratorias por la acción de diferentes estímulos que son inocuos en personas no asmáticas. La HRB se relaciona con la inflamación y la remodelación de las vías respiratorias y es parcialmente reversible con tratamiento. El grado de HRB se correlaciona parcialmente con la gravedad clínica del asma y con marcadores de la inflamación [54].

## 1.4. FENOTIPOS Y ENDOTIPOS

El fenotipo es “la manifestación visible del genotipo en un determinado ambiente”, según el Diccionario de la lengua española (DRAE). Por tanto, es el conjunto de características observables en un organismo que constituyen el resultado de la interacción entre la carga genética y el medio ambiente. El fenotipo no puede ser definido por una única característica biológica, fisiológica o clínica, sino por la integración de las mismas [55]. En este sentido, con su variabilidad de presentaciones, el asma puede ser considerada una enfermedad fenotípicamente heterogénea [56].

Se han pretendido crear subgrupos en los pacientes asmáticos y clasificarlos según sus características diferenciales, con el objetivo de incrementar los conocimientos de la enfermedad y predecir la respuesta al tratamiento. Esta categorización de los fenotipos de asma se desarrolla más a fondo con la publicación de Wenzel *et al.* (2006) [57]. En la GEMA 4.0 [7] los fenotipos de asma se agrupan en tres categorías: por criterios clínicos o fisiológicos, relacionados con desencadenantes, e inflamatorios (Tabla 3). Hay que tener en cuenta la existencia de solapamiento entre las diferentes categorías y además, un paciente puede pasar de un fenotipo a otro.

El fenotipo “asma alérgica” es el que nos ocupa en este estudio, ya que todos los pacientes incluidos presentaban pruebas cutáneas positivas. La revisión se centrará en el mismo. Es el más frecuente, pues aproximadamente tienen una base alérgica el 75 % de los casos de asma [58]. Puede presentarse a cualquier edad, aunque suele iniciarse antes de los 30 años, es más frecuente en varones y generalmente existen antecedentes familiares o personales de atopia; además, aunque existen formas graves, suele tener una mejor evolución. Parece relacionarse con una mejor función pulmonar global; si bien, suele presentar un número mayor de exacerbaciones que otros fenotipos.

**Tabla 3.** Categorías de fenotipos asmáticos. Tomado de la GEMA 4.0 [7].

CLÍNICOS O FISIOLÓGICOS	RELACIONADOS CON DESENCADENANTES	INFLAMATORIOS
ASMA GRAVE	ASMA ALÉRGICA	ASMA EOSINOFÍLICA
ASMA CON EXACERBACIONES GRAVES	ASMA INDUCIDA POR AINE	ASMA NEUTROFÍLICA
ASMA REFRACTARIA AL TRATAMIENTO	ASMA INDUCIDA POR MENSTRUACIÓN	ASMA PAUCIGRANULOCÍTICA
ASMA DE INICIO PRECOZ	ASMA INDUCIDA POR EJERCICIO	
ASMA DE INICIO TARDIO		
ASMA CON LIMITACIÓN FIJA AL FLUJO AÉREO		
ASMA Y OBESIDAD		

La identificación de un biomarcador (genético, sanguíneo o de otro tipo) permitiría identificar el fenotipo. Si existe un mecanismo etiopatogénico común se puede pasar del término fenotipo al de endotipo. Este vocablo fue introducido por Anderson en 2008 para definir subtipos distintos de asma [59]. En este sentido, sería un mismo mecanismo molecular el que definiría funcionalmente y patológicamente a un subtipo de enfermedad [60].

En la clasificación del asma las características fenotípicas representan observaciones en la esfera clínica, mientras que las diferencias en los distintos mecanismos capaces de producir la enfermedad nos permiten hablar de endotipos.

En el asma grave también se han identificado fenotipos (Tabla 4), con la finalidad de mejorar el tratamiento de estos pacientes e intentar controlar la enfermedad [61]. Se puede hablar de al menos cuatro fenotipos/endotipos, definidos atendiendo a la

patobiología, la sintomatología clínica, la historia natural y la respuesta terapéutica. Estos serían: asma alérgica grave, asma eosinofílica grave de comienzo tardío, asma no atópica grave del adulto asociada con obesidad y asma neutrofílica de inicio en la edad adulta.

El **asma alérgica grave** supone casi el 50 % del asma grave. Los pacientes presentan antecedentes personales de atopia y la clínica se inicia en la infancia. Los más graves son los que presentan mayor número de pruebas cutáneas positivas o cifras más elevadas de IgE total en sangre. En su patobiología destacan la activación de linfocitos Th2, la producción de IL4, IL5 e IL13. Parece que la FE<sub>NO</sub> puede ser un buen marcador [61].

El **asma eosinofílica grave de comienzo tardío** corresponde a alrededor del 25 % de los casos de asma grave. Se caracteriza por la persistencia de eosinófilos en el esputo inducido, a pesar del tratamiento con corticoides inhalados. Los síntomas se suelen iniciar después de los 20 años y los pacientes suelen estar diagnosticados de rinosinusitis crónica y poliposis nasal. Presentan frecuentes exacerbaciones. Pueden presentar niveles elevados de IgE y FE<sub>NO</sub>. Determinadas alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico y activación de Th2 son características de su patobiología. No suelen existir antecedentes familiares ni personales de atopia [61].

El **asma no atópica grave del adulto asociada con obesidad** predomina en mujeres con IMC elevado. Suele iniciarse en la quinta década de la vida y con exacerbaciones frecuentes. No se conocen bien ni su etiopatogenia ni sus bases genéticas [61].

Por último, en el **asma neutrofílica de inicio en la edad adulta** suelen existir antecedentes de limitación crónica al flujo aéreo y de tabaquismo. En las vías respiratorias predominan los neutrófilos. Su historia natural no se conoce bien [61].

**Tabla 4.** Fenotipos de asma grave. Elaboración propia; datos obtenidos de Cisneros Serrano *et al.* 2015 [61].

FENOTIPOS DE ASMA GRAVE	ASMA ALÉRGICA GRAVE	ASMA EOSINOFÍLICA GRAVE DE INICIO TARDÍO	ASMA NO ATÓPICA GRAVE DE ADULTO ASOCIADA A OBESIDAD	ASMA NEUTROFÍLICA DE INICIO EN LA EDAD ADULTA
% ASMA GRAVE	40-50 %	25 %	—	—
HISTORIA NATURAL	Inicio en la infancia	Menos de 20 de edad	Quinta década de vida o posteriormente. Más frecuente en mujeres	Desconocida
ANTECEDENTES PERSONALES Y FAMILIARES	Antecedentes de atopia	Rinoconjuntivitis crónica y poliposis nasal	IMC elevado	Tabaquismo. Limitación crónica al flujo aéreo
PATOBIOLOGÍA	Activación Th2. Producción de IL4, IL5 e IL13. ↑ IgE	Alteración del metabolismo del ácido araquidónico. Activación Th2.	Dudosa	Incremento de neutrófilos
BIOMARCADORES	FE <sub>NO</sub>	↑ IgE, FE <sub>NO</sub>	Dudosos	Dudosos

## 1.5. GENÉTICA Y EPIGENÉTICA

Como se ha comentado previamente, la alergia es una enfermedad compleja que depende tanto de factores genéticos como ambientales. La búsqueda de los factores de tipo genético se ha centrado en cuatro áreas: la expresión de la hiperreactividad de las vías respiratorias, la generación de mediadores inflamatorios (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento), la producción de anticuerpos IgE específicos de alérgenos y la determinación de la relación entre linfocitos Th1 y Th2 en la respuesta inmune (relevante para la hipótesis higienista del asma) [40].

Mediante estudios familiares y de casos y controles se han identificado regiones cromosómicas que están relacionadas con la susceptibilidad al asma. En el brazo largo de cromosoma 5 están próximos los genes que regulan la hiperreactividad de las vías respiratorias a los que regulan los niveles de IgE en suero [62]. Un meta-análisis de estudios de asociación en genoma completo (GWAS) definió la importancia potencial de genes tales como *IL1RL1*, *IL18R1* y *SMAD3*, involucrados en vías que inician el proceso inflamatorio asmático en respuesta al daño de las células epiteliales [63].

Se han encontrado asociaciones de variantes en genes que regulan la inmunidad innata con el asma y se ha sugerido que pueden desempeñar un papel, junto con exposiciones virales en la vida temprana, en el desarrollo de asma [64]. Mediante los estudios de asociación genómica se han determinado varios genes implicados en el asma; entre ellos cabe destacar los siguientes: *CHI3L1* (1q32.1), *DPP10* (2q14.1), *PHF11* (13q14.2), *PTGDR* (14q22.1), *SMAD3* (15q22.33) y *IL2RB* (22q12.3) [63,65].

### 1.5.1. EPIGENÉTICA

Según el DRAE la epigenética es lo relativo a la **epigénesis**, que se define como la “doctrina según la cual los rasgos que caracterizan a un ser vivo se configuran en el curso del desarrollo, sin estar preformados en el huevo fecundado”. El término epigenética fue acuñado en la década de los 50 por Waddington. Inicialmente se limitaba a la diferenciación de células pluripotenciales a células bien diferenciadas, pero actualmente hace referencia a los mecanismos de regulación genética que no implican alteración de la secuencia de ADN y son hereditarios.

Se ha demostrado que diversos mecanismos epigenéticos son capaces de regular genes implicados en la respuesta inmune y en la inflamación. El proceso de regulación

epigenética puede ser consecuencia de la metilación del ADN, de modificaciones postraduccionales de las histonas y/o por la acción de microARN (miARN) y su asociación con la exposición ambiental [66,67].

Las marcas epigenéticas no solo se transfieren a células hijas con la replicación celular, pudiendo ser heredadas de generación en generación y tienen la capacidad de silenciar un gen y, por consiguiente, modular el efecto de un polimorfismo. Los mecanismos epigenéticos podrían desempeñar un importante papel en la heredabilidad y en la patogénesis de la atopia y el asma [68].

#### 1.5.1.1. METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN se produce por acción de metiltransferasas que añaden un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) a un residuo de citosina en un dinucleótido compuesto por citosina y guanina (CpG). Las zonas enriquecidas en CpG se concentran en importantes sitios de regulación, como las regiones promotoras, y en los primeros exones de muchos genes [68].

La naturaleza palindrómica de un sitio CpG es importante, ya que asegura la replicación del patrón de metilación con cada división celular [66]. Las regiones de la cromatina relacionadas con el ADN hipometilado permiten la expresión de genes, mientras que en la cromatina inactiva el ADN se encuentra hipermetilado [69].

En la expresión y regulación de genes candidatos para el asma, la metilación del ADN desempeña un importante papel [68]. Pero el mecanismo por el cual se asocia la metilación del ADN con el silenciamiento de genes aún no se comprende en su totalidad. La metilación del ADN afecta a importantes factores de transcripción, tanto de los linfocitos T como de los B, por lo que se podría modificar el desarrollo de la respuesta inmune [68].

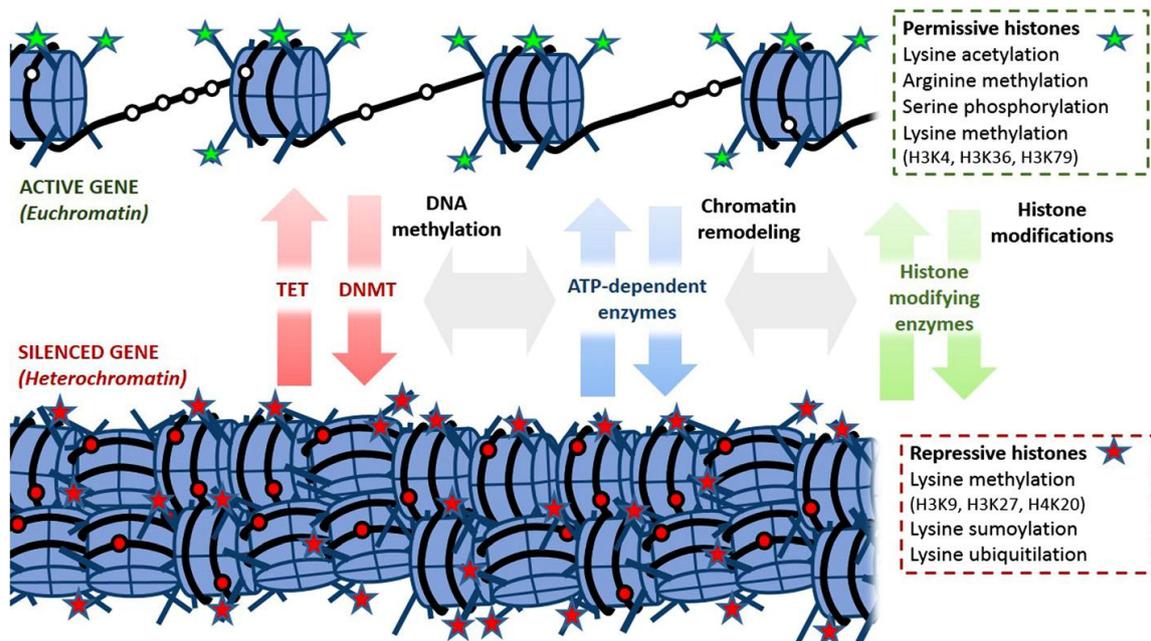
En 2008 Kwon *et al.* concluyeron que la estimulación de los linfocitos CD4 causa incremento en el grado de no metilación y que en los sensibilizados este grado de no metilación se correlaciona con la concentración de IL4 [70].

En 2011 nuestro grupo identificó por primera vez la presencia de un patrón de metilación diferencial en los linfocitos B de pacientes con asma alérgica frente a los que presentaban asma y triada de la aspirina o controles [71].

Por su parte, Breton *et al.* (2011) relacionaron la metilación del ADN y el asma; sugirieron que la metilación del ADN tenía un papel en la regulación de la producción de óxido nítrico [72].

#### 1.5.1.2. HISTONAS

La heterocromatina inactiva está densamente “empaquetada”, mientras que la eucromatina activa está menos condensada, lo que permite, a la postre, su expresión. El primer nivel de compactación de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en el enrollamiento del ADN alrededor de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Diferentes investigaciones han demostrado que existe una intensa relación entre las modificaciones covalentes de las histonas y la expresión de los genes. La acetilación o la fosforilación de las histonas se suelen asociar con un estado activo [73]. La metilación del ADN y las modificaciones de las histonas en las regiones de control de locus de los linfocitos T colaboradores (Th2) regularía la evolución hacia un fenotipo alérgico (Figura 2). Cuando se modifica el control epigenético normal por la exposición ambiental puede verse afectado el equilibrio Th1/Th2 [66].



**Figura 2. Euromatina y heterocromatina.** Islas CpG no metiladas (círculos en blanco), modificaciones permisivas de las histonas (estrellas verdes) y estructura de la cromatina no empaquetada, es decir, euromatina que promueve la transcripción de genes. Mientras que la metilación del ADN (círculos rojos), modificaciones represivas de las histonas (estrellas rojas) y la estructura condensada, esto es, la heterocromatina que impide la transcripción [66].

### 1.5.1.3. MICROARN (miARN)

En estudios recientes se han identificado miARN implicados en enfermedades alérgicas como el asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica [74]. Los miARN son moléculas de ARN no codificantes, de unos 19-25 nucleótidos, que intervienen en la regulación de la expresión génica. Se han encontrado miARN que juegan un papel importante en la regulación de los mecanismos en la inflamación alérgica, como el miR-21 y el miR-146 en la activación de las células T, el miR-21 y el miR-223 en la regulación del desarrollo de los eosinófilos o el miR-375 en la modulación de la IL-13 [74]. Se podría concluir que los miARN, como reguladores de la inflamación alérgica, pueden constituir en un futuro próximo buenos biomarcadores de la enfermedad alérgica; así como, dianas terapéuticas.

El asma y la atopia presentan rasgos genéticos complejos y el fenotipo es el resultado de la interacción de múltiples genes, cada uno con su propio patrón mendeliano de herencia. Si la madre presenta asma, la posibilidad de que sus hijos la padezcan puede ser hasta cinco veces mayor que si el que la presenta es el padre. Esta discrepancia en el riesgo parental podría explicarse en parte por la impronta de los padres, que es un proceso por el cual algunos genes son silenciados epigenéticamente durante la gametogénesis. Solo se expresa un alelo [66].

## 1.6. PTGDR

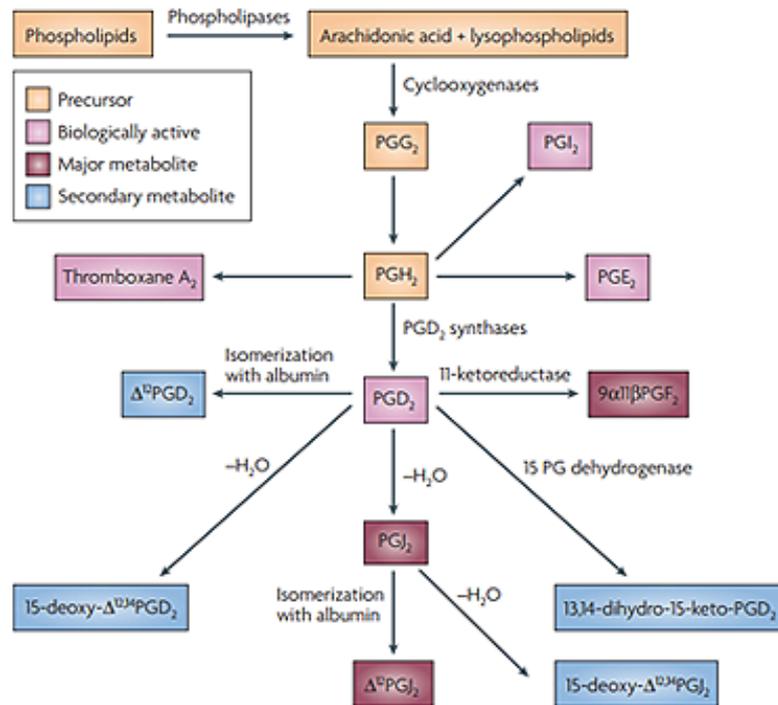
### 1.6.1. PROSTAGLANDINA D2 Y RECEPTOR PTGDR

La prostaglandina D2 (PGD2) pertenece a un grupo de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico con funciones paracrina y autocrina [75]. En el sistema nervioso central (SNC) interviene en procesos relacionados con el olfato, el sueño, la temperatura corporal y la liberación de hormonas. A nivel periférico incrementa la permeabilidad vascular y provoca vasodilatación y broncoconstricción [76]. También favorece el reclutamiento y activación de linfocitos Th2 y eosinófilos y modula la producción de citocinas por los linfocitos Th2 [77]. Además, es el principal prostanoides liberado tras la activación de los mastocitos en la respuesta inmune [78] y es considerado un importante mediador inflamatorio en las enfermedades alérgicas como la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y el asma [77]. Por todo ello, la PGD2 y sus metabolitos se han propuesto como marcadores de la activación de los mastocitos en los procesos alérgicos [79,80]. Las células dendríticas y los linfocitos Th2 también producen PGD2, aunque en cantidades muy inferiores a las producidas por los mastocitos [77].

A partir de estímulos patológicos o fisiológicos la fosfolipasa A2 inicia la síntesis de PGD<sub>2</sub>, catalizando la hidrólisis del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana plasmática [81]. Sobre el ácido araquidónico actúan las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) produciendo PGG<sub>2</sub> y, a partir de ésta, PGH<sub>2</sub>. Diferentes estímulos inflamatorios inducen la expresión de COX-2, y distintas sintetasas actúan sobre la PGH<sub>2</sub>, generando prostanoides, tromboxanos y prostaglandinas, entre ellas la PGD<sub>2</sub> (Figura 3). La sintetasa de PGD<sub>2</sub> es una proteína citosólica presente en mastocitos, basófilos, células dendríticas y algunos linfocitos Th2.

Las funciones biológicas de la PGD<sub>2</sub> están mediadas por receptores específicos, entre los que destacan el receptor prostanoide D (PTGDR, receptor de PGD<sub>2</sub>, DP o DP1) y el receptor DP2 o CRTH2 (molécula quimioatrayente homóloga al receptor expresado en células Th2). Ambos son receptores transmembranarios de siete dominios acoplados a la proteína G [82].

El CRTH2 es un receptor quimiotáctico que provoca disminución del AMPc (adenosinmonofosfato cíclico) intracelular. Está presente en la superficie de eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2 y su efecto biológico es la quimiotaxis y activación de estas células [77,82].



**Figura 3.** Síntesis de la PGD<sub>2</sub>. Tomada de Pettipher *et al.* 2007 [77].

La actividad del receptor DP1 o PTGDR está mediada principalmente por proteínas Gs que estimulan la adenilatociclasa localizada en la membrana celular, cuya activación induce una elevación intracelular de AMPc. Se expresa en el músculo liso bronquial, en los vasos sanguíneos, en las células dendríticas, en las plaquetas o en los linfocitos B [83]; así como, en el SNC [77,82].

El receptor PTGDR está codificado por el gen PTGDR, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 14 (14q22.1), una región que se ha asociado con el asma [84]. Boie *et al.* caracterizaron en 1995 el receptor PTGDR. Se compone de 359 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 40.276 kDa [76]. Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de este receptor con la del resto de receptores de prostaglandinas, se encuentra una mayor similitud con EP2 y EP4, dos receptores de la PGE<sub>2</sub>, y con IP, receptor de prostaglandina I<sub>2</sub> [85].

### 1.6.2. GEN *PTGDR* Y ENFERMEDADES ALÉRGICAS

Se ha relacionado el fenotipo asmático con polimorfismos en la región promotora del gen *PTGDR* que influyen en la regulación de la transcripción y en este sentido, -613 C>T y -197 T>C se encuentran en el sitio de unión de diferentes factores de transcripción.

Oguma *et al.* fueron, en 2004, los primeros en establecer relaciones entre los polimorfismos del gen *PTGDR* y el asma [82]. Estos autores describieron que los polimorfismos *PTGDR* -549 T>C, -441 C>T, y -197 T>C tienen factores de transcripción distintos, y concluyeron que la actividad promotora de este gen presentaba distinta eficiencia en función de la combinación haplotípica, lo que implicaba un distinto riesgo de desarrollar asma determinado por dicha combinación [82].

En 2009 Sanz *et al.* analizaron por primera vez el polimorfismo -613 C>T de la región promotora del gen *PTGDR* en niños. Estos autores observaron asociaciones génicas de los SNP -613 y -197 con el asma [86]. Teniendo como punto de partida el incremento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas en los países desarrollados, en 2011 Isidoro *et al.* consideraron que podría tener importancia el componente epigenético, es decir, que la combinación de factores genéticos y epigenéticos modulase la expresión del gen *PTGDR*. Se evidenció un patrón de metilación del ADN distinto entre los controles y los pacientes; así, los asmáticos alérgicos mostraban una hipometilación del promotor del gen *PTGDR* [83].

Posteriormente, en 2012, Lee *et al.* [87] realizaron un meta-análisis para determinar si los polimorfismos del gen *PTGDR* -549 T>C, -441 C>T, y -197 T>C y los haplotipos CCC y TCT conferían susceptibilidad a presentar asma. Estos autores analizaron un total de 13 estudios comparativos, separados en nueve artículos, que involucraban a 7.155 pacientes con asma y 7.285 controles. Existe cierta controversia en las asociaciones génicas y el asma que puede ser consecuencia del tipo de población incluida en los

diferentes estudios pertenece a diversas etnias (europeos, asiáticos y afro-americanos), de muy diversas edades, y como se ha comentado los aspectos relacionados con el fenotipo. Finalmente, los autores refieren que no han considerado el poder estadístico ni FPRP en los estudios incluidos en meta-análisis.

# 2. HIPÓTESIS



## HIPÓTESIS

Tanto la rinitis como el asma alérgicas, son patologías multifactoriales en las que tienen influencia tanto factores genéticos como ambientales, por lo que nuestra hipótesis principal se basa en que el análisis integrado de las variables clínico-biológicas en los pacientes alérgicos y su contexto epidemiológico podrían proporcionar importante información sobre el desarrollo de la enfermedad alérgica. Para ello, la aplicación de modelos estadísticos multivariantes en el análisis de las interrelaciones de dichas variables podría permitir una mejor caracterización fenotípica de los pacientes con asma alérgica.

Además, en los últimos años se han identificado numerosos genes relacionados con el asma. Nuestra hipótesis secundaria sería que la presencia de ciertos polimorfismos en la región promotora del gen *PTGDR* podría estar relacionada con las características clínico-biológicas de los pacientes alérgicos. La integración del estudio de asociación podría permitir la identificación de biomarcadores asociados a fenotipos determinados, existiendo la posibilidad de que el nivel de expresión del gen *PTGDR* influya en los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en el asma alérgica.



# 3. OBJETIVOS



## OBJETIVOS

1. Analizar la posible influencia de las variables clínicas y biológicas en la enfermedad alérgica, tanto en la rinitis como en el asma alérgica con la finalidad de identificar posibles biomarcadores que permitan caracterizar a la población analizada y predecir el riesgo de desarrollar un determinado fenotipo de asma.
2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos -1289 G>A, -1122 T>C, -881 C>T, -834 C>T, -613 C>T, -549 T>C, -441 C>T y -197 T>C, del gen *PTGDR* en una población de pacientes con patología alérgica respecto a una población control estrictamente seleccionada.
3. Valorar la relación de los polimorfismos individualmente considerados con los parámetros clínico-biológicos y establecer la posible implicación del nivel de expresión del gen *PTGDR* en el asma alérgica.
4. Analizar mediante técnicas estadísticas multivariantes las posibles relaciones existentes entre las diferentes variables clínico-biológicas en la población alérgica y estudiar la posibilidad de delimitar fenotipos en los pacientes con asma alérgica de nuestro estudio.



# 4. MATERIAL Y MÉTODOS



## 4.1. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

En el presente estudio han participado 473 individuos que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Fueron incluidos en el mismo tras la firma de un consentimiento informado siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las propias del Comité de Ética del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Los Facultativos Especialistas en Alergología de dicho servicio examinaron a todos los individuos que participaron en el estudio, elaboraron sus historias clínicas, que posteriormente han sido revisadas, y recogieron una serie de datos referentes a su situación clínica, analítica, pruebas diagnósticas y tratamiento –a través de un formulario– (Apéndice I). Todos esos datos han sido incluidos en este estudio como variables y, tanto los pacientes como los controles, lo han sido siguiendo unos estrictos criterios de selección.

### 4.1.1. DATOS RECOGIDOS

Se recogieron datos de filiación como el número de historia clínica, apellidos, nombre, sexo, edad o la fecha de nacimiento; así como, la fecha de consulta en el Servicio de Alergia y los datos del facultativo asignado al seguimiento del individuo, todo ello a través de la correspondiente etiqueta identificativa. Estos datos solo se emplearon en la identificación inicial de cada individuo, pero no se reflejan en ningún otro momento a lo largo del estudio o el análisis, que se ha realizado aplicando un sistema de disociación de datos.

Entre las variables clínicas consideradas se incluyen: la realización de pruebas cutáneas y sus resultados, ser fumador o no, la presencia de asma y la clasificación de la misma según la gravedad (según los criterios de la GEMA 2009)[88], la edad de aparición del asma, la presencia de asma en la infancia, la existencia de rinitis alérgica y su clasificación (según el documento ARIA), la presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia, la edad de aparición de la rinitis, la existencia de dermatitis atópica en la infancia, la realización de espirometría y, cuando así fue, se reflejaron los valores de índice de masa corporal (IMC), la capacidad vital forzada (FVC) –en cifras absolutas y porcentaje–, el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) –en cifras absolutas y porcentaje–, el índice FEV1/FVC en porcentaje, el flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75 % de la FVC (FEF25-75) –en cifras absolutas y porcentaje–, la realización de prueba broncodilatadora y su resultado, la determinación de la fracción de óxido nítrico exhalado (FE<sub>NO</sub>) y su valor absoluto, la realización del test de metacolina y su resultado, el recuento de eosinófilos en sangre periférica en valores absolutos y porcentaje y los valores séricos de IgE total.

Además se recogió información sobre, los antecedentes familiares de primer grado de atopia, de asma, de rinitis alérgica y de poliposis, los antecedentes de madre con atopia, los antecedentes de madre con asma alérgica, la presencia de intolerancia respiratoria a antiinflamatorios no esteroideos (AINE), la existencia de poliposis y su grado, los antecedentes de inmunoterapia y, en caso positivo, el tipo de inmunoterapia recibida, el escalón terapéutico de tratamiento (según la GEMA 2009), la clasificación según el control del asma y, por último, el registro de asistencia al Servicio de Urgencias en el último año por la reagudización del asma y de ingresos hospitalarios por esta patología.

Tanto la anamnesis, la exploración física como el registro de las diferentes pruebas complementarias quedaron reflejadas en la historia clínica de cada individuo en el día de su realización; así como, la fecha de extracción de la muestra sanguínea para la realización del estudio del ADN.

#### 4.1.2. VARIABLES

A continuación se presentan las diferentes variables recogidas en el estudio.

A través de la anamnesis se recogieron datos para las siguientes variables:

##### 4.1.2.1. ANTECEDENTES FAMILIARES DE PRIMER GRADO

Se preguntó a los pacientes si entre sus padres, hermanos o hijos había alguno con atopia, asma alérgica, rinitis alérgica o poliposis. También si su madre tenía, o había tenido, asma y/o antecedentes de atopia.

##### 4.1.2.2. FUMADOR

Se indagó sobre el consumo de tabaco, haciendo hincapié en si en aquel momento eran consumidores activos.

##### 4.1.2.3. INTOLERANCIA RESPIRATORIA A AINE

Se consultó a los pacientes si habían presentado intolerancia respiratoria tras el consumo de antiinflamatorios no esteroideos.

##### 4.1.2.4. POLIPOSIS

Se investigó si tenían antecedentes de poliposis nasal y en caso positivo qué grado presentaban, comprobándose su existencia mediante rinoscopia anterior o evaluación previa por ORL. También se les preguntó por la existencia de antecedentes de cirugía endoscópica nasosinusal o de polipectomía nasal.

##### 4.1.2.5. ANTECEDENTES DE ATOPIA EN LA INFANCIA

Se les preguntó por el diagnóstico de asma o de dermatitis atópica y/o la existencia de pruebas cutáneas intraepidérmicas (*prick-test*) positivas en la infancia.

En la historia clínica se registraron los síntomas que presentaban los pacientes y los datos de su exploración física. Entre los síntomas guía de asma destacan la presencia de sibilancias, disnea, tos y opresión torácica, pero ninguno de ellos es específico. Se preguntó por la duración, la intensidad, el momento de presentación y los posibles desencadenantes de los síntomas, o si aparecían más durante la noche, si se utilizaban medicamentos inhalados para su control y si esta sintomatología condicionaba la actividad diaria y el descanso nocturno.

Se constató la edad de inicio de los síntomas, si habían sido o no progresivos, qué diagnósticos asociados presentaban y el tratamiento para poder establecer el escalón terapéutico. Si asociados a los síntomas de asma presentaban síntomas de rinitis alérgica, se reflejó la edad de inicio de ésta y su clasificación según ARIA. También se preguntó si recibían inmunoterapia y, en caso positivo, el tipo de la misma. Se valoró el grado de control del asma con el tratamiento, si habían precisado asistir a Urgencias o si habían tenido ingresos hospitalarios por crisis asmática. Se registró también si los síntomas que presentaba el paciente repercutían en su vida familiar, social y/o laboral.

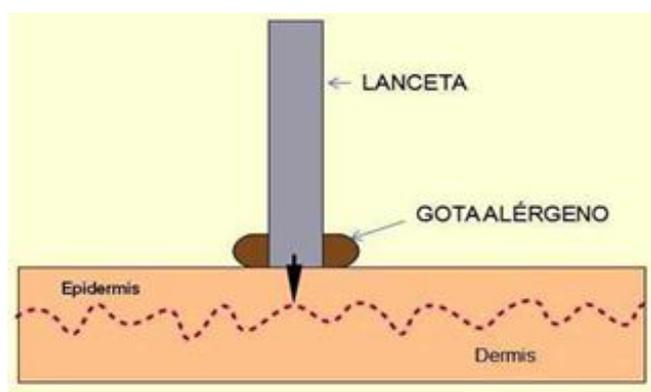
Si tras la anamnesis y la exploración física se sospechó el diagnóstico de asma se procedió a solicitar pruebas diagnósticas que pudieran demostrar de forma objetiva esta patología. Se realizaron pruebas cutáneas intraepidérmicas, espirometría forzada, prueba broncodilatadora, fracción exhalada de óxido nítrico (FE<sub>NO</sub>) y, en algunos casos, test de metacolina. También se realizó una toma de muestra sanguínea para determinar eosinófilos en sangre periférica y niveles de IgE total; así como, para el estudio del ADN.

#### ● PRUEBAS CUTÁNEAS INTRAEPIDÉRMICAS

A todos los pacientes se les realizaron pruebas cutáneas de punción intraepidérmica, ya que es el método diagnóstico de elección para determinar los aeroalérgenos implicados en la patología alérgica. Estas pruebas fueron llevadas a cabo siguiendo las

recomendaciones para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la EAACI (*The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) [89].

Dichas pruebas se basan en reproducir la reacción de hipersensibilidad inmediata de tipo I, mediada por IgE, al introducir un extracto de alérgeno en la epidermis con una lanceta adecuada (Figura 4); lo que desencadena la liberación de histamina de los mastocitos cutáneos, provocando, a su vez, una pápula y eritema en la zona de punción [6].



**Figura 4.** Fundamento de las pruebas intraepidérmicas. Tomado de Alamar Martínez *et al.* [6].

Se empleó una batería con los aeroalérgenos más frecuentes en nuestro entorno (ALK-Abelló, Madrid; Bial-Aristegui, Bilbao; CBF-Leti, Barcelona). Son los siguientes:

**Ácaros:** *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*.

**Hongos:** *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*.

**Pólenes:** - Gramíneas: *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*.

- Malezas: *Artemisia vulgaris*, *Chaenopodium album*, *Parietaria judaica*, *Plantago lanceolata*.
- Árboles: *Cupressus arizonica*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*, *Quercus ilex*.

**Epitelios:** caballo, conejo, gato, hámster, perro.

Los extractos utilizados están estandarizados mediante cuantificación biológica; se presentan diluidos en glicerina al 50 % y con fenol al 0,51 %. La glicerina aumenta la estabilidad y viscosidad del preparado, formando gotas que se mantienen en la piel sin esparcirse y permitiendo una técnica de punción correcta. El volumen de extracto por vial es de 2 ml y su caducidad es de 36 meses desde la fecha de fabricación. Se deben conservar entre 2 y 8 °C (en nevera). Se suministran en envases con cuentagotas, y tanto los viales como los goteros están completamente libres de látex.

Antes de iniciar la prueba se explicó al paciente el procedimiento, indicándole que evitara el rascado de la zona hasta valorar los resultados y, por supuesto, se solicitó su consentimiento. Además, se comprobó la no presencia de síntomas agudos de asma. Como control positivo se empleó una solución de histamina 10 mg/ml (ALK-Abelló, Madrid) y como negativo una solución salina al 0,9 % (Braun, Barcelona).

Se consideró la prueba positiva si se objetivaba la presencia de eritema y/o pápula en el lugar de la prueba con un diámetro 3 mm mayor que el control negativo. Para su realización se tuvieron en cuenta todos aquellos factores que pudieran influir en el resultado, como la toma de antihistamínicos (deben suspenderse de 3 a 10 días antes de la prueba), el estado de la piel (la existencia de dermatitis atópica o eccema y el dermatografismo falsean los resultados), la técnica de punción, la capacidad de respuesta de cada individuo o la medición del eritema y/o pápula por la variabilidad intra e interobservador.

## ● ESPIROMETRÍA

Se realizó una espirometría forzada a los pacientes por ser una técnica que mide flujos y volúmenes pulmonares generados en una maniobra de espiración máxima forzada, siendo estos útiles para el diagnóstico y la clasificación del asma. Es una prueba sencilla y de bajo coste, en la que obtenemos dos curvas básicas para interpretar los valores espirométricos: curva volumen-tiempo y curva flujo-volumen.

Los parámetros obtenidos de ambas curvas fueron los siguientes:

**Capacidad vital forzada (FVC).** Es el máximo aire que puede ser espirado de forma forzada tras una inspiración máxima. Es un volumen, y se expresa en ml o como porcentaje frente a una tabla de cifras teóricas para los datos antropométricos de paciente (edad, sexo, altura, raza).

**Volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV1).** Es la cantidad de aire que se moviliza en el primer segundo desde que comienza la espiración forzada. Es un flujo, y puede expresarse como ml/s o como un tanto por ciento frente a sus cifras teóricas.

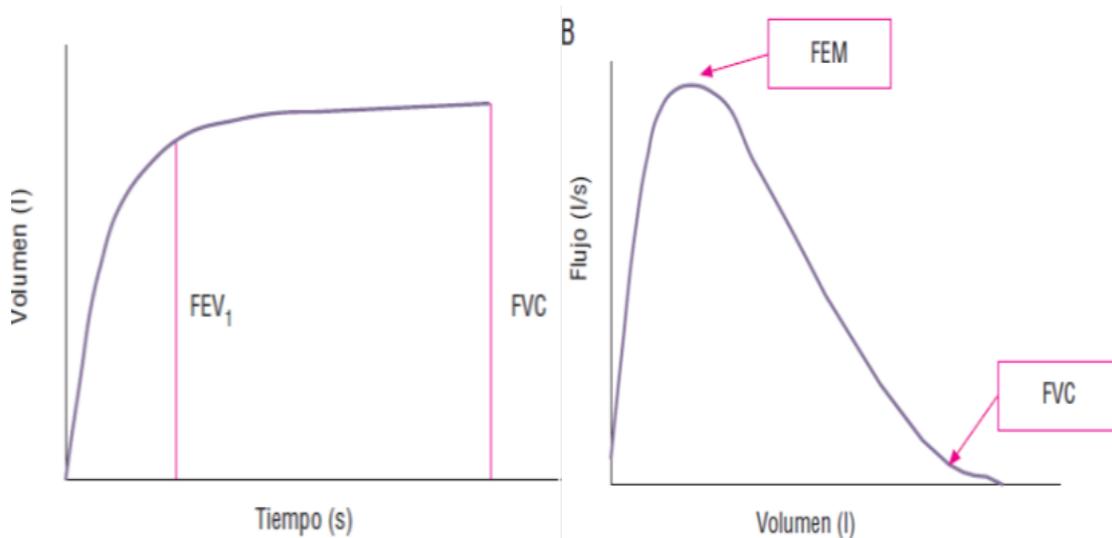
**Cociente FEV1/FVC.** Informa de la cantidad de capacidad vital forzada que se espira en el primer segundo. Es una tasa, por lo que suele representarse en tanto por ciento. En condiciones normales este porcentaje es > 70 %.

**Flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75 % de la FVC (FEF25-75%).** Aporta información sobre qué cantidad del aire total espirado lo hace entre el 25 y el 75 % del tiempo de espiración. Es un flujo, y puede expresarse como ml/s o como un tanto por ciento frente a sus cifras teóricas. Para su cálculo se elimina la parte inicial y final de la curva volumen/tiempo, por lo que, para algunos autores, es un parámetro muy sensible y marcador precoz de la obstrucción de las vías aéreas más finas y, en muchas ocasiones, es el único que está afectado.

Antes de la realización de la espirometría forzada se tuvo en cuenta si existía alguna contraindicación para la realización de la misma. La espirometría fue realizada por personal cualificado y perfectamente entrenado, en un ambiente tranquilo. Previamente se explicó a los paciente las maniobras a realizar [90].

En el Servicio de Inmunoalergia se utilizan dos espirómetros: DATOSPIR-600 (Sibelmed-SIBEL SA, Barcelona) y MasterScope (CareFusion, Hoechberg, Alemania). Antes de iniciar la jornada de trabajo, se procedió a la calibración de los espirómetros según las condiciones meteorológicas del día (presión atmosférica, humedad relativa y temperatura). También se calibró el nebulizador mediante maniobras regulares.

La maniobra espirométrica se llevó a cabo un mínimo de tres ocasiones y un máximo de ocho, exigiéndose una variación del FEV<sub>1</sub>  $\leq$  5 %. Se comprobó si la curvas volumen-tiempo y flujo-volumen eran reproducibles y aceptables (Figura 5). La reproducibilidad se consideró aceptable cuando la diferencia entre el mayor FVC y el siguiente y entre el mayor FEV<sub>1</sub> y el siguiente fueron inferiores o iguales a 150 ml y al 5 %.



**Figura 5.** Curvas volumen-tiempo y flujo-volumen.

### ● PRUEBA BRONCODILATADORA

Tras comprobar la existencia de un patrón obstructivo está indicada la realización de un test de broncodilatación para demostrar que es una obstrucción reversible. Se realizó administrando cuatro inhalaciones sucesivas de 100 µg de salbutamol mediante un inhalador presurizado con cámara espaciadora y se repitieron las maniobras espirométricas, siguiendo los mismos criterios de calidad y repetibilidad anteriormente expuestos. De acuerdo con las guías más recientes, se consideró que la prueba broncodilatadora fue positiva si la diferencia entre FEV1 post y FEV1 pre fue superior a 200 ml y si el porcentaje de variación del valor absoluto del FEV1 antes y después de la prueba fue  $\geq 12\%$  [7].

Incremento en porcentaje =  $(\text{Valor post} - \text{Valor pre}) \times 100 / \text{Valor pre}$

La reversibilidad de la obstrucción bronquial es característica del asma, pero no está presente en todos los pacientes.

### ● FRACCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EXHALADO (FE<sub>NO</sub>)

El óxido nítrico (NO) se sintetiza por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), que cataliza la reacción a partir de aminoácido L-arginina, produciendo L-citrulina y NO. Esta enzima precisa la presencia de oxígeno y NADPH [91]. Existen tres isoformas de esta enzima. Dos son denominadas constitutivas: la endotelial, localizada en epitelio pulmonar y endotelio vascular [92], y la neuronal, a nivel del epitelio de las vías respiratorias (probablemente en los nervios de la submucosa) [93]. Ambas sintetizan NO en condiciones normales. La tercera isoforma se conoce como inducible. Se expresa escasamente en condiciones fisiológicas, está presente en el epitelio de la vía respiratoria y en células que participan en el proceso inflamatorio (mastocitos, macrófagos, neutrófilos) y es inducida por citocinas proinflamatorias, por lo que se considera el NO como un marcador de inflamación. Estará elevado en algunas enfermedades inflamatorias, como el asma.

Se puede cuantificar el NO presente en el aire exhalado procedente de la pared de las vías aéreas y del alveolo, la denominada fracción exhalada de óxido nítrico ( $FE_{NO}$ ). En 2005 la *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS) publicaron un documento conjunto para estandarizar el procedimiento de medida de la  $FE_{NO}$  [94]. Para su determinación se puede utilizar un método de registro online, donde la concentración de NO se establece por el paso directo del aire exhalado al trazador, expresándose en partes por mil millones (ppb).

Para la cuantificación de la  $FE_{NO}$  en el Servicio de Inmunoalergia se utiliza el monitor NIOX VERO (Aerocrine, Solna, Suecia). El procedimiento consiste en realizar una inhalación a través de la boquilla del aparato hasta capacidad pulmonar total, seguida de una exhalación durante 10 segundos que es controlada por un sensor lumínico y acústico para facilitar y asegurar el flujo.

Existen una serie de factores que se deben considerar para la valoración final de la  $FE_{NO}$ . La ingesta de alimentos ricos en nitratos, como la lechuga, produce un incremento en los niveles de  $FE_{NO}$ , mientras que la ingesta de alcohol los reduce en pacientes con asma y en sujetos sanos [95]. El consumo de un único cigarrillo antes de la prueba reduce de forma transitoria los niveles de  $FE_{NO}$ , por lo que se recomienda no fumar una hora antes de la determinación [96]. Tanto las infecciones víricas del tracto respiratorio inferior como del superior se acompañan de un incremento de la  $FE_{NO}$  en asmáticos. Aunque los estudios no son concluyentes, parece que el ejercicio físico reduce los niveles de  $FE_{NO}$ ; por ello, se aconseja no realizar ejercicio extenuante una hora antes de la prueba. Los corticoides inhalados o sistémicos inhiben la síntesis de la isoforma inducible de la NOS, por lo que su administración disminuye los niveles de  $FE_{NO}$  en pacientes asmáticos tratados [97]. La cuantificación de  $FE_{NO}$  puede ser útil para valor el cumplimiento terapéutico del paciente.

En 2011 la ATS recomendó identificar puntos de corte clínicamente significativos e interpretar los valores de  $FE_{NO}$  de cada individuo en función del contexto en el que hayan sido obtenidos [98]. Los valores de referencia propuestos son:

- ✓  $FE_{NO}$  bajo (< 25 ppb). Tiene un alto valor predictivo para la ausencia de inflamación eosinófila.
- ✓  $FE_{NO}$  alto (> 50 ppb). En pacientes sintomáticos es marcador de una buena respuesta a corticoides.
- ✓  $FE_{NO}$  entre 25-50 ppb. Valores en este rango han de ser interpretados con cautela en función del contexto clínico.

Se puede concluir que la  $FE_{NO}$  es una prueba no invasiva que informa sobre el nivel de inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Es, por tanto, una herramienta útil tanto para el diagnóstico como para el manejo del paciente asmático.

#### ● TEST DE METACOLINA

Para valorar la hiperreactividad bronquial (HRB) se realizó el test de metacolina, que es el método más estandarizado y de mayor utilidad clínica para detectarla. Está indicado en pacientes con manifestaciones clínicas sugerentes de asma, pero que presentan una espirometría normal.

La metacolina, derivado sintético de la acetilcolina, actúa sobre los receptores colinérgicos de las vías aéreas produciendo broncoconstricción. Su efecto se bloquea con atropina u otros anticolinérgicos. En los asmáticos el músculo liso respiratorio es más sensible a la metacolina que en los pacientes sanos y, por consiguiente, se contrae con concentraciones más bajas de este fármaco.

Algunos fármacos como los antihistamínicos o el bromuro de ipratropio pueden modificar la respuesta bronquial a la metacolina; es por ello, que al informar a los

pacientes, antes de la realización de la prueba, se les preguntó acerca de cuál era su medicación habitual y si tomaban fármacos que pudiesen interferir (se les indicó cuándo debían suspenderlos). Los pacientes no deben fumar ni tomar bebidas excitantes (té, café, refrescos de cola) en el día de la realización de la prueba.

También se toman en consideración las contraindicaciones para la realización de este test, como la presencia de obstrucción grave al flujo aéreo ( $FEV1 < 50 \%$ ), la hipertensión arterial (HTA) no controlada o aneurisma aórtico, infarto agudo de miocardio (IAM)/Ictus en los últimos tres meses y arritmias severas.

A continuación se describe brevemente el procedimiento de esta prueba [99]. Se realizó una espirometría basal para conocer la situación del paciente. Si el paciente cumplía los criterios para comenzar la prueba, se continuaba con la inhalación de suero salino 0,9 %. Posteriormente se administraron dosis crecientes de metacolina inhaladas mediante nebulizador y, a los 30-90 segundos de la administración de cada dosis, se realizó una nueva espirometría.

Se empleó Provocholine<sup>®</sup>, sal cristalina en polvo que se diluye con PBS. Se determinó qué concentración de metacolina produce un descenso del FEV1 igual o superior al 20 % del valor basal. A esta concentración se la denomina PC20 y se considera la prueba positiva. Se revirtió, cuando fue necesario, la broncoconstricción mediante la administración de dos dosis de salbutamol inhalado. Si no había cambios en el FEV1, se repitieron las inhalaciones de metacolina hasta alcanzar la dosis máxima y se consideró la prueba como negativa. Es una prueba con alto valor predictivo negativo y, por tanto, es útil para excluir el diagnóstico de asma.

#### ● EOSINÓFILOS EN SANGRE PERIFÉRICA

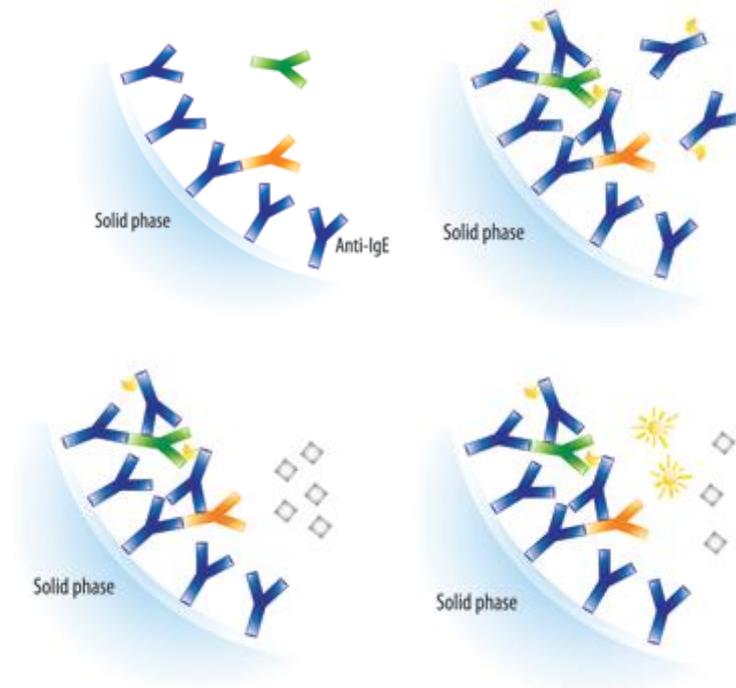
A todos los pacientes participantes en el estudio se les realizó una extracción de sangre periférica, en un tubo con EDTA, para la determinación de un hemograma. Se recogieron los datos sobre los eosinófilos, tanto en número absoluto como en

porcentaje. Utilizando como punto de corte  $\geq 0.27 \times 10^3 / \mu\text{l}$  eosinófilos en sangre periférica se ha publicado que se puede diferenciar la inflamación eosinofílica de la no eosinofílica con una sensibilidad de 78 % y una especificidad del 91 % [100]. Por ello, se utilizó este punto de corte para categorizar el número absoluto de eosinófilos en sangre periférica de nuestra base de datos.

#### ● DETERMINACIÓN DE IgE

A todos los pacientes se les realizó una extracción de suero en un tubo sin anticoagulante para determinar los niveles de IgE total mediante el ensayo InmunoCAP Total IgE (PhadiaInmunoCAP 250, Uppsala, Suecia).

Se trata de un fluoroenzimoinmuno ensayo clásico de tipo sándwich. Los anticuerpos anti-IgE están unidos de forma covalente a la fase sólida, que es un derivado de celulosa dentro de una cápsula, y reaccionan con la IgE total presente en el muestra de suero del paciente. Tras el lavado de las IgE no ligadas, se adiciona antisuero monoclonal (conejo/ratón anti-IgE humana) unido a la enzima betagalactosidasa para formar un nuevo complejo. Después de la incubación, el complejo anti-IgE enzima no ligado es lavado y el complejo ligado es incubado con la solución que contiene el sustrato de dicha enzima (solución de desarrollo). Tras la incubación se añade una solución para detener la reacción y se mide la fluorescencia, que es directamente proporcional a la concentración de IgE en la muestra de suero. Empleando una curva patrón las unidades de respuesta se transforman en concentraciones de IgE total (Figura 6). Los resultados se expresan en kilo unidades internacionales por litro (kU/L).



**Figura 6.** 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 pocillos, en verde y naranja la IgE total del suero del paciente a cuantificar y en azul con amarillo los anticuerpos anti-IgE marcados enzimáticamente (Phadia InmunoCAP 250, Uppsala, Suecia).

Tras la anamnesis, la exploración física y las pruebas complementarias se clasificó a cada paciente según las indicaciones establecidas en la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA 2009) [88], revisadas en la GEMA 4.0 [7] (Tabla 5).

**Tabla 5.** Clasificación del asma según la GEMA 4.0 [7]. Elaboración propia.

ASMA	INTERMITENTE	PERSISTENTE LEVE	PERSISTENTE MODERADA	PERSISTENTE GRAVE
<b>SÍNTOMAS DIURNOS</b>	No (2 veces o menos a la semana)	Más de 2 veces a la semana	Síntomas a diario	Síntomas continuos (varias veces al día)
<b>MEDICACIÓN DE ALIVIO (agonista <math>\beta</math>2-adrenérgico de acción corta)</b>	No (2 veces o menos/ semana)	Más de 2 veces a la semana pero no a diario	Todos los días	Varias veces al día
<b>SÍNTOMAS NOCTURNOS</b>	No más de 2 veces al mes	Más de 2 veces al mes	Más de una vez a la semana	Frecuentes
<b>LIMITACIÓN DE LA ACTIVIDAD</b>	Ninguna	Algo	Bastante	Mucha
<b>FUNCIÓN PULMONAR (FEV1 O PEF) PORCENTAJE TEÓRICO</b>	> 80 %	> 80 %	> 60 % - < 80%	≤ 60 %
<b>EXACERBACIONES</b>	Ninguna	Una o ninguna al año	Dos o más al año	Dos o más al año

#### 4.1.3. SUJETOS

Un total de 473 individuos han sido incluidos en el presente estudio.

##### 4.1.3.1. PACIENTES

Se ha incluido en el estudio un grupo de 297 pacientes, siendo los criterios de inclusión los que a continuación se detallan: edad superior a 14 años y diagnóstico de asma y/o

rinitis alérgica por un Facultativo Especialista del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

#### 4.1.3.2. CONTROLES

Para el grupo control se exigieron los siguientes criterios:

- ✓ Edad superior a 18 años.
- ✓ Ausencia de síntomas y antecedentes de asma.
- ✓ Ausencia de síntomas y antecedentes de otras enfermedades respiratorias.
- ✓ Ausencia de antecedentes de atopia.
- ✓ Pruebas cutáneas negativas frente a la misma batería de aeroalérgenos que la empleada para diagnosticar a los pacientes.
- ✓ Ausencia de antecedentes de asma y atopia en familiares de primer grado.
- ✓ Ig E total < 120 kU/L.

## 4.2. ANÁLISIS MOLECULAR

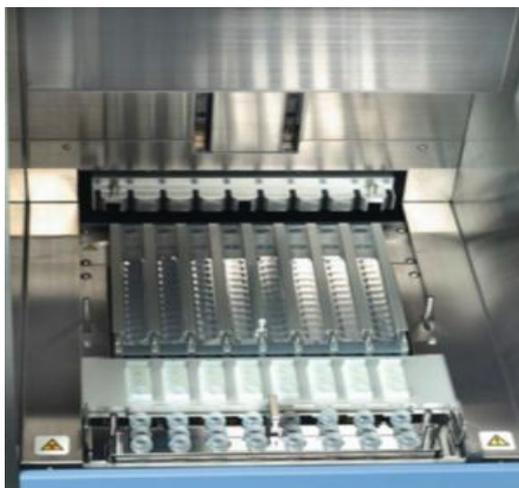
### 4.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

Mediante venopunción se realizó la extracción de una muestra de sangre periférica a todos los pacientes y controles. Se utilizaron tubos de vacío con EDTA como anticoagulante, se alicuotaron las muestras y se identificaron en crioviales que se almacenaron a -20 °C hasta la extracción del ADN. Se empleó el sistema automático *MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I-Large Volume* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) para la extracción del ADN a partir de sangre total. Mediante el

espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EE.UU.) se determinó la concentración y pureza del ADN obtenido.

El *MagNa Pure Compact* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) es un robot automatizado que permite obtener ácidos nucleicos a partir de sangre total, suero y cultivos celulares. El ADN genómico extraído mediante este sistema es de gran calidad y adecuado para usar en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Cada kit contiene los reactivos y materiales necesarios para la extracción (*MagNa Pure Compact Reagent Kits*). Puede aislar automáticamente ácidos nucleicos a partir de una muestra de sangre total sin procesamiento previo. La unidad central es un brazo robótico con 8 entradas para las puntas de pipeta que se incluirán en cada proceso. El robot puede procesar de 1 a 8 muestras por sesión y tiene un sensor especializado que puede detectar coágulos en la muestra de partida. También tiene integrado un ordenador con una consola táctil (Figura 7).

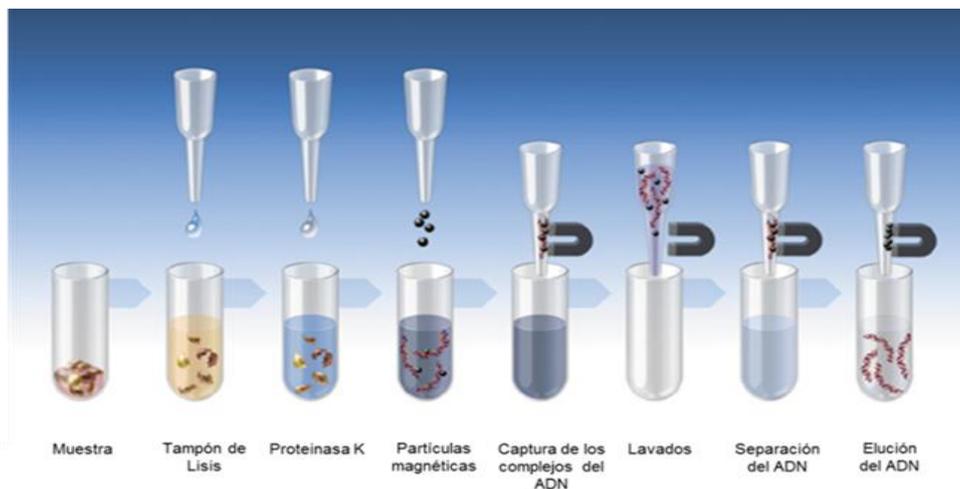
El fundamento de trabajo es un sistema de partículas magnéticas (*MagNa Pure Magnetic Glass Particle Technology*) contenidas en un cartucho que se utilizan para separar los ácidos nucleicos.



**Figura 7.** Vista del interior del equipo con los cartuchos insertados en el carrusel, las puntas de pipeta, los tubos con las muestras y los tubos de elución preparados para la extracción.

Los pasos del protocolo (Figura 8) son los siguientes:

1. A la muestra de sangre total se le añade un tampón de lisis que contiene proteinasa K para destruir proteínas, Tritón X-100 (un detergente que facilita la rotura de las membranas celulares) e inhibidores de desoxirribonucleasas y ribonucleasas.
2. La mezcla se incuba a temperatura elevada (50 °C), se añade una solución con partículas magnéticas e isopropanol y esto permite la unión del ADN a la superficie de las partículas de vidrio magnéticas.
3. Captura del complejo ADN-bolas magnéticas mediante un imán.
4. Eliminación de los restos celulares por sucesivos pasos de lavado.
5. Elución del ADN a elevada temperatura, mientras que el imán retiene las partículas de vidrio magnéticas.



**Figura 8.** Esquema gráfico del protocolo de extracción del *MagNa Pure Compact*.

Se siguió el protocolo anterior con cada una de las muestras. Las alícuotas de 950  $\mu\text{L}$  que se habían mantenido almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a temperatura ambiente y para su correcta homogeneización se colocaron en un agitador de rodillos durante unos minutos. Tras encender el aparato, se seleccionó el protocolo "DNA blood\_1000", para 1 ml de muestra de sangre total y elución en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Se colocaron los cartuchos de reactivos en el carrusel tras la lectura del código de barras. Las puntas desechables también fueron colocadas en el equipo.

Las alícuotas descongeladas se dispusieron en la parte posterior del rack de muestras, identificadas según el número de laboratorio, y en el ordenador del instrumento se introdujo esta misma identificación. Los tubos de elución se colocaron en la parte delantera del rack de muestras, identificando cada tubo con el número de laboratorio de la muestra y leyendo el código de barras para su correcta identificación en el ordenador del instrumento. Se procedió a la extracción automática de ADN, con una duración aproximada de 40 minutos.

Finalizado el programa se recogieron los tubos de elución con el ADN, se desecharon los cartuchos de reactivos y las puntas de pipetas. Se limpió el instrumento por dentro con etanol al 70 % y se descontaminó con luz ultravioleta durante 1 hora.

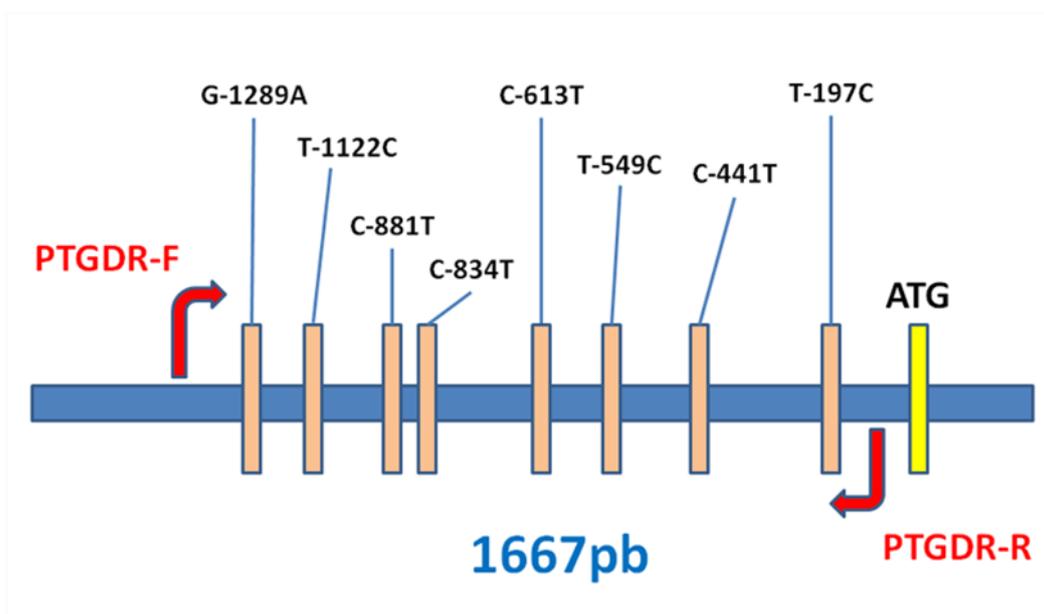
Una vez extraídas las muestras, se evaluó el rendimiento de las mismas mediante la determinación de la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 con el fin de analizar la cantidad y calidad de ADN extraído. La tecnología patentada por NanoDrop™ se basa en utilizar la tensión superficial formada por la columna de cada una de las muestras en el soporte del equipo.

Con tan solo 1,5  $\mu\text{l}$  de muestra se asegura que la columna de líquido formada es suficiente para medir la absorbancia. La ratio de absorbancia a 260 y 280 nm se utiliza

para validar la pureza del ADN. Una ratio de 1,8 se considera aceptable e indicador de un ADN lo suficientemente puro para su empleo en técnicas de Genética Molecular. Si esta ratio es considerablemente más baja puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben cerca de 280 nm.

#### 4.2.2. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se analizó un fragmento de 1.667 pares de bases (pb) de la región promotora del gen *PTGDR* en un total de 473 individuos, con el objetivo de determinar ocho polimorfismos ya descritos en la bibliografía dentro de esta región -1289 G>A (rs35595004), -1122 T>C (rs8019916), -881 C>T (rs33998702), -834 C>T (rs803011), -613 C>T (rs34236606), -549 T>C (rs8004654), -441 C>T (rs803010) y -197 T>C (rs11157907) (Figura 9). Todos los estudios de genotipado se realizaron desconociendo si la muestra procedía de un individuo del grupo control o de un paciente.



**Figura 9.** Esquema de la región promotora del *PTGDR*. Se representan los polimorfismos, el inicio transcripción y la localización de los cebadores para la amplificación de la región.

En las muestras de ADN genómico obtenidas a partir de sangre periférica se amplificó la región correspondiente al promotor del gen *PTGDR* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los oligonucleóticos específicos de las secuencias que flanquean esta región de interés.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L. En cada reacción se añadieron 12,5  $\mu$ L de *PCR-Master Mix* (Promega, Madison-WI, EE.UU.) (22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220  $\mu$ M dNTP, 22 U *Taq* DNA polimerasa); 8,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas; entre 50 y 100 ng de ADN genómico; 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleótido cebador o *primer* (sentido y antisentido). Como control negativo, en cada serie se empleó un tubo con todos los componentes de la reacción, menos el ADN genómico. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler* (Labnet Internacional Inc., Edison-NJ, EE.UU.).

Los oligonucleótidos cebadores utilizados en la reacción de PCR son: **PTGDR-I** como cebador sentido (*primer forward*) (5'-GGCATGAGGCCTAAAAATGAG-3') y **PTGDR-V** como cebador antisentido (*primer reverse*) (5'-GAAGAAGGCCGAAGGCTTGG-3'). Estos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del promotor del gen *PTGDR* depositada en la base de datos GenBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>) y se suministraron como un liofilizado. Fueron reconstituidos con agua destilada libre de nucleasas (Water PCR Grade, Roche), alicuotados y almacenados a una temperatura de -20 °C.

El programa de PCR utilizado para la amplificación de la región objeto de estudio se representa en la siguiente figura.



Figura 10. Esquema del programa de amplificación PCR.

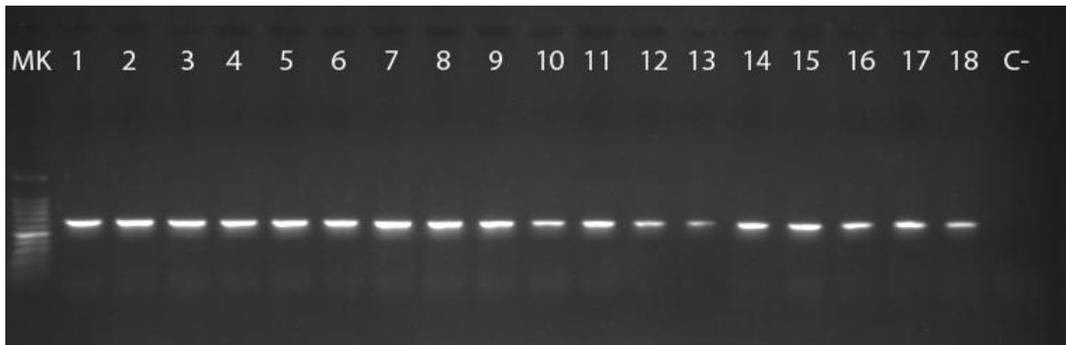
En el proceso se diferencian tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación. Primeramente tiene lugar la **desnaturalización del ADN**, es decir, se separan sus dos cadenas; esta fase se desarrolla a 94 °C. A continuación desciende la temperatura hasta los 62 °C para permitir que, por complementariedad, los cebadores se unan al ADN molde. Esta fase se denomina **hibridación** o **anillamiento**. La última fase, conocida como **elongación** o **extensión**, se lleva a cabo a 72 °C y en ella la Taq polimerasa (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la zona en que han hibridado los cebadores. Las tres fases descritas constituyen un ciclo de la PCR y permiten duplicar el número de copias del fragmento de ADN original. Este ciclo se repite 40 veces y el producto final es la cantidad inicial de ADN molde por  $2^n$ , siendo  $n$  el número de ciclos. Antes de dichos ciclos de PCR se produce una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C y todo el proceso se completa con una elongación final de 10 minutos a 72 °C (Figura 10).

### 4.2.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se aprovecha la característica de la carga negativa de los ácidos nucleicos para migrar hacia el polo positivo de un campo eléctrico para separarlos en función de su tamaño molecular. Mediante la electroforesis en gel de agarosa se separan los fragmentos de ADN. Se utilizan geles con un 1 % de agarosa, para lo cual se pesó un gramo de este polisacárido (Biotools MB Agarose, Biotools B&M Labs, Madrid) y se disolvió en 100 ml de Buffer TBE 0,5 x (Promega, Madison-WI, EE.UU.).

Esta mezcla se calentó en un horno microondas para disolver bien la agarosa. Tras comprobar que la disolución es óptima, se dejaba templar y se añadían al matraz 5  $\mu$ l de *RedSafe Nucleic Acid Staining Solution* (iNtRON Biotechnology, Corea). Este colorante se intercala en la doble hebra de ADN y permite visualizar los ácidos nucleicos a la luz ultravioleta. Se vertía la mezcla en la bandeja de electroforesis, se colocaba el peine para generar los pocillos y se dejaba solidificar. Una vez solidificado, se colocaba el gel en la cubeta de electroforesis, que, a su vez, previamente se había llenado con la solución Buffer TBE 0,5 x hasta cubrir el gel de agarosa. Posteriormente se retiraba el peine.

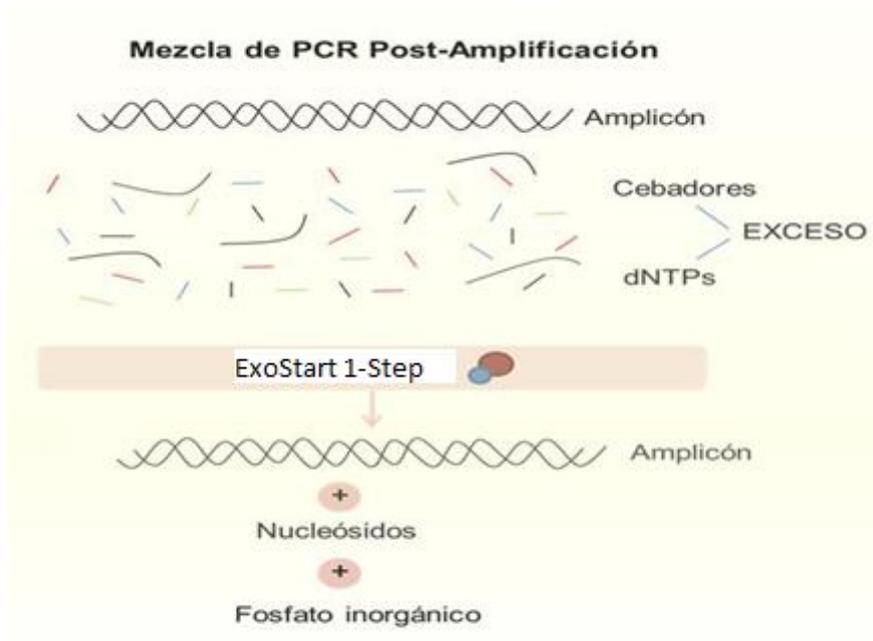
En cada pocillo se cargó 5  $\mu$ l de nuestras muestras amplificadas, previamente mezcladas con 1  $\mu$ l del tampón de carga *DNA Loading Buffer Red* (Bioline, Taunton-MA, EE.UU.), el cual, al llevar glicerol en su composición, proporciona a las muestras la densidad idónea para que se depositen en el fondo del pocillo. En uno o ambos extremos del gel se cargó como marcador de peso molecular 5  $\mu$ l del 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison-WI, EE.UU.), con la finalidad de contrastar el tamaño del producto de PCR. Se colocaba la tapa de la cubeta, se encendía la fuente y se aplicaba al gel de agarosa una corriente eléctrica de 180 voltios durante 20-30 minutos. Al finalizar se situaba el gel en un transiluminador de luz ultravioleta con el sistema fotográfico VisiDoc-It™ *Imaging System* (Uplant-CA, EE.UU.), para visualizar el producto de nuestra PCR (Figura 11).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados por PCR del promotor de *PTGDR*.

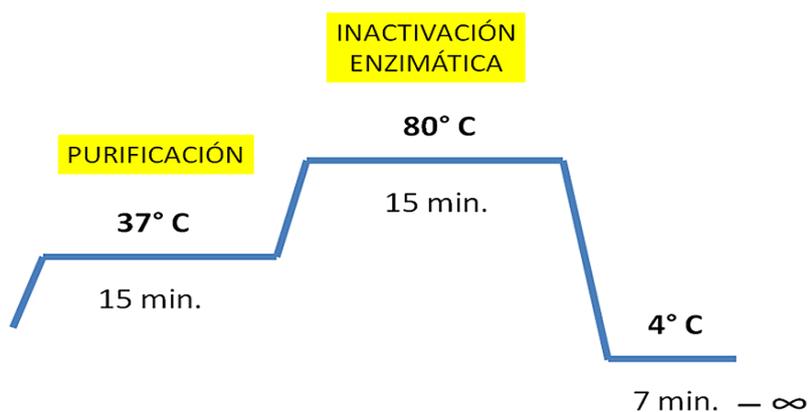
#### 4.2.4. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Tras la identificación del fragmento de ADN se procedió a su purificación. Se empleó ExoStart™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), compuesto por un tampón especial y enzimas hidrolíticas que actúan en la mezcla de PCR transformando los fragmentos de ADN de cadena sencilla sobrantes en fosfato libre y nucleósidos. Tras su actuación, las enzimas se inactivaron mediante calor (a 80 °C), obteniéndose así el fragmento de interés libre de interferencias para su secuenciación (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de la mezcla de la PCR identificada con ExoStart 1-Step.

Para este proceso se añadió 1  $\mu$ l de ExoStart 1-Step a 5  $\mu$ l del resultante de la PCR y se incubó en el termociclador de *MultiGene OptiMax*, según el esquema reflejado en la figura 13.

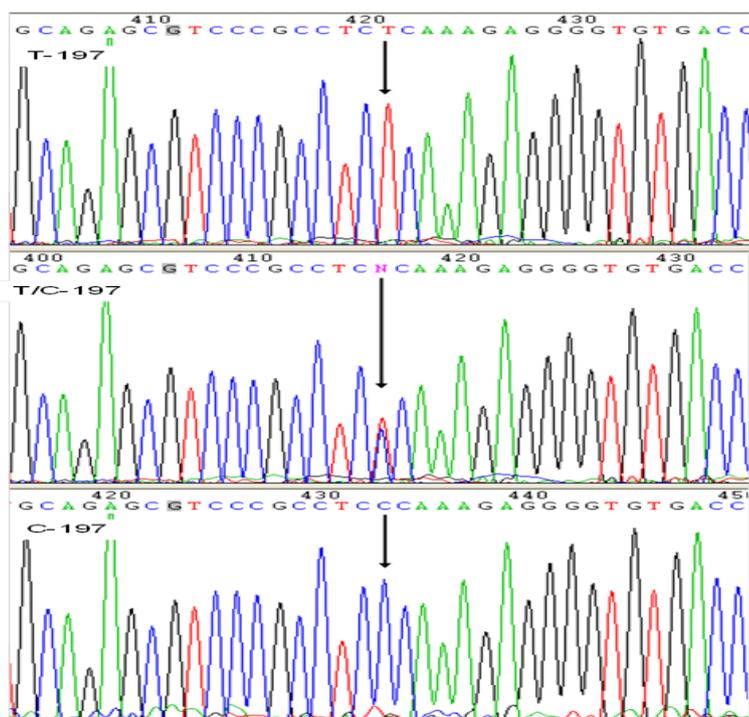


**Figura 13.** Esquema de purificación de PCR con ExoStart 1-Step.

Para la secuenciación se utilizaron 5 µl del ADN resultante de la purificación junto con 3 µl de uno de los dos cebadores (*forward* o *reverse*) en un tubo eppendorf que se había identificado con el código interno del laboratorio. Se enviaron al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca (USAL) indicando el nombre de la muestra a secuenciar y si llevaba incorporado cebador. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático capilar 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

#### 4.2.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

Mediante diferentes programas informáticos se han analizado las secuencias obtenidas. La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó mediante el programa Chromas LITE v.2.01 ([www.technelysium.com](http://www.technelysium.com), Technelysium Pty. Ltd, Tewantin, Australia) (ver Figura 14).



**Figura 14.** Cromatograma resultado de la secuenciación en el que se muestra la variabilidad del polimorfismo -197 T<C.

Para analizar la homología con la secuencia depositada en la base de datos GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> se utilizó el programa BLAST de los servidores del Instituto Europeo de Bioinformática ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) y del Grupo de Bioinformática y Genética de la Universidad de California Santa Cruz (USC Genome Bioinformatics, <https://genome.ucsc.edu/>).

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](http://www2.ebi.ac.uk/fasta3), [www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html](http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html) y <https://genome.ucsc.edu/>. El alineamiento de las secuencias de ADN se llevó a cabo mediante el programa AlingX (VectorNTI Advance 10, Invitrogen-CA, EE.UU.) (Figura 15).

```

1                                     100
Cons. (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
A (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
B (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
C (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
D (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
E (1) CCCGCCTCCCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
F (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
G (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
H (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
I (1) CCCGCCTCCCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
J (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAKCCGCGCGCG
K (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
L (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
M (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
N (1) CCCGCCTCTCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG
O (1) CCCGCCTCYCAAAGAGGGGTGTGA---GCTTTTCTGTGGCGCAGCTTCTCCGCCCGAGCCGCGCGCG

```

**Figura 15.** Ejemplo del alineamiento de las secuencias obtenidas mediante 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.

#### 4.2.6. ANALISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

##### 4.2.6.1. EXTRACCIÓN DEL ARN

Todas las muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa, fueron recogidas en tubos de vacío que llevaban EDTA como anticoagulante y se mezclaron con el conservante *RNAlater*<sup>®</sup> (Ambion Life Technologies<sup>™</sup>, Calsbad-CA, EE.UU.) para desactivar las ARNasas y conservar el ARN de la sangre a -20 °C en perfectas condiciones. Para su conservación se mezclaron 450 µl de sangre total con 1.300 µl de *RNAlater*. Antes de utilizar la muestra para la extracción del ARN, se dejó descongelar a temperatura ambiente. Tras ello, la muestra se centrifugó y se retiró el conservante antes de utilizar el *RiboPure*<sup>™</sup>-*Blood Kit* (Ambion Life Technologies, Calsbad-CA, EE.UU.). Este protocolo de aislamiento de ARN consiste en dos fases:

A. Lisis celular en una solución basada en guanidina y una purificación inicial de ARN por extracción de fenol/cloroformo (Figura 16).

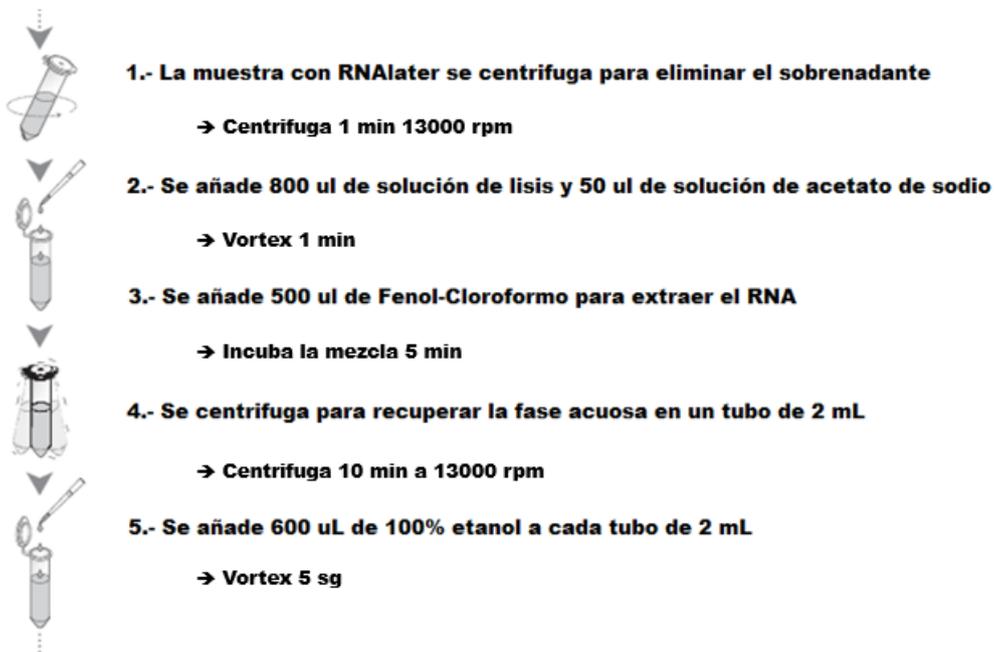


Figura 16. Procedimiento para lisar las células y purificar el ARN.

B. Purificación final de ARN mediante extracción en fase sólida en un filtro de fibra de vidrio (Figura 17).

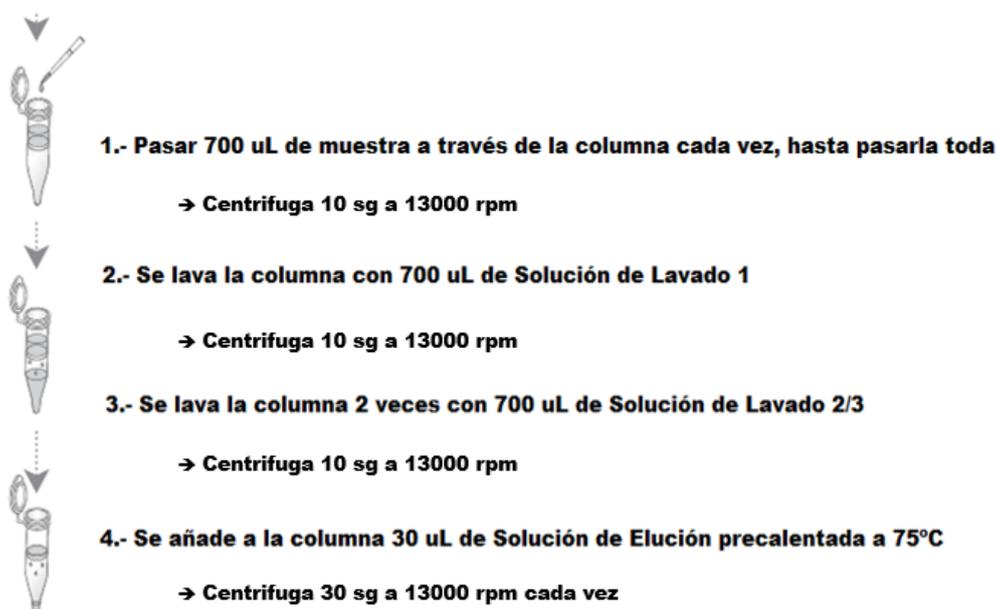


Figura 17. Purificación final del ARN y elución.

#### 4.2.6.2. TRATAMIENTO CON ADNasa

El kit *RiboPure<sup>TM</sup>-Blood* incluye un tratamiento con ADNasa I, para eliminar el ADN genómico del eluido de ARN. El tratamiento consiste en añadir un tampón 20 X y 1  $\mu$ L de ADNasa I (8U/ $\mu$ L) al mencionado eluido. La mezcla se incuba 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se añade un 20 % de volumen de reactivo de inactivación de ADNasa durante 2 minutos, se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto y se pasa el eluido libre de la resina del reactivo de inactivación a un nuevo tubo.

#### 4.2.6.3. CUANTIFICACIÓN DEL ARN

El ARN fue cuantificado mediante un *NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EE.UU.) a 260 nm. El ARN debe tener una ratio de 260-280 nm

entre 1,8-2,0, y su calidad se midió mediante el bioanalizador *2100 Bioanalyzer de Agilent* (Agilent Technologies, Santa Clara-CA, EE.UU.), que proporciona un análisis del *RNA Integrity Number (RIN)* (un ARN de buena calidad debe tener un RIN > 7).

#### 4.2.6.4. SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

La retrotranscripción (RT) se realizó con el sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen Life Technologies, Calsbad-CA, EE.UU.). Este sistema detecta los ARN que tienen un tamaño entre 100 pb a 12 kb y la cantidad del material de partida puede variar entre 1 pg y 5 µg de ARN total. Como indica el manual del sistema, la transcriptasa *SuperScript™ III* sintetiza ADNc a una temperatura de entre 42 y 55 °C, proporcionando un incremento de la especificidad. Para el estudio de expresión del gen *PTGDR* se emplearon 250 ng de ARN por cada muestra para la síntesis de ADNc.

#### 4.2.6.5. DISEÑO DE CEBADORES PARA qPCR.

Los cebadores se diseñaron mediante el programa informático Cebador3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/cebador3plus/cebador3plus.cgi>). Para que la amplificación funcione correctamente es necesario que los cebadores se unan específicamente a la secuencia problema; esta especificidad viene determinada por determinadas propiedades del cebador, como el contenido GC y la temperatura de fusión.

El amplicón del gen *PTGDR* que se procedió a amplificar tenía un tamaño de 82 nucleótidos y los oligonucleótidos cebadores empleados fueron el *primer forward* (o sentido) (5'-GGCATGAGGCCTAAAAATGAG-3') y el *primer reverse* (o antisentido) (5'-CCTTGACATCCTTAAATGCTCC-3'). Los cebadores elegidos no presentaban ningún polimorfismo conocido en su secuencia en el momento del diseño de los mismos, para evitar así una posible variación en la especificidad de unión de los cebadores en las

distintas muestras de ADNc. Asimismo, se realizó un estudio para comprobar la eficiencia de los mismos.

#### 4.2.6.6. REACCIÓN DE LA CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (qPCR)

Para evitar sesgos en el análisis, en cada experimento de qPCR se emplearon tanto muestras de controles como muestras de pacientes, controles negativos sin muestra y un calibrador. La mezcla de la reacción de cada pocillo fue la siguiente: 7,5  $\mu$ L de Master Mix *SYBR Green I* (2X) (Roche Applied Science, Indianapolis-IN, USA), 600 nM de cada cebador y 25 ng de ADNc. El volumen total de la reacción fue de 15  $\mu$ L.

A continuación se empleó un equipo *LightCycler® 480 System II* (Roche Applied Science, Indianapolis-IN, EE.UU.) para amplificar las secuencias. El protocolo utilizado para el uso del *SYBR Green* se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Programa de amplificación empleado para el análisis de expresión génica de *PTGDR* mediante PCR a tiempo real con *SYBR Green I*.

PROGRAMA	T <sup>a</sup> (°C)	TIEMPO	RAMPA (°C)/T <sup>a</sup>	
<b>Activación Taq polimerasa</b>	95	10 min	4,4 °C/s	
<b>Amplificación</b>				
Desnaturalización	95	10 s	4,4 °C/s	45 ciclos
Anillamiento	60	10 s	2,2 °C/s	
Polimerización	72	10 s	4,4 °C/s	
<b>Melting curve</b>	97		0,11 °C/s	
<b>Enfriamiento</b>	40	30 s	2,2 °C/s	

La curva de fusión permite salvar la inespecificidad del *SYBR Green I* y detectar los posibles dímeros de cebador o contaminación de la muestra por ADN genómico, que podrían provocar una sobreestimación de la cantidad real de ADNc o, lo que es lo mismo, del grado de expresión génica. El análisis de los datos se realizó mediante el método Livak [101].

#### 4.2.7. CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO

En todos los procedimientos analíticos de este estudio se han seguido las recomendaciones de la *European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)* [102]. Durante la fase preanalítica se garantizaron la identificación de las muestras, así como su correcto almacenamiento. Cada muestra llegó al laboratorio identificada mediante una etiqueta con un código de barras y acompañada de una hoja de recogida de datos con copia de dicho código. Posteriormente se adjudicó, tanto a la hoja de datos como a la muestra, un código de laboratorio alfanumérico que posteriormente será el utilizado en el resto del estudio. La información se almacenó en una base de datos guardada en un ordenador del Servicio de Inmunoalergia con acceso restringido. La hoja con los datos clínicos del paciente se archivó. Las muestras se alicuotaron en criotubos y se identificaron con el número de laboratorio, tanto en la tapa como en el tubo, y se almacenaron a -20 °C.

La extracción de ADN se realizó minimizando el riesgo de contaminación de las muestras. Se llevó a cabo en un laboratorio destinado exclusivamente a la extracción de ADN, y empleando en todo momento material estéril y puntas con filtro. La extracción automática permite minimizar las transferencias de tubo a tubo y el sistema de código de barras mantiene identificadas las muestras durante todo el proceso.

Con la finalidad de evitar posibles contaminaciones, la PCR se realizó en una cabina de flujo laminar esterilizada periódicamente con luz ultravioleta, y se utilizaron pipetas automáticas (empleadas en exclusiva para la PCR) y puntas de pipeta con filtro de un solo uso. Los estudios de laboratorio se realizaron desconociendo si la muestra procedía de un individuo del grupo control o de un paciente. En el ordenador del Servicio de Inmunoalergia, antes mencionado, se almacenaron todas las secuencias obtenidas.

### 4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este estudio se basa fundamentalmente en la recogida exhaustiva de una gran batería de datos; incluye el análisis de 102 variables en un grupo de 473 individuos y en conjunto se ha obtenido un total de 48.246 datos. Por ello, el empleo de un correcto y sistemático análisis estadístico ha resultado esencial.

#### 4.3.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para el análisis descriptivo de la población estudiada se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 20.0 (IBM, Chicago-IL, EE.UU.). Para describir las variables cuantitativas se han empleado como medidas de tendencia central la mediana o la media y como medidas de dispersión el rango intercuartílico y la desviación típica o desviación estándar. En las variables cuantitativas con distribución no normal, además de la mediana y el rango intercuartílico, se han calculado la media y la desviación estándar al ser valores más ampliamente utilizados en el ámbito clínico. En cuanto a las variables cualitativas, éstas se han descrito según su frecuencia.

#### 4.3.2. ESTUDIO BIVARIANTE

Para el análisis de las variables cualitativas se empleó la prueba de  $\chi^2$  (chi-cuadrado) y las pruebas exactas de Fisher y Montecarlo para  $10^4$  iteraciones.

Se estableció un nivel de significación a partir de  $p < 0,05$  y se expresó la Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95%.

Para el análisis combinado de variables cualitativas y cuantitativas se aplicó la ANOVA previa comparación de la homogeneidad de Varianzas o la prueba no paramétricas de Kruskal Wallis según la normalidad de la distribución de la muestra según la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Sobre el análisis estadístico se realizó un control de la posibilidad de incurrir en el error tipo I para lo cual se aplicó la prueba de Bonferroni y el análisis de la probabilidad de emitir un resultado positivo falso (FPRP) empleando el método descrito por Wacholder *et al.* [103]. Otro parámetro de control estadístico que se ha calculado es el poder estadístico de la asociación encontrada mediante el uso de una plataforma en línea <http://statpages.org/proppowr.html> [104].

Además, en todos aquellos casos en los que se encontró una asociación significativa, se llevó a cabo una regresión logística binaria utilizando el programa estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago-IL, EE.UU.), ajustando por las posibles variables de confusión con el objetivo de establecer la posible influencia de estas variables en la significación obtenida. Se estimó el riesgo de las diferencias significativas mediante el cálculo de la OR, con un intervalo de confianza al 95 %.

#### 4.3.2.1. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA

**POLIMORFISMOS.** Con la finalidad de estudiar las posibles diferencias existentes en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen *PTGDR* (-1289 G>A, -1122 T>C, -881 C>T, -834 C>T, -613 C>T, -549 T>C, -441 C>T y -197 T>C) entre los distintos grupos de pacientes y los controles, se ha utilizado la plataforma estadística *on-line* SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>), que compara las frecuencias mediante un test de contingencia de tipo Chi-cuadrado. Se determinó la situación de equilibrio poblacional también mediante una prueba  $\chi^2$  para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weimberg.

Cuando existían diferencias significativas entre pacientes y controles, de nuevo se comprobó la significación utilizando la regresión logística ajustando por edad y sexo, controlando además el poder estadísticos y la probabilidad de emitir un resultado positivo falso.

También se han comparado los mencionados polimorfismos del gen *PTGDR* con las variables cuantitativas del estudio, utilizando ANOVA o Kruskal-Wallis, determinando previamente, como ya se ha mencionado, qué distribución siguen mediante el test Kolmogorov-Smirnov.

**NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *PTGDR*.** Se han relacionado los niveles de expresión del gen *PTGDR* con las variables cuantitativas, empleando el coeficiente de correlación de Pearson, y con las cualitativas, utilizando en este caso ANOVA o Kruskal-Wallis (según la distribución de las variables).

### 4.3.3. ESTUDIO MULTIVARIANTE

Para realizar el análisis multivariante de la matriz de datos, se han empleado básicamente dos técnicas. Una técnica de reducción no lineal de la dimensionalidad, el análisis de correspondencias múltiples o HOMALS, y una técnica de clasificación, el análisis de *clusters* o análisis de conglomerados.

El análisis de correspondencias múltiples, también conocido como análisis de homogeneidad o HOMALS (acrónimo del inglés *HOMogeneity Analysis by means of Alternating Least Squares*; i. e. Análisis de Homogeneidad mediante Mínimos Cuadrados Alternados), es una técnica exploratoria de análisis multivariante no lineal que permite analizar la estructura dimensional de un conjunto de datos cuando el objetivo es investigar las interrelaciones entre un gran número de variables categóricas, particularmente entre todas las categorías simultáneamente. Es una generalización del análisis factorial de correspondencias que se usa para analizar tablas de contingencia bidimensionales [105].

Se trata de un procedimiento estadístico adecuado para datos cualitativos, cuyo objetivo es describir las relaciones entre variables nominales en un espacio de dimensión reducida, que contiene las categorías de las variables; así como, los individuos (objetos) con valores en dichas categorías [106]. Mediante esta técnica, los individuos pertenecientes a la misma categoría se representan cerca los unos de los otros, mientras que los individuos de categorías distintas se representan alejados unos de los otros. Cada objeto se encuentra lo más cerca posible de los puntos categoría para las categorías a las que pertenece dicho objeto. El análisis de correspondencias múltiples es una técnica que nos posibilita una interpretación gráfica de baja dimensionalidad con la menor pérdida posible de información.

Albert Gifi es el seudónimo con el que miembros del Departamento de Teoría de Datos de la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Leiden (Países Bajos) publicaron en 1990 el libro titulado *Nonlinear Multivariate Analysis* [107], publicación en la que se recogen y presentan los diversos procedimientos de escalamiento óptimo de datos que configuran el Sistema Gifi del análisis multivariante no lineal. El escalamiento óptimo tiene como idea asignar cuantificaciones numéricas a las categorías de cada variable. Esta cuantificación óptima se obtiene por el procedimiento iterativo de los mínimos cuadrados alternados y permite con posterioridad realizar análisis multivariantes.

El objetivo del HOMALS es conseguir cuantificaciones óptimas de las categorías de las variables, de manera que dichas categorías estén separadas entre las distintas dimensiones estudiadas tanto como sea posible y, además, dentro de cada dimensión los individuos estén lo más próximos unos de otros, con la finalidad de obtener una homogeneidad máxima.

El Sistema Gifi del análisis multivariante no lineal comprende una serie de técnicas exploratorias que son extensiones del análisis de componentes principales y de correlación canónica al caso de variables nominales o con niveles mixtos de medida. Dentro de este sistema, el análisis de homogeneidad se presenta como el modelo menos restrictivo, en el sentido de que trabaja solo con un grupo de variables y todas ellas son analizadas por su nivel de medida nominal [108].

El análisis de correspondencias múltiples es un procedimiento híbrido entre el análisis factorial y el análisis de correspondencias que permite reducir la dimensionalidad de la información cuando las variables son de tipo nominal. Del análisis factorial incorpora la reducción de la información recogida por muchas variables en una serie de factores, que en el HOMALS se denominan dimensiones y que permiten la representación gráfica de las relaciones de las variables; así como, el posicionamiento de los individuos en el plano factorial resultante. Del análisis de correspondencias asimila la posibilidad de trabajar con variables categóricas; si bien, es capaz de trabajar con más de dos

variables. El HOMALS es una generalización del análisis de correspondencias. Este análisis también se puede considerar como un análisis de componentes principales de datos escalados al nivel nominal múltiple.

El análisis de los datos se ha llevado a cabo utilizando el programa SPSS 22 (*Statistical Products and Service Solutions*, versión 22) (IBM, 2013), que implementa el análisis de correspondencias múltiples (así como otros procedimientos de escalamiento óptimo), gracias al trabajo desarrollado por los miembros del departamento de Teoría de Datos de la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Leiden, donde surgió el denominado Sistema Gifi. Con dicho programa también se han realizado los análisis *cluster*.

El análisis de *clusters*, o análisis de conglomerados, es una técnica de análisis exploratorio de datos que sirve para obtener sistemas de clasificación [109]. Su objetivo consiste en ordenar objetos (pacientes, cosas, variables) en grupos denominados conglomerados o *clusters*, lo que se lleva a cabo de modo que el grado de asociación-similitud entre miembros del mismo *cluster* sea más fuerte que el grado de asociación-similitud entre miembros de diferentes *clusters*. Este procedimiento estadístico permite descubrir estructuras en los datos que no suelen ser evidentes a priori y contribuir, así, a la definición formal de un fenotipo para un conjunto de objetos dados.

Se han utilizado fundamentalmente métodos de clasificación jerárquicos, que producen clasificaciones con un número creciente de clases anidadas y utilizan una representación gráfica para presentar sus resultados, el dendrograma, que tiene forma de árbol y resume el proceso de agrupación en el análisis.

Los distintos métodos o algoritmos de agrupación dependen del método para calcular la distancia entre *clusters*. Es necesario resaltar que los distintos métodos para el cálculo de las distancias entre *clusters* producen distintas clasificaciones, por lo que no

existe una clasificación correcta única. Para la realización de este análisis se ha utilizado el método de Ward, o método de varianza mínima.



# 5. RESULTADOS

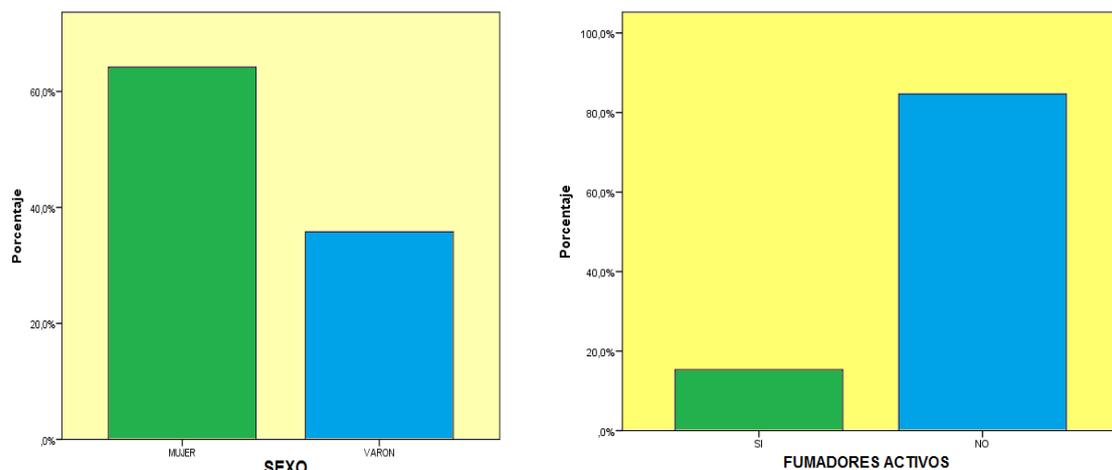


## 5.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO UNIVARIANTE

### 5.1.1. CONTROLES

En este estudio, el grupo control ha estado constituido por 176 individuos caracterizados como tales tras la anamnesis, exploración clínica y pruebas complementarias por los facultativos del Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Ninguno presentaba rinitis, asma o enfermedades respiratorias, ni antecedentes familiares de asma, rinitis o atopia, ni pruebas cutáneas para aeroalérgenos positivas, ni valores de IgE sérica total superiores a 120 kU/L.

En el grupo control predominaron las mujeres (64,2 %) frente a los varones. La mediana de la edad fue de 53 años (R.I. 30,75) y la mayoría de ellos fueron no fumadores (84,7 %) (Figura 18).



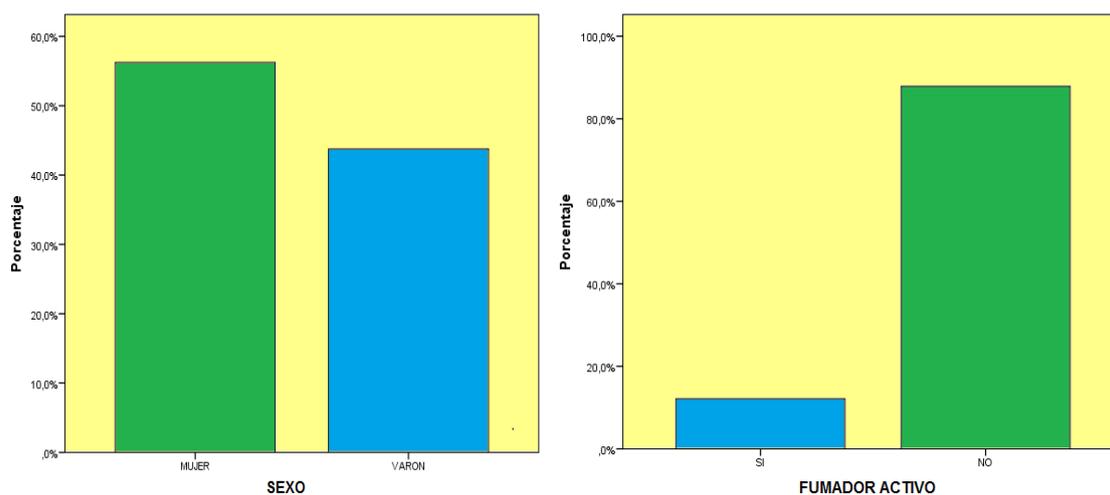
**Figura 18.** Distribución de los porcentajes por sexo y condición de fumador activo en la población control.

La mediana de los niveles de IgE total en suero fue de 26,4 kU/L; R.I. 35,2 (media 37,3 kU/L; DE 30,5) y de los eosinófilos totales en sangre periférica de 137/ $\mu$ l; R.I. 125,5 (media 159/ $\mu$ l; DE 109,6).

### 5.1.2. PACIENTES CON PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS

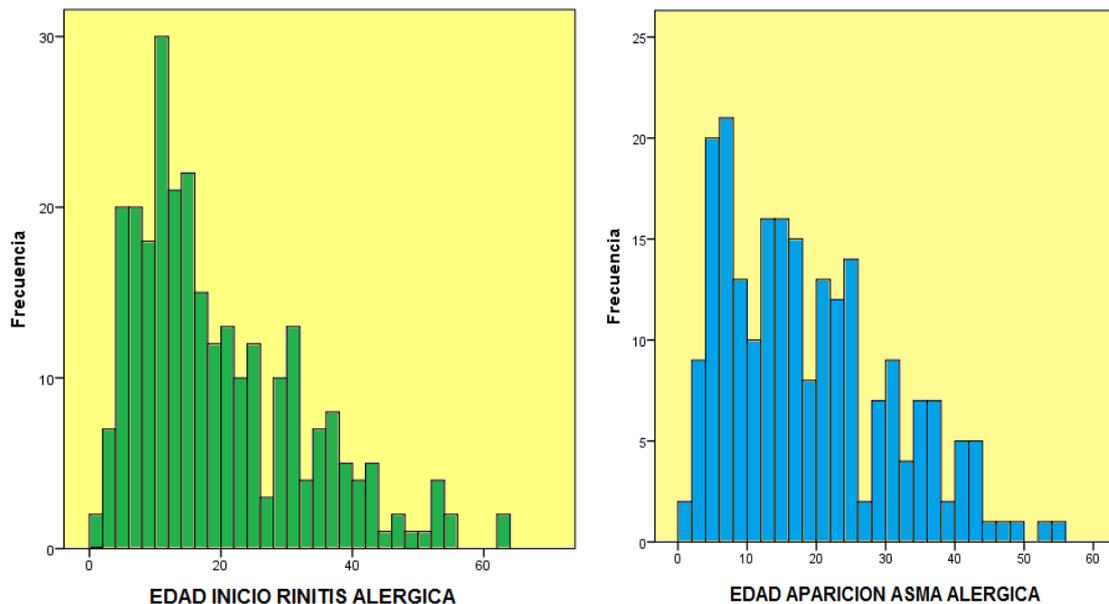
En este estudio se han incluido un total de 297 pacientes, mayores de 14 años, diagnosticados de asma y/o rinitis según los criterios de la GEMA 2009 [89] para el asma y los de ARIA para la rinitis [16]. De ellos, 214 presentan asma y rinitis alérgicas, 12 solo presentan asma alérgica y 71 solo rinitis alérgica.

Observamos un predominio del sexo femenino (56,2 %), si bien la diferencia no fue tan marcada como en el grupo control, y solo hubo un 12,1 % de fumadores activos (Figura 19).



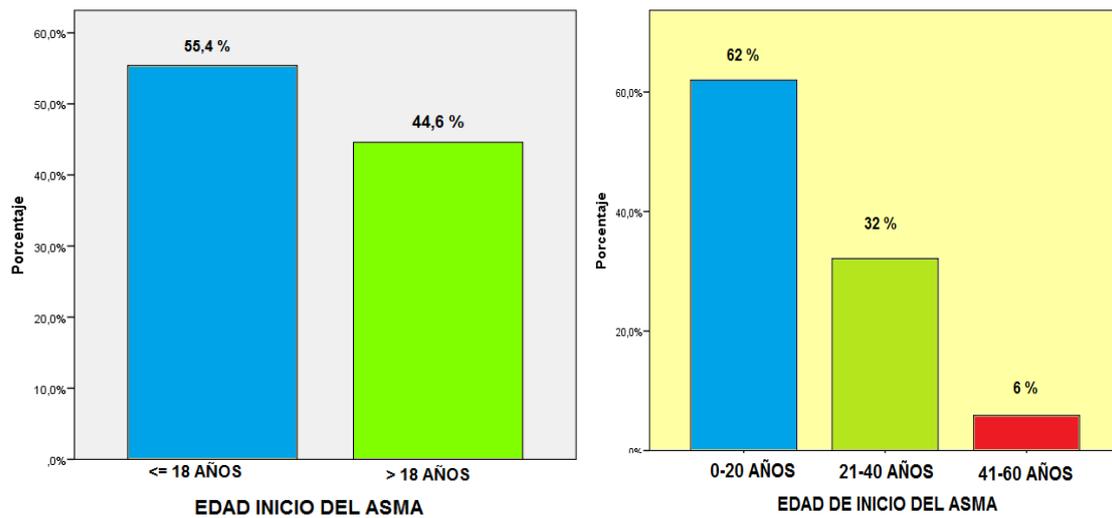
**Figura 19.** Distribución de los porcentajes de sexo y fumadores activos en los pacientes.

La mediana de edad de los pacientes fue de 29 años (R.I. 18), de la edad de aparición de rinitis alérgica 15 años (R.I. 18) y del inicio del asma alérgica de 16 años (R.I. 16,25) (Figura 20).



**Figura 20.** Distribución de las frecuencias de la edad de aparición de la rinitis y del asma alérgicas.

Si categorizamos la edad de aparición del asma alérgica entre mayores y menores de 18 años, el 55,4 % de los mismos habían presentado sintomatología asmática antes de esa edad y el 44,6 % restante con posterioridad. En el caso de categorizar la edad de aparición del asma en: 0-20 años, 21-40 años, 41-60 años y > 61 años; el 62 % de los asmáticos habían iniciado la clínica asmática antes de los 20 años, el 32 % entre los 21 y los 40 años, el 6 % entre los 41 y los 60 años y en ninguno de los pacientes la sintomatología asmática había debutado después de los 61 años (Figura 21).



**Figura 21.** Distribución de los porcentajes de edad de inicio del asma.

La mediana de los niveles de IgE total en suero fue de 185 kU/L; R.I. 386,6 (media  $366,6 \pm 485,4$  kU/L) y de los eosinófilos totales en sangre periférica de 215,5/ $\mu$ l; R.I. 229,5 (media  $277,9 \pm 227,8$ / $\mu$ l).

En cuanto a los antecedentes personales, cabe destacar que el 42,9 % presentaba pruebas cutáneas positivas en la infancia, el 32,5 % fue diagnosticado de asma en la infancia y un 4,4 % refería presencia de dermatitis atópica en la infancia; hemos considerado en este estudio que la infancia abarca hasta los 14 años.

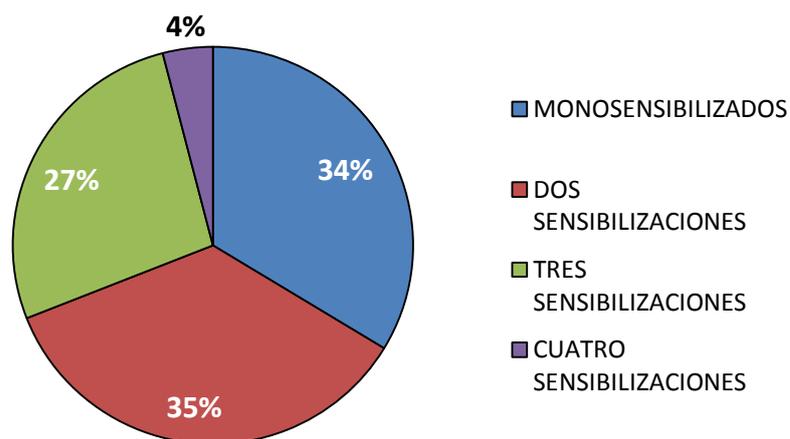
Entre los pacientes, solo 9 presentaron de forma concomitante poliposis nasal y tres de ellos habían precisado cirugía endoscópica nasosinusal o polipsectomía nasal. En relación con los antecedentes familiares, un 36,7 % refería antecedentes familiares de primer grado de atopia, pero solamente el 7,8 % refería que el antecedente de atopia fuera de la madre; el 21,1 % refería antecedentes familiares de asma alérgica (en el 5,1 % se trataba de la madre) y antecedentes familiares de rinitis alérgica el 22,8 %.

Los porcentajes de pruebas cutáneas positivas por grupos de alérgenos en los pacientes se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Distribución de porcentajes de pruebas cutáneas positivas por grupos de aeroalérgenos frente a la batería de aeroalérgenos empleada.

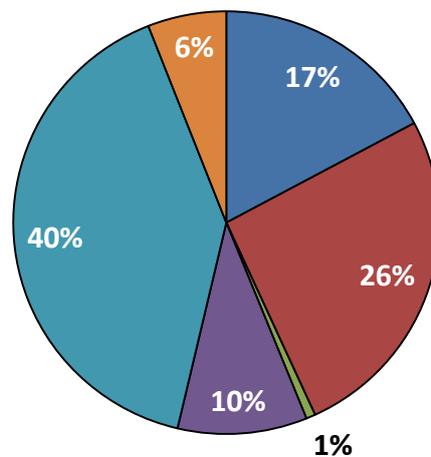
PRUEBAS INTRAEPIDÉRMICAS	ÁCAROS	PÓLENES	EPITELIOS	HONGOS
POSITIVAS	70,7	78,8	42,8	9,1
NEGATIVAS	29,3	21,2	57,2	90,9

Si consideramos en nuestra población alérgica la sensibilización a los distintos grupos de alérgenos (pólenes, ácaros, epitelios y hongos), encontramos la siguiente distribución de porcentajes: sensibilizados a un solo grupo (monosensibilizados) un 34 %, dos sensibilizaciones un 35 %, tres sensibilizaciones un 27 %, y cuatro sensibilizaciones únicamente un 4 % (Figura 22). En el grupo de monosensibilizados no encontramos sensibilizados a epitelios ni a hongos.



**Figura 22.** Distribución de los porcentajes de sensibilizaciones.

En relación con la rinitis, su clasificación según la gravedad se muestra en la siguiente figura (Figura 23).



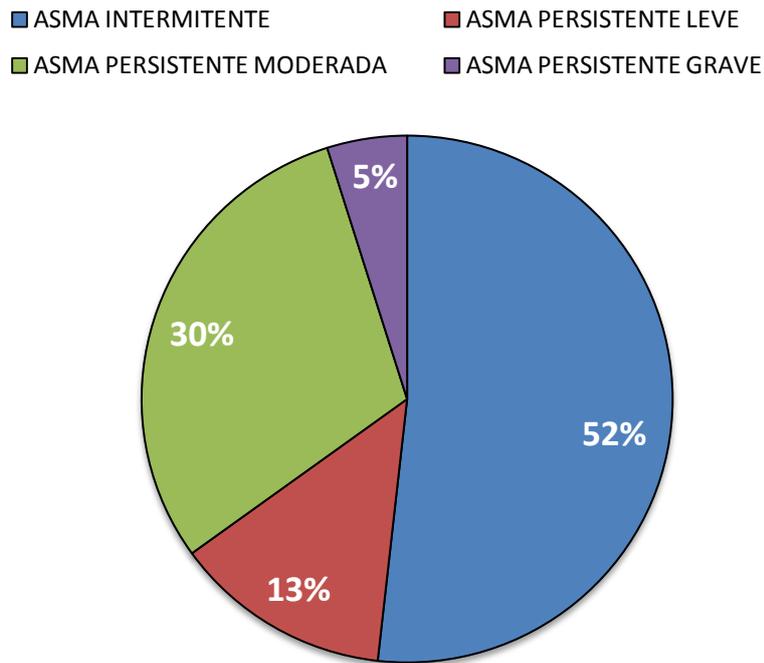
**Figura 23.** Clasificación de la rinitis alérgica en los pacientes con esta patología.

Recibían o habían recibido tratamiento con inmunoterapia en los últimos cinco años el 29,3 % de los pacientes alérgicos, la mayoría con ácaros (55,2 %) o pólenes (39,1 %).

### 5.1.3. PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

En el grupo de pacientes con asma alérgica también predominaron las mujeres (57,5 %), siendo la mediana de la edad fue de 28 años (R.I. 18). La mediana de los niveles de IgE total en suero fue de 198 kU/L; R.I. 412,2 (media  $398,4 \pm 524,5$  kU/L) y de los eosinófilos totales en sangre periférica de 230/ $\mu$ l; R.I. 247,5 (media  $298,9 \pm 243,9$ / $\mu$ l).

La media del índice de masa corporal (IMC) de los pacientes diagnosticados de asma alérgica fue de  $24,67 \pm 4,70 \text{ kg/m}^2$ . Respecto a la clasificación de la gravedad del asma se obtuvieron los resultados representados en la figura 24.



**Figura 24.** Clasificación de la gravedad del asma en nuestros asmáticos.

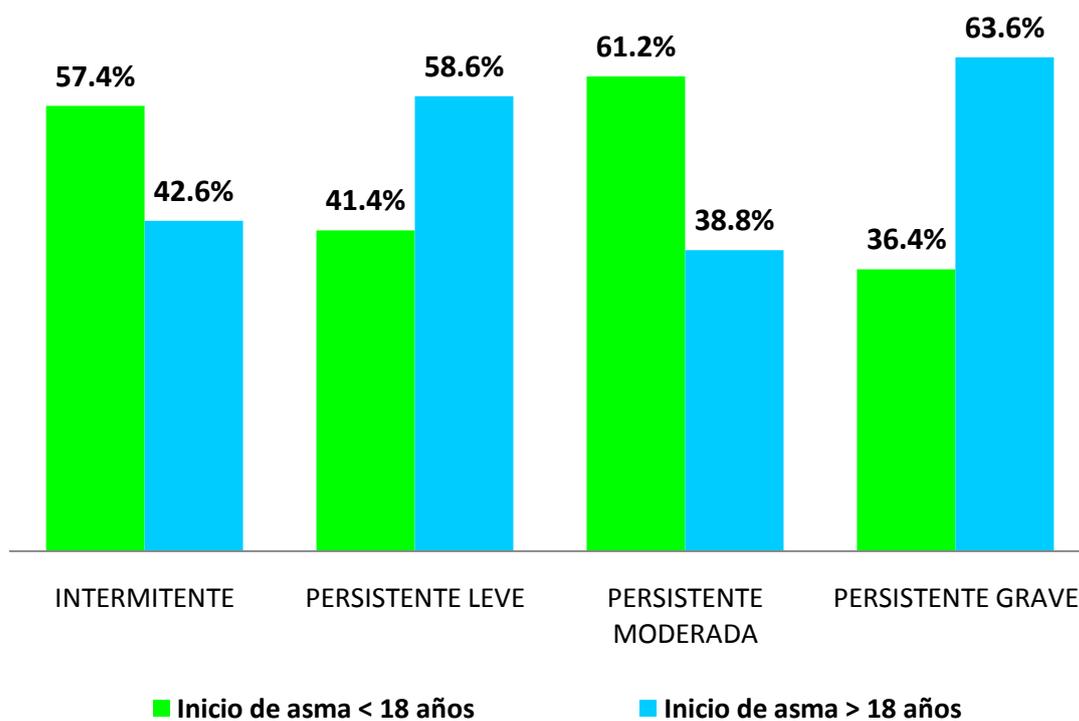
Los valores espirométricos de los pacientes asmáticos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 8).

**Tabla 8.** Medias y desviaciones típicas de los valores espirométricos de los pacientes con asma alérgica.

	FVC %	FEV1 %	FEV1/FVC	FEF25-75 %
<b>MEDIA ± DE</b>	92,7 ± 12,4	89,9 ± 13,7	79,6 ± 8,8	78,47 ± 26,5

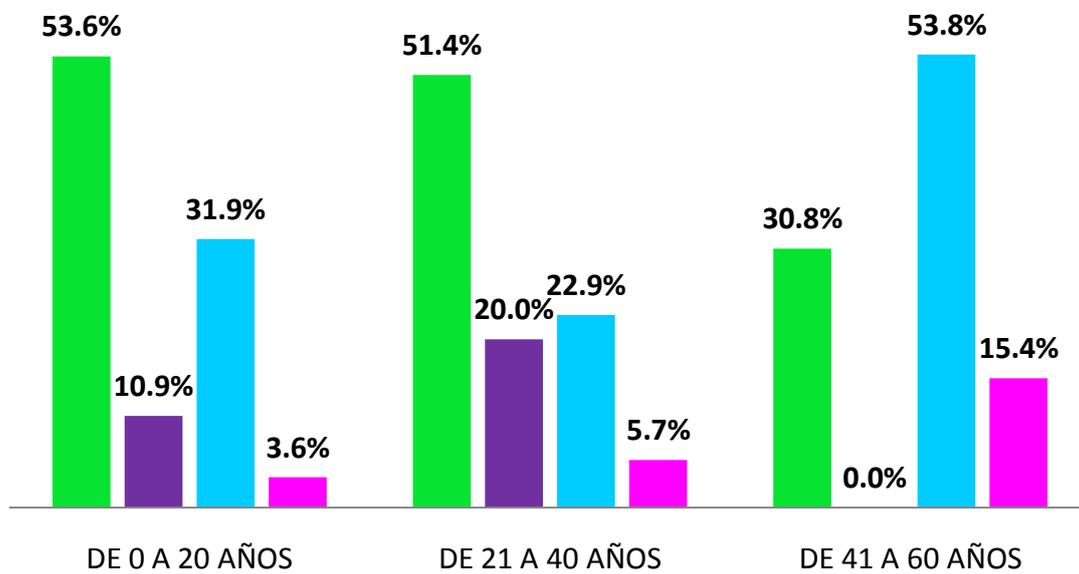
En lo relativo a la fracción de óxido nítrico exhalado ( $FE_{NO}$ ), la población con asma presentaba una mediana de 34 ppb; R.I. 43,5 (media  $49,29 \pm 45,28$  ppb).

La agrupación de la gravedad del asma en relación con la edad de inicio de la sintomatología asmática, según las categorizaciones previamente descritas, se muestra en las figuras 25 y 26. Merece destacar un predominio de edad de comienzo mayor de 40 años en los grupos de asma persistente moderada y grave.



**Figura 25.** Porcentajes de distribución de la gravedad del asma entre menores y mayores de 18 años.

■ INTERMITENTE ■ PERSISTENTE LEVE ■ PERSISTENTE MODERADA ■ PERSISTENTE GRAVE



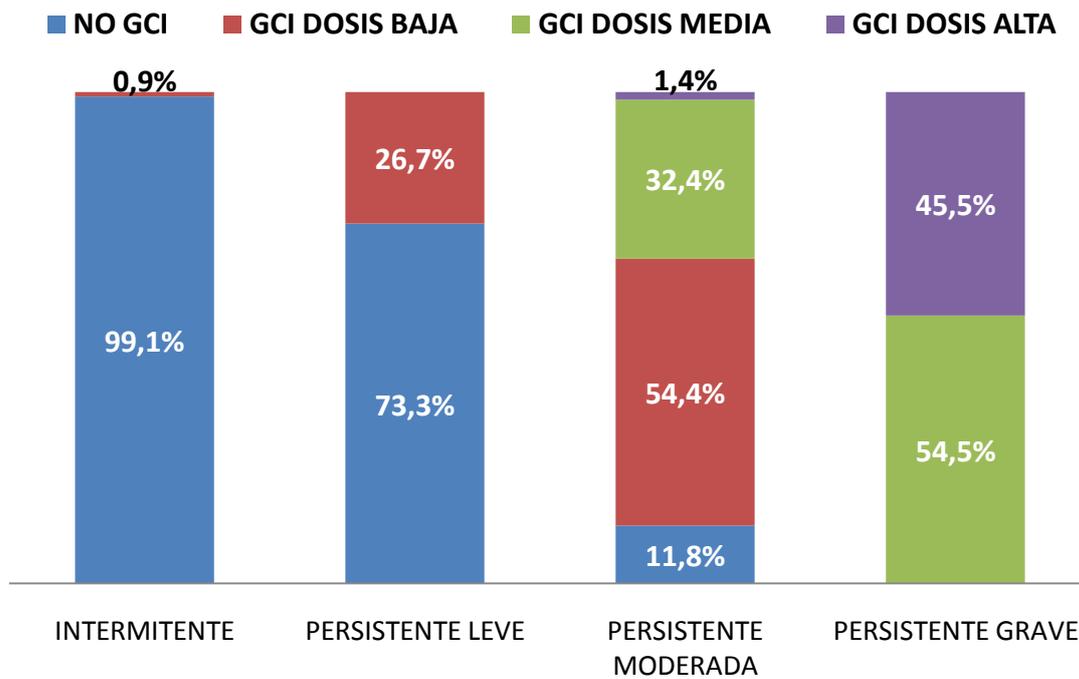
**Figura 26.** Porcentajes de distribución de la gravedad del asma según categorización de edad.

La clasificación de la gravedad según el tratamiento que recibían los pacientes se refleja en la siguiente tabla; los escalones terapéuticos se establecieron según los criterios de la GEMA 2009 [89], posteriormente actualizados en la GEMA 4.0 [7]. El mayor porcentaje de pacientes correspondió al escalón 1 (Tabla 9).

**Tabla 9.** Porcentajes de los escalones terapéuticos de tratamiento.

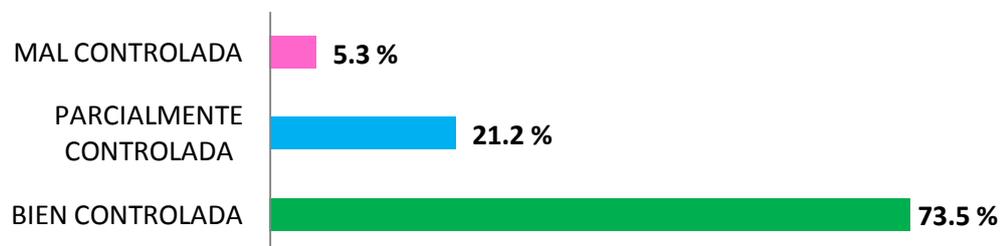
	Porcentaje
ESCALÓN 1	64,4
ESCALÓN 2	1,8
ESCALÓN 3	18,7
ESCALÓN 4	12,4
ESCALÓN 5	1,8
ESCALÓN 6	0,9

Relacionando la gravedad del asma con la dosis de glucocorticoides inhalados (GCI) obtuvimos la distribución que se muestra en la figura 27.



**Figura 27.** Relación entre grado de asma y la dosis de GCI.

En lo referente al control de los pacientes asmáticos, un 73,5 % presentan buen control de sus síntomas, mientras que solo el 5,3 % refirieron mal control (Figura 28).



**Figura 28.** Control del asma en nuestra población asmática (en porcentaje).

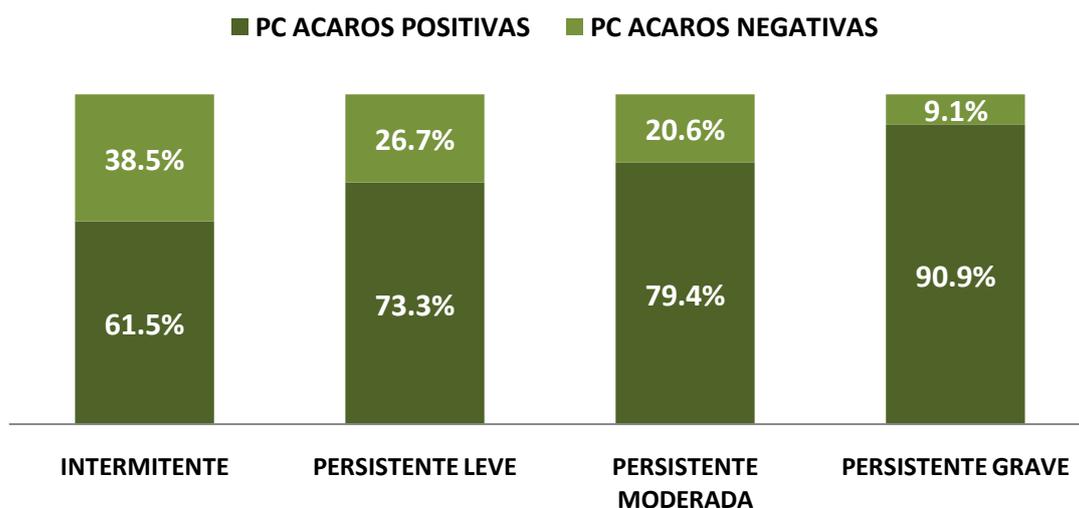
Cabe destacar que, de los 226 pacientes diagnosticados de asma alérgica solo siete habían precisado acudir al Servicio de Urgencias por reagudización de su patología en el último año, y que en tres de los casos fue necesario su ingreso en el hospital.

## 5.2. ESTUDIO BIVARIANTE

### 5.2.1. VARIABLES CLÍNICAS

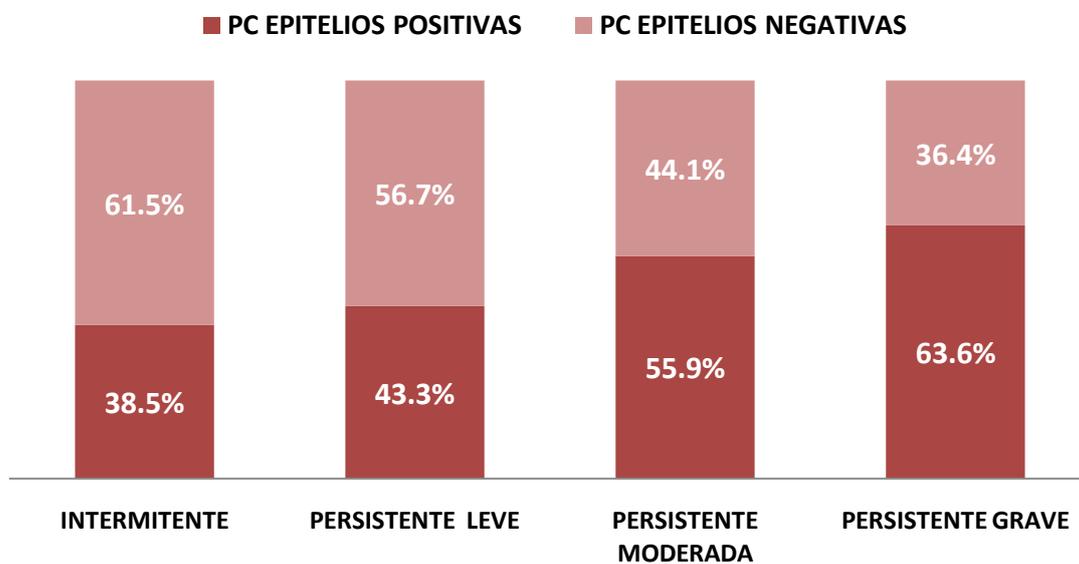
En el análisis de las variables de función pulmonar, como era de esperar, se observó una correlación positiva entre FVC y FEV1 ( $r=0,768$ ;  $p<0,001$ ); así como, entre FEV1 y FEF25-75 directa ( $r=0,738$ ;  $p=0,001$ ) y entre FEV1/FVC y FEF25-75 ( $r=0,716$ ;  $p<0,001$ ). Hemos identificado, además, cierta correlación entre FE<sub>NO</sub> y el número total de eosinófilos en sangre periférica ( $r=0,384$ ;  $p<0,001$ ).

En los pacientes con asma alérgica identificamos una asociación entre la gravedad de asma y la sensibilización a los ácaros ( $p=0,03$ ) (Figura 29).



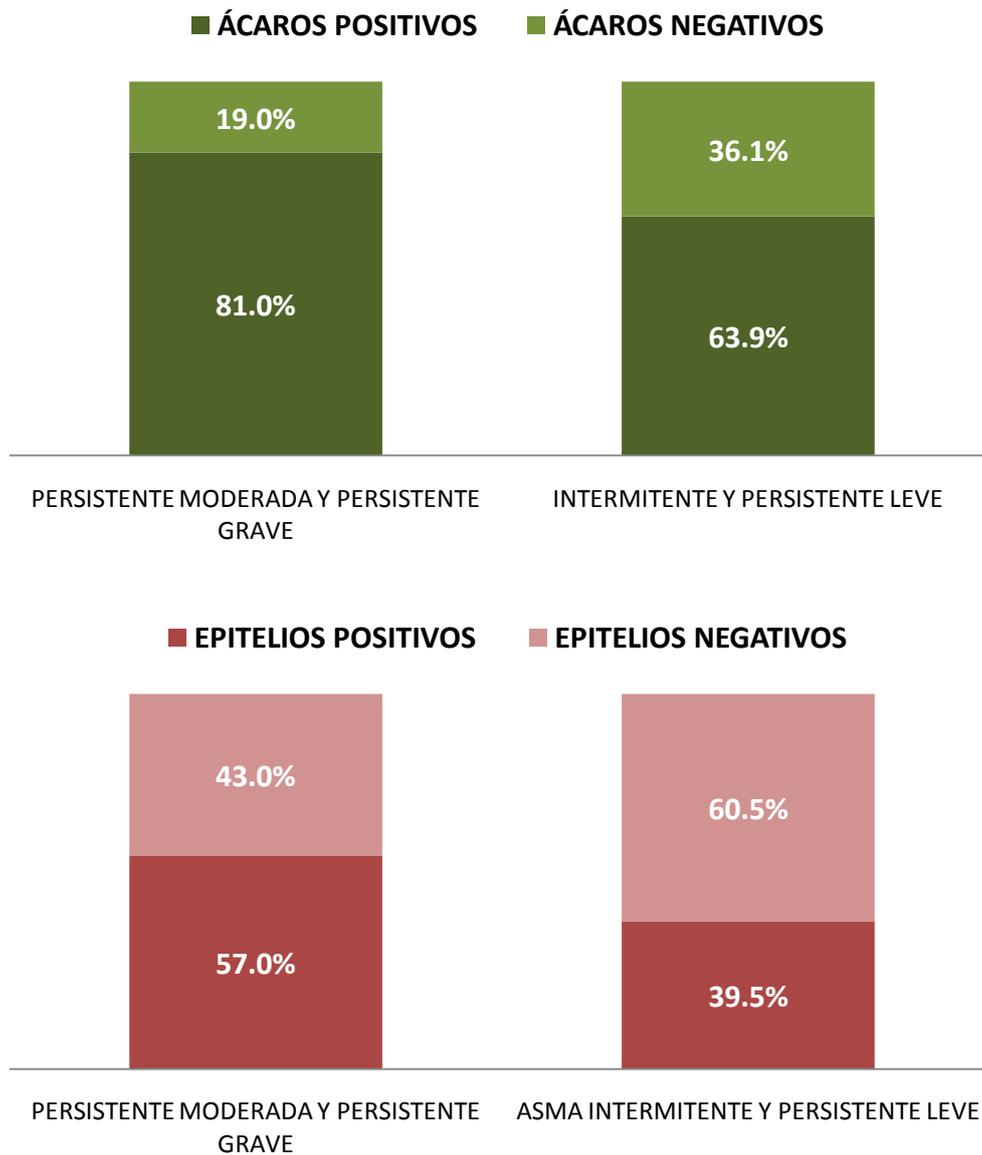
**Figura 29.** Relación entre sensibilización a ácaros y gravedad del asma.

En este mismo grupo también hemos observado una mayor proporción de sensibilización a los epitelios en los estadios más graves de asma; si bien, no se alcanza significación estadística (Figura 30).



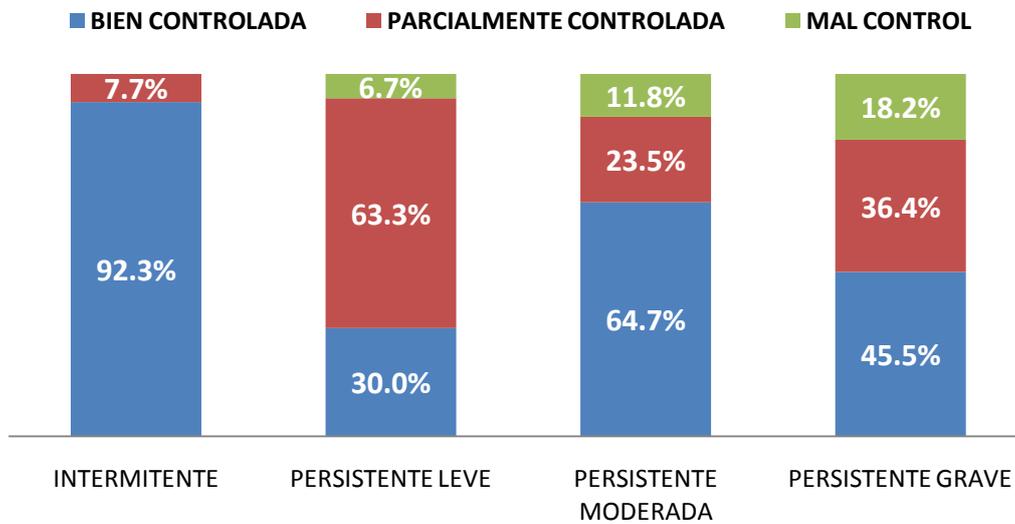
**Figura 30.** Relación entre sensibilización a epitelios y gravedad del asma.

Esta asociación se confirmó al agrupar el asma intermitente con la persistente leve y la persistente moderada con la grave (Figura 31).



**Figura 31.** Relación entre la sensibilización a ácaros y epitelios y la agrupación de la gravedad del asma.

Asimismo, hemos identificado también, como era de esperar, una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre el control del asma y la gravedad: el asma intermitente estaba controlada en un 92 % frente a un 45 % del asma grave (Figura 32). Dicha asociación se confirmó al agrupar el asma intermitente con la persistente leve y la persistente moderada con la grave.



**Figura 32.** Porcentajes de control del asma según la gravedad.

En cuanto a la sensibilización, observamos que los pacientes con asma intermitente y persistente leve presentaban mayores porcentajes de monosensibilización ( $p=0,029$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Distribución del número de sensibilizaciones según la gravedad de asma.

	MONO SENSIBILIZADOS	DOS SENSIBILIZACIONES	TRES SENSIBILIZACIONES	CUATRO SENSIBILIZACIONES
ASMA INTERMITENTE Y PERSISTENTE LEVE	76,8%	65,1%	52,4%	62,5%
PERSISTENTE MODERADA Y GRAVE	23,2%	34,9%	47,6%	37,5%

La agrupación de asma intermitente y persistente leve frente a persistente moderada y grave confirmó las asociaciones que se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Asociaciones estadísticas entre variables clínicas y grados de asma.

	<b>ASMA INTERMITENTE-PERSISTENTE LEVE frente a ASMA PERSISTENTE MODERADA-GRAVE</b>
<b>PC ÁCAROS POSITIVAS</b>	<b>p=0,009</b>
<b>PC EPITELIOS POSITIVAS</b>	<b>p=0,017</b>
<b>MONO-POLISENSIBILIZADOS</b>	<b>p=0,029</b>
<b>CONTROL ASMA</b>	<b>p&lt;0,001</b>

Además hemos detectado que el asma persistente grave se relacionaba con un IMC más elevado; así como, con los valores espirométricos más bajos (Tabla 12).

**Tabla 12:** Medias y desviaciones típicas del IMC y los valores espirométricos en relación con el grado de asma.

	<b>IMC</b>		<b>FVC</b>		<b>FEV1</b>		<b>FEV1/FVC</b>		<b>FEF25-75</b>	
<b>INTERMITENTE</b>	24,04	4,32	92,82	11,48	92,44	12,88	82,53	6,873	86,2	25,904
<b>PERSISTENTE LEVE</b>	24,32	2,9	97,24	10,63	93,6	13,18	78,64	7,714	79,8	26,793
<b>PERSISTENTE MODERADA</b>	25,21	5,09	92,29	12,381	87,36	12,03	78,06	9,415	71,49	23,763
<b>PERSISTENTE GRAVE</b>	<b>27,87</b>	<b>7,53</b>	<b>82,25</b>	<b>18,872</b>	<b>73,47</b>	<b>18,87</b>	<b>65,8</b>	<b>6,805</b>	<b>49,85</b>	<b>16,838</b>
	MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE	

En la siguiente tabla (Tabla 13) se muestran los valores de  $p$  para las asociaciones estadísticamente significativas entre la gravedad de asma y los valores espirométricos.

**Tabla 13.** Relaciones entre valores espirométricos y gravedad del asma. N.S. = no significativo.

	ASMA INTERMITENTE FRENTE A PERSISTENTE MODERADA	ASMA INTERMITENTE FRENTE A PERSISTENTE GRAVE	ASMA PERSISTENTE LEVE FRENTE A PERSISTENTE GRAVE	ASMA PERSISTENTE MODERADA FRENTE A PERSISTENTE GRAVE
FEV1	N.S.	p=0,045	p=0,035	N.S.
FEV1/FVC	p=0,003	p<0,001	p<0,001	p<0,001
FEF25-75	p=0,002	p<0,001	p=0,005	N.S.

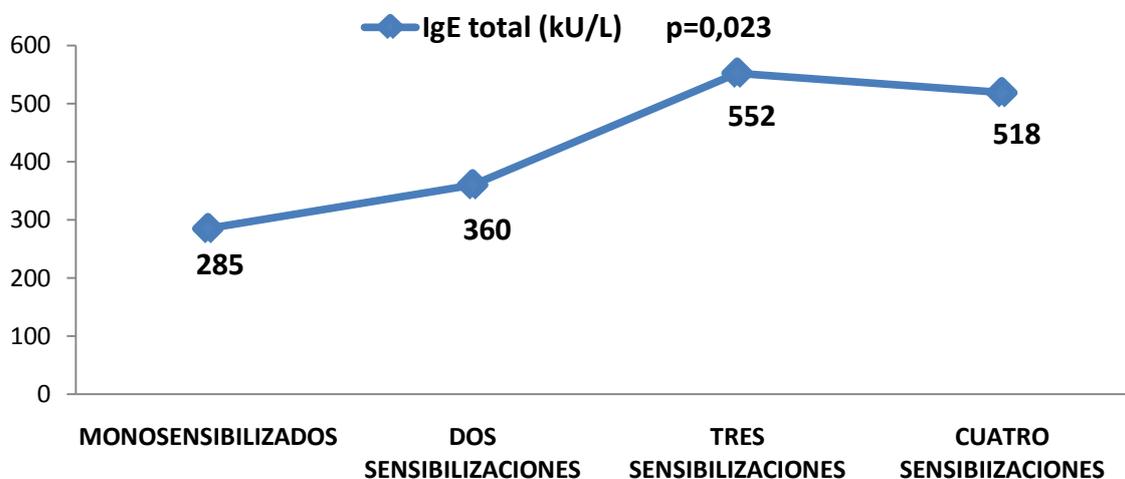
Además, los datos espirométricos también se asociaron con el grado de control del asma, con unos valores mucho más desfavorables, como era de esperar, en el caso de los pacientes mal controlados (Tabla 14).

**Tabla 14.** Grado de control de asma y valores espirométricos.

GRADO DE CONTROL	IMC		FVC		FEV1		FEV1/FVC		FEF25-75	
BIEN CONTROLADA	24,63	4,80	92,68	13,03	90,39*	13,93	80,16	9,56	80,08•	26,42
PARCIALMENTE CONTROLADA	25,12	4,55	94,14	10,24	91,18#	11,61	78,98	6,04	78,47	26,39
MAL CONTROLADA	23,41	4,05	87,25	11,93	78,95*#	15,41	75,17	6,76	58,75•	21,48
	MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE		MEDIA ± DE	

\*p=0,016; #p=0,017; •p=0,022

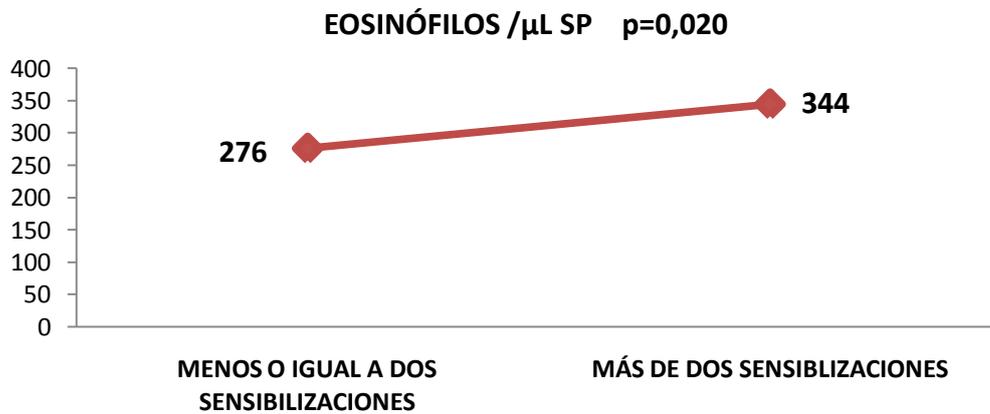
En lo que respecta al grado de sensibilización, se encontró una relación estadísticamente significativa ( $p=0,023$ ) con los valores de IgE total, que aumentan al elevarse el número de sensibilizaciones –aunque se igualaba mucho entre tres y cuatro sensibilizaciones– (Figura 33).



**Figura 33.** Relación entre valores de IgE total y mono-polisensibilizaciones.

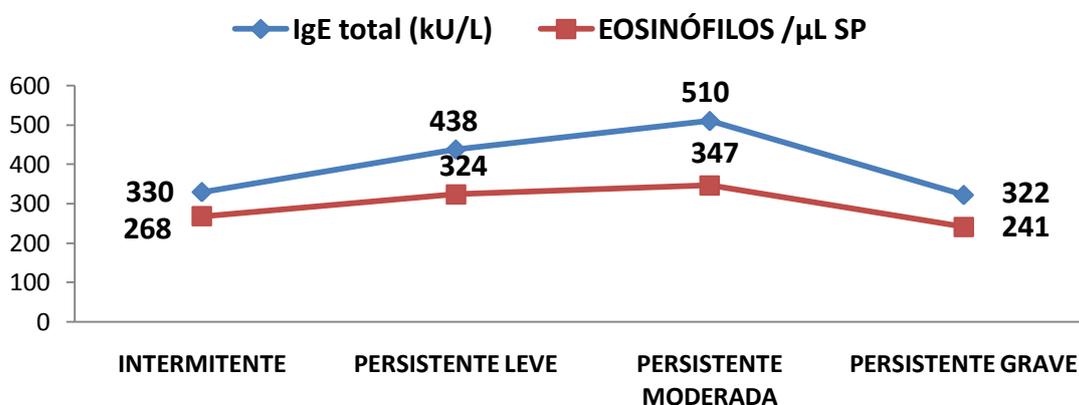
También se encontraron unos niveles más elevados de IgE en los pacientes con antecedentes familiares tanto de asma ( $p=0,042$ ) como de atopia ( $p=0,027$ ).

Respecto al recuento de eosinófilos, se observó un incremento de los niveles de eosinófilos en los pacientes que presentan sensibilización a más de dos grupos de alérgenos respecto a los sensibilizados a uno o dos grupos ( $p=0,020$ ) (Figura 34).



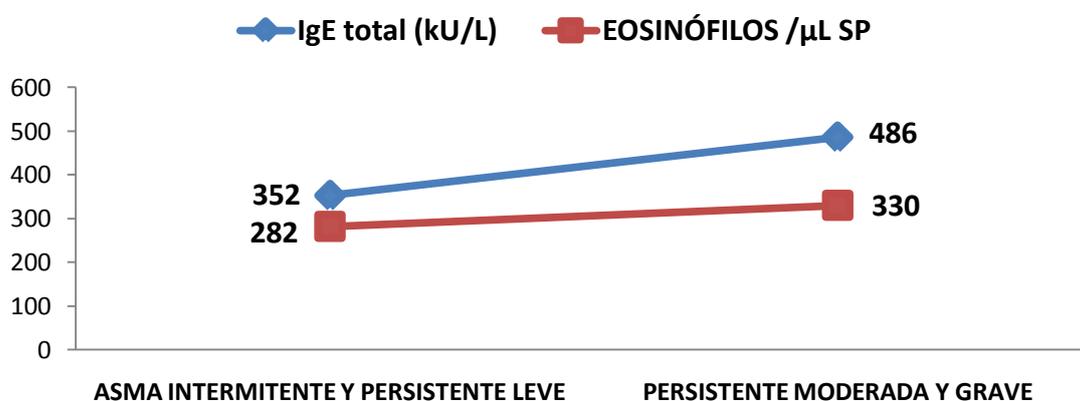
**Figura 34.** Relación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y el número de grupos de alérgenos a los que están sensibilizados los pacientes.

Al relacionar la gravedad del asma con el recuento de eosinófilos en sangre periférica, así como con los niveles de IgE total en suero, se observó un incremento de los valores medios, tanto del número de eosinófilos como de los niveles de IgE total, con la mayor gravedad del asma excepto en el caso del asma persistente grave (Figura 35), pero que no se correspondieron con significación estadística.



**Figura 35.** Relación entre eosinófilos en sangre periférica y niveles de IgE total con grados de asma.

Al agrupar la gravedad del asma en intermitente y persistente leve frente a persistente moderada y persistente grave, no se alcanzó significación con los niveles de IgE pero prácticamente se acercó a la significación en el caso de los recuentos de eosinófilos en sangre periférica (Figura 36).



**Figura 36.** Relación entre niveles de IgE sérica total y recuento de eosinófilos en sangre periférica y gravedad del asma en dos categorías.

## 5.2.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA

### 5.2.2.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE *PTGDR*

Como tendencia general, se observó que los niveles de expresión génica de *PTGDR* fueron significativamente superiores en los pacientes atópicos ( $p < 0,001$ ), tanto alérgicos a los ácaros ( $p = 0,003$ ), como a los pólenes ( $p = 0,001$ ) y a epitelios ( $p = 0,001$ ). Del mismo modo, los niveles de expresión en los pacientes con asma alérgica ( $p = 0,001$ ), asma intermitente ( $p = 0,004$ ) y asma persistente moderada ( $p = 0,001$ ) fueron superiores a los de los controles. Sin embargo, al igual que los niveles de IgE y el recuento de eosinófilos, los niveles de *PTGDR* presentaron una gran heterogeneidad en el grupo de asma persistente grave y, por lo tanto, no se encontró una asociación estadísticamente significativa.

Entre los pacientes diagnosticados de rinitis alérgica ( $p < 0,001$ ), rinitis intermitente leve ( $p = 0,039$ ), rinitis intermitente moderada ( $p < 0,001$ ) y rinitis persistente moderada ( $p = 0,001$ ) y el grupo control, también se observaron diferencias estadísticamente significativas, pero, nuevamente, no así en los pacientes con rinitis persistente grave. Y por último, también fueron significativamente superiores en los pacientes con antecedentes familiares de primer grado de atopia ( $p = 0,015$ ) y de asma ( $p = 0,018$ ) y el grupo control (Tabla 15).

**Tabla 15.** Asociación entre los niveles de expresión de *PTGDR* y distintas variables clínicas.

	MEDIANA	RANGO INTERCUARTÍLICO
<b>CONTROLES</b>	0,61	0,57
PRUEBAS CUTÁNEAS (PC) POSITIVAS	0,83	0,62
PC POSITIVAS ÁCAROS	0,81	0,64
PC POSITIVAS POLENES	0,82	0,60
PC POSITIVAS EPITELIOS	0,81	0,55
ASMA	0,81	0,61
ASMA INTERMITENTE	0,80	0,55
ASMA PERSISTENTE MODERADA	0,85	0,56
RINITIS	0,83	0,61
RINITIS INTERMITENTE LEVE	0,68	0,53
RINITIS INTERMITENTE MODERADA	0,91	0,64
RINITIS PERSISTENTE MODERADA	0,88	0,62
AF DE ATOPIA	0,75	0,49
AF DE ASMA	0,75	0,64

#### 5.2.2.2. ANÁLISIS DE SNP

En el análisis de los polimorfismos del gen *PTGDR* se identificó una asociación entre el polimorfismo -1289 G>A y la gravedad de asma, de forma que el genotipo homocigoto mutado AA resultó muy poco frecuente en asma intermitente aumentando su frecuencia a medida que aumentaba la gravedad de asma ( $p = 0,038$ ; poder estadístico

con un nivel  $\alpha$  0,05; PE=79,1). Del mismo modo, el genotipo AA fue más frecuente en los pacientes con asma persistente moderada y grave (0,12) que en los diagnosticados de asma intermitente y persistente leve (0,02) ( $p=0,011$ ; PE=83,8) (Tablas 16 y 17).

**Tabla 16.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289 G>A y su relación con la gravedad del asma. Entre paréntesis se indican los niveles de expresión de *PTGDR*.

SNP <i>PTGDR</i>	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
	CONTROLES	ASMA INTERMITENTE	ASMA PERSISTENTE LEVE	ASMA PERSISTENTE MODERADA	ASMA PERSISTENTE GRAVE
-1289 G>A	GG: 0,50 (0,7502) GA: 0,40 (0,6715) AA: 0,10 (0,4687)	GG: 0,58 (0,9477) AG: 0,40 (0,8557) <b>AA: 0,02*</b> (0,4516)	GG: 0,50 (1,1311) AG: 0,46 (0,5800) AA: 0,04 (0,0490)	GG: 0,49 (0,9251) AG: 0,40 (1,0795) AA: 0,11 (0,9373)	GG: 0,27 (1,0210) AG: 0,55 (0,7407) AA: 0,18 (1,4473)

\* $p=0,038$

**Tabla 17.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -1289 G>A y la gravedad del asma agrupando intermitente con persistente leve y persistente moderada con grave. Entre paréntesis se indican los niveles de expresión de *PTGDR*.

SNP <i>PTGDR</i>	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	
	ASMA INTERMITENTE Y PERSISTENTE LEVE	ASMA PERSISTENTE MODERADA Y GRAVE
-1289 G>A	GG: 0,56 (0,9894) AG: 0,42 (0,7730) <b>AA: 0,02•</b> (0,3174)	GG: 0,46 (0,9293) AG: 0,42 (1,0059) AA: 0,12 (1,0648)

• $p=0,011$

El estudio de las pruebas funcionales también confirmó estos resultados, ya que los pacientes portadores del genotipo AA presentaron unos valores de FEV1/FVC significativamente menores que los portadores del genotipo GG ( $p=0,032$ ; media  $73,37 \pm 8,41$  frente a  $80,32 \pm 8,68$ ). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las asociaciones de la distribución de frecuencias genotípicas no se confirmaron mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo.

En relación al polimorfismo -549 T>C, el genotipo homocigoto mutado CC fue más frecuente en los pacientes con asma persistente grave (0,73) que en los controles (0,30) ( $p=0,009$ ; PE=85,3). Estos resultados se confirmaron mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo;  $p=0,008$ ; OR: 5,594; IC 95 %: 1,58-19,80; PE=85,3 %: FPRP para una probabilidad a priori 0,25 = 4,4 %. Además, el genotipo mutado CC presentó unos niveles más elevados de expresión en el asma grave que en el resto de grupos (Tabla 18). Estos resultados se confirmaron al agrupar la gravedad de asma en intermitente y persistente leve frente a persistente moderada y persistente grave, tanto el aumento de la expresión de *PTGDR* como de la frecuencia del genotipo mutado  $p=0,022$ . Esta asociación también se confirmó tras la aplicación de la regresión logística, ajustando por edad y sexo,  $p=0,013$ ; OR: 0,568; IC 95 %: 0,364-0,886), si bien el poder estadístico en esta confirmación descendió a 60,5 (Tabla 19).

**Tabla 18.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -549 T>C y su relación con la gravedad del asma. Entre paréntesis se indican los niveles de expresión de *PTGDR*.

		FRECUENCIAS GENOTÍPICAS			
SNP <i>PTGDR</i>	CONTROLES	ASMA INTERMITENTE	ASMA PERSISTENTE LEVE	ASMA PERSISTENTE MODERADA	ASMA PERSISTENTE GRAVE
-549 T>C	TT: 0,23 (0,5529) CT: 0,47 (0,8689) CC: 0,30 (0,5349)	TT: 0,20 (0,8738) CT: 0,60 (0,9829) CC: 0,20 (0,6992)	TT: 0,27 (1,070) CT: 0,40 (0,9541) CC: 0,33 (0,5138)	TT: 0,12 (1,3959) CT: 0,57 (0,9843) CC: 0,31 (0,8010)	TT: 0,00 (---) CT: 0,27 (0,8802) <b>CC: 0,73</b> (0,8802)

● $p=0,009$

**Tabla19.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo -549 T>C y la gravedad del asma agrupando intermitente con persistente leve y persistente moderada con grave. Entre paréntesis se indican los niveles de expresión de *PTGDR*.

	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	
SNP <i>PTGDR</i>	ASMA INTERMITENTE Y PERSISTENTE LEVE	ASMA PERSISTENTE MODERADA Y GRAVE
-549 T>C	TT: 0,21 (0,9255) CT: 0,56 (0,9770) <b>CC: 0,23*</b> (0,6309)	TT: 0,10 (1,3959) CT: 0,53 (0,9766) CC: 0,37 (0,8249)

\*p-FISHER=0,03

El estudio de las pruebas funcionales respiratorias también confirmó esta asociación, de forma que los pacientes portadores del genotipo homocigoto mutado CC presentaron unos valores de FEV1/FVC significativamente inferiores en los pacientes portadores del genotipo CC ( $p=0,021$ ) frente a los portadores del alelo T (media  $77,16 \pm 7,57$  frente a  $80,96 \pm 9,44$ ).

Finalmente, con relación al SNP -197 T>C encontramos una asociación estadísticamente significativa con las características de la sensibilización, de forma que el genotipo heterocigoto CT fue más frecuente en los pacientes monosensibilizados a los ácaros (0,29) que en los monosensibilizados a los pólenes (0,08)  $p=0,007$  (PE=78; OR: 0,212; IC 95 %: 0,064-0,702). Esta menor frecuencia en los monosensibilizados a pólenes se confirmó mediante regresión ajustada ( $p=0,015$ ; OR: 0,225; IC 95 %: 0,068-0,750).

Este predominio del genotipo heterocigoto en monosensibilización a ácaros se observó también en el conjunto de pacientes con rinitis (0,32) frente a los controles (0,16) ( $p=0,045$ ;  $PE=65,4$ ). La regresión logística ajustada de nuevo confirmó la asociación ( $p=0,021$ ;  $OR: 2,455$ ;  $IC\ 95\ \%: 1,143-5,275$ ).

Por último, hemos detectado que el recuento de eosinófilos en sangre periférica fue significativamente muy superior ( $p=0,007$ ) en los pacientes con asma alérgica portadores del genotipo homocigoto mutado CC frente a los no portadores del alelo mutado (frente a los que presentan el genotipo heterocigoto TT) ( $664,25 \pm 105,11$  frente a  $292,60 \pm 238,04$ ).

### 5.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS DATOS

#### 5.3.1. ANÁLISIS GLOBAL TODOS LOS INDIVIDUOS DEL ESTUDIO

En una fase inicial del estudio se procedió al análisis global de los 473 individuos de la base de datos. Esta primera solución exploratoria multivariante nos permitió identificar las variables con celdas vacías, la presencia de variables con inexistente variabilidad en la práctica (casi todos los individuos presentaban los mismos valores y/o categorías en ellas); así como, la información redundante de algunas variables (la misma información consignada en valor absoluto en una variable, y como porcentaje e otra, por ejemplo) para proceder a realizar la primera depuración de dicha base de datos en aras de un análisis más adecuado.

Se analizó entonces la matriz de datos optimizada mediante la técnica del análisis de correspondencias múltiples en una solución en 2 dimensiones, Tabla 20. Dicho análisis recoge un 73 % de la variabilidad total de los datos (“inercia”, Tabla 20), que es un valor muy alto dado el elevado número de variables consignadas en el mismo.

**Tabla 20.** Resumen del modelo del análisis HOMALS para toda la muestra.

	Varianza contabilizada para	
Dimensión	Total (autovalor)	Inercia
1	17,69	0,52
2	7,16	0,21
Total	24,85	0,73

Se observan los valores propios (autovalores) de cada una de las dimensiones de la solución propuesta, que reflejan la varianza explicada por cada dimensión, 52 % en la Dimensión 1 y 21 % en la Dimensión 2 (los autovalores mayores indican dimensiones de mayor importancia en la solución global).

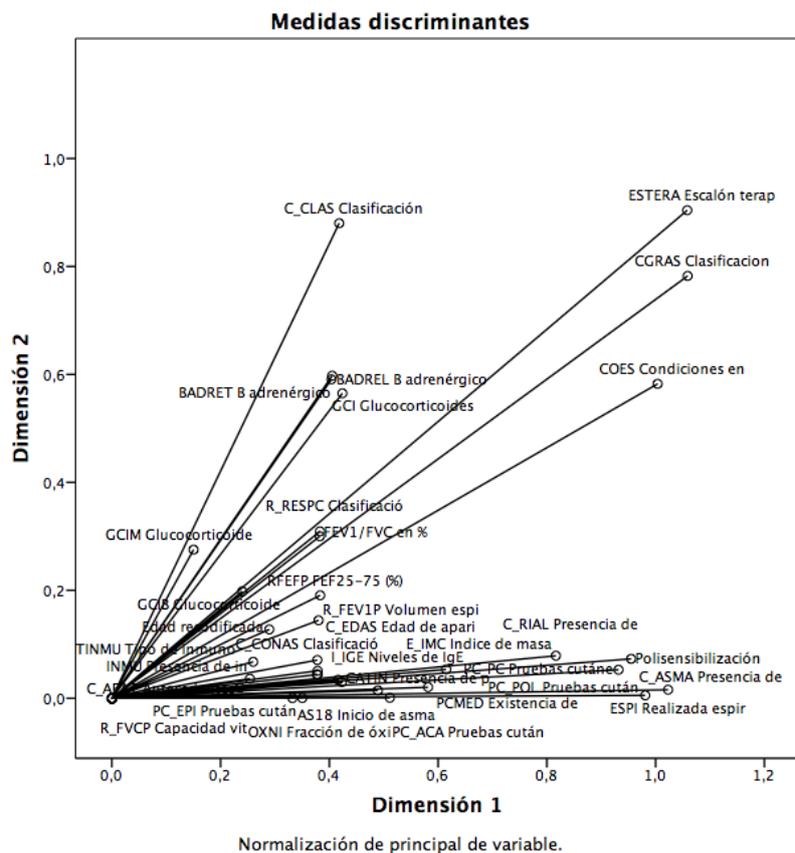
La solución en 3 dimensiones, aunque suponía un incremento de varios puntos porcentuales en la varianza explicada en dicha solución, y por ende mayor bondad de ajuste, no se ha desarrollado en este estudio porque no servía a los efectos de esclarecer relaciones entre variables caracterizadoras de los pacientes; ni servía tampoco en la caracterización de los individuos, y por el contrario, era claramente contraria al principio de parsimonia pues dificultaba la interpretación de la solución.

Las medidas de discriminación se presentan en la Tabla 21, ordenadas de mayor a menor. Las medidas de discriminación de cada variable representan la varianza de las variables en relación a cada dimensión, de modo que cuánto mayor valor tenga habrá mayor discriminación entre las categorías de una variable y una mayor cercanía de los sujetos al centroide de su categoría en dicha dimensión.

**Tabla 21.** Medidas de discriminación del análisis para los 473 individuos analizados.

	Dimensión	
	1	2
CGRAS Clasificación del asma según GEMA 2009	1,059	,783
ESTERA Escalón terapéutico del tratamiento de mantenimiento del asma	1,058	,904
ASMA Presencia de asma	1,023	,016
COES Condiciones en la realización de la espirometría	1,004	,583
ESPI Realizada espirometría	,981	,006
POLI Polisensibilización	,955	,073
PC Pruebas cutáneas	,932	,053
RIAL Presencia de rinitis alérgica	,817	,079
POLI Pruebas cutáneas para pólenes	,615	,054
PCMED Existencia de alergia a medicamentos	,582	,021
ACA Pruebas cutáneas para ácaros	,511	,001
AS18 Inicio de asma con 18 años	,489	,014
GCI Glucocorticoides inhalados	,424	,565
IGE Niveles de IgE total (KU/l)	,423	,030
CLAS Clasificación de la gravedad del asma cuando está en el tratamiento	,418	,880
CATIN Presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia	,416	,034
BADRET B adrenérgicos de acción de larga duración	,405	,598
BADREL B adrenérgicos de acción de larga duración	,404	,591
RFEF (FEF25-75 (%))	,383	,191
FEV1/FVC (n %)	,383	,309
RESPC Clasificación según espirometría	,383	,300
FEV1P Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (%)	,380	,144
CONAS Clasificación del control del asma en el adulto	,378	,044
EDAS Edad de aparición del asma	,378	,051
IMC Índice de masa corporal	,378	,071
FVCP Capacidad vital forzada (%)	,377	,044
OXNI Fracción de óxido nítrico exhalado realizado	,350	,000
EPI Pruebas cutáneas para epitelios de animales	,332	,000
EDAD Recodificada	,290	,128
TINMU Tipo de inmunoterapia	,260	,068
INMU Presencia de inmunoterapia	,254	,036
GCI B Glucocorticoides inhalados dosis baja	,240	,198
AFAT Antecedentes familiares de 1er grado de PCA alérgicos positivos	,236	,020
GCI M Glucocorticoides inhalados dosis media	,150	,275

La representación gráfica de dichas medidas de discriminación en el plano factorial solución suele simplificar la interpretación de las relaciones variables/dimensiones, tal y como se aprecia en la siguiente figura (Figura 37).



**Figura 37.** Medidas de discriminación representadas en el plano factorial 1-2.

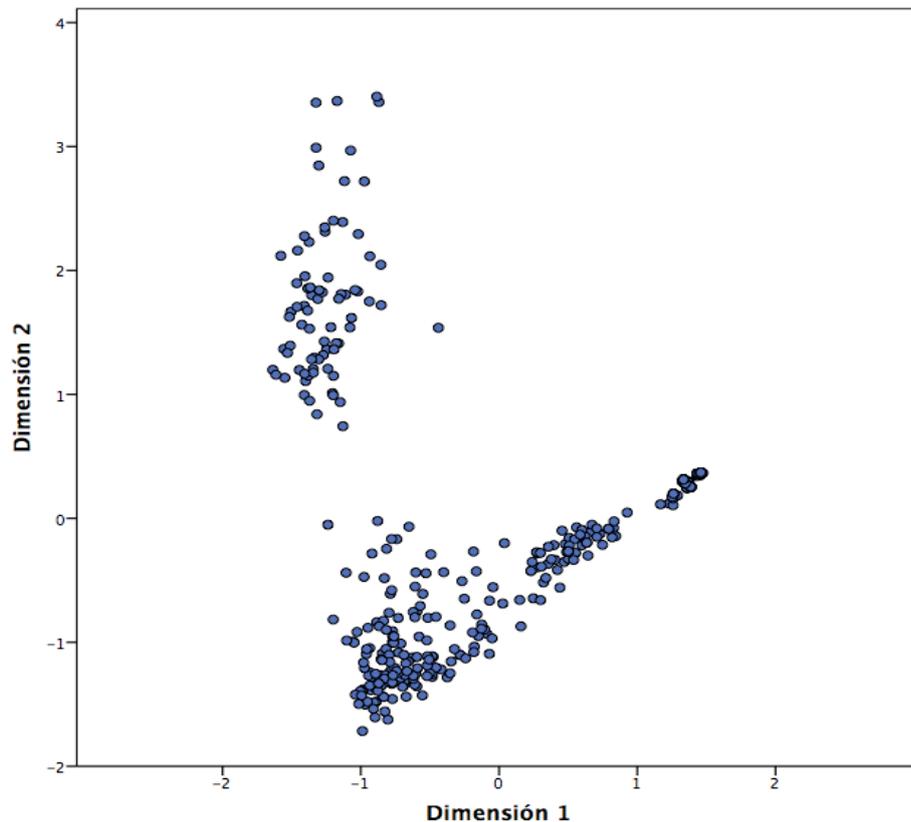
Tanto la tabla con las medidas de discriminación (Tabla 21), como la representación gráfica de dichas medidas de discriminación en el diagrama cartesiano construido a partir de las dos primeras dimensiones (Figura 37), muestran que son básicamente las variables presencia de asma (ASMA), realización de espirometría (ESPI), condiciones en la realización de la espirometría (COES), número de pruebas cutáneas positivas (POLI), pruebas cutáneas (PC) y presencia de rinitis alérgica (RIAL), las variables más importantes en la primera dimensión, dimensión que recoge fundamentalmente en forma de gradiente la presencia de asma en los individuos.

Por otro lado, es posible observar que las variables glucocorticoides inhalados (GCI), clasificación de la gravedad del asma cuando está con el tratamiento (CLAS), beta-adrenérgicos de acción larga (BADREL) y tipos de beta-adrenérgicos de acción larga (BADRET), son las que más contribuyen en la definición de la segunda dimensión, dimensión que determina un gradiente en la gravedad de asma en los individuos que la presentan.

Las variables clasificación del asma según la GEMA 2009 (CGRAS) y escalón terapéutico del tratamiento de mantenimiento del asma (ESTERA), por sus elevadas medidas de discriminación en ambas dimensiones, pueden ser consideradas como variables de plano; su representación gráfica muestra su posicionamiento en la bisectriz del primer cuadrante. A efectos prácticos de interpretación, estas variables recogen tanto la presencia o no del asma como su gravedad.

Todo lo anterior, si cabe, es mucho más evidente si realizamos la representación gráfica de los marcadores de los individuos en el diagrama de dispersión generado por las dimensiones de nuestra solución (Figura 38), en las que dichos marcadores (coordenadas cartesianas), nos permiten interpretar la posición relativa entre los mismos, de modo que la proximidad entre individuos se interpreta en términos de semejanza y la lejanía en términos de disimilitud.

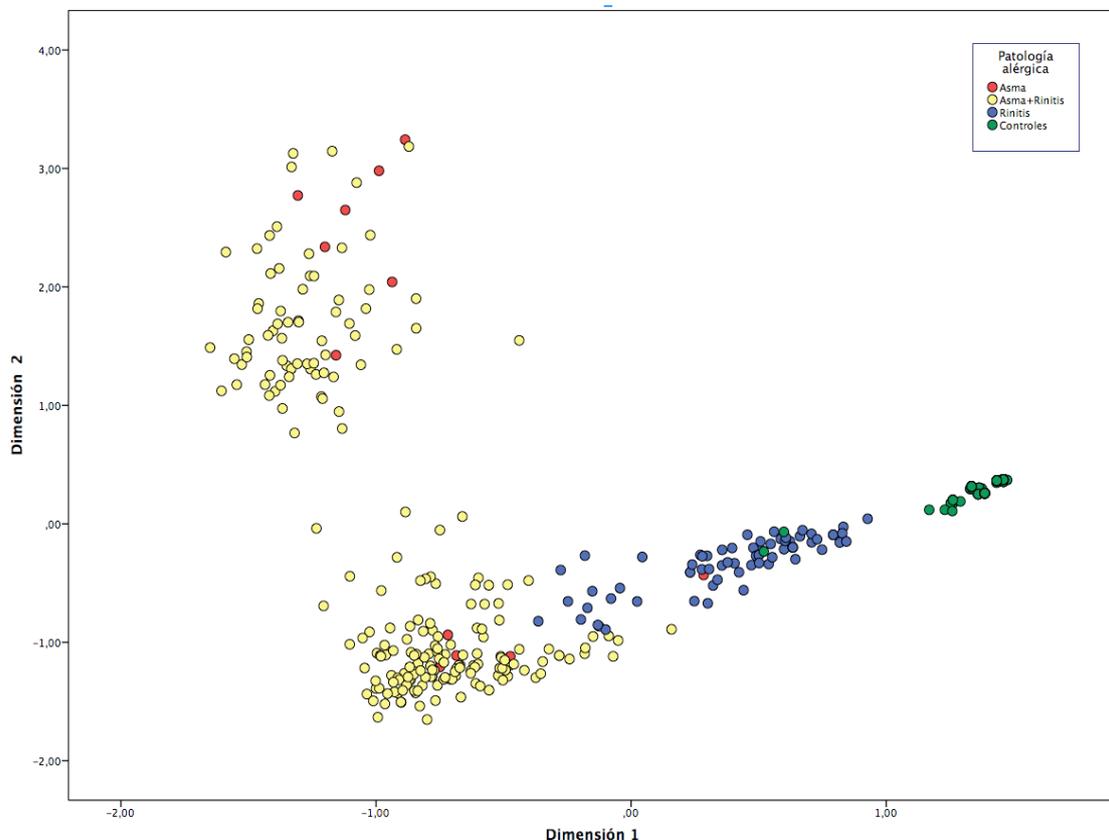
Este diagrama de dispersión (Figura 38) nos permite sugerir la existencia de agrupaciones naturales entre individuos que son próximos entre sí y a su vez alejados de otros individuos, cuya naturaleza sería posible determinar totalmente estudiando detenidamente sus características a través de todas y cada una de las variables consideradas en el análisis. Sin embargo, la simple identificación mediante colores de las características de cada individuo, nos permite obtener de un modo rápido y preciso la misma información.



**Figura 38.** Marcadores de los 473 individuos analizados en el primer plano factorial.

Así, con la idea de caracterizar las agrupaciones que aparentemente el análisis desvela, se procedió a identificar los individuos coloreándolos en función de variables marcadoras tales como pruebas cutáneas (PC), niveles de IgE total (IGE), etc. Uno de los resultados más clarificadores fue el que se presenta en la figura 39, en el que la identificación de los individuos se realiza en función de su patología alérgica.

En esta representación gráfica (Figura 39) observamos cómo, sorprendentemente, la solución factorial ha recogido las diferentes realidades clínicas de los individuos, individuos que se separan a lo largo de la primera dimensión en función de que sean pacientes (izquierda) o controles (derecha), situándose además los pacientes según un gradiente en función de su patología alérgica. En valores negativos de la primera dimensión, se sitúan pacientes con asma y rinitis, mezclados en este plano factorial con pacientes solo asmáticos; a continuación se sitúan los pacientes solo con rinitis, encontrándose los controles en valores positivos más altos.



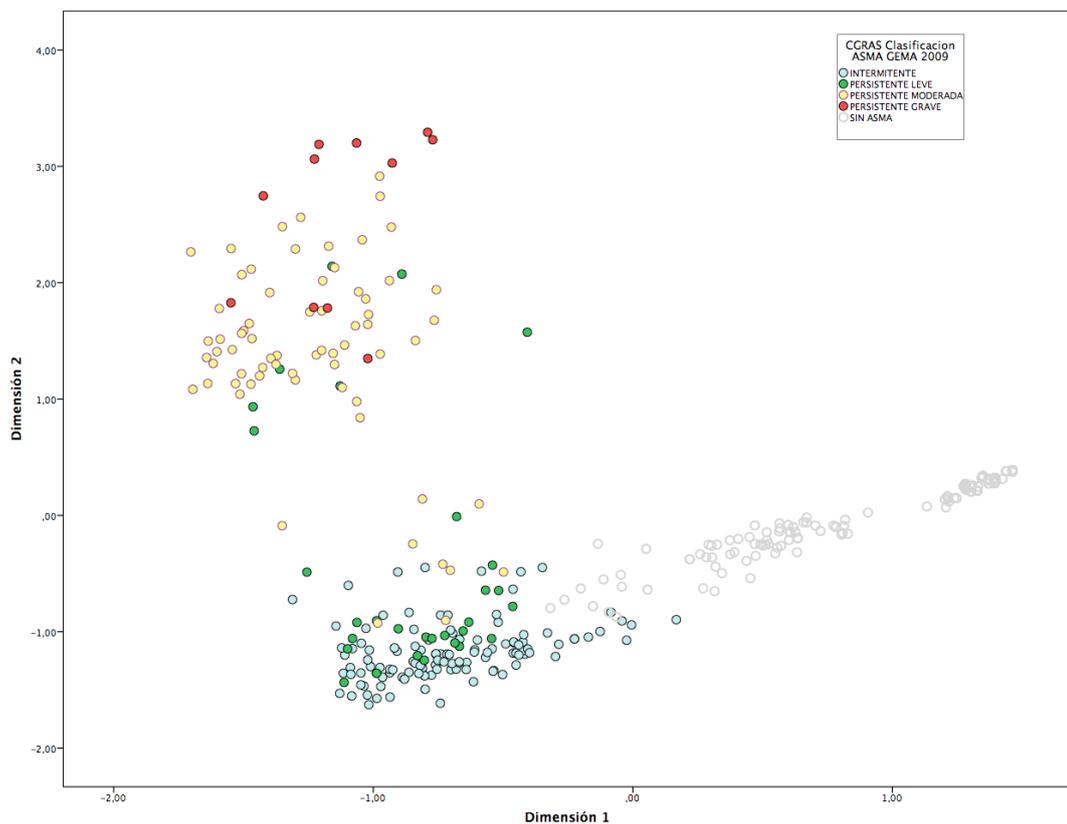
**Figura 39.** Marcadores de los individuos en el plano factorial 1-2, identificados mediante la patología alérgica que presentan.

Estos mismos individuos se separan a lo largo de la segunda dimensión (Dimensión 2, que recoge el 21 % de la información restante de este plano factorial) en función del tipo de asma que presentan.

Esto es lo que se evidencia en la siguiente gráfica (Figura 40); gráfica en la que se colorean los individuos según el tipo de asma al que pertenezcan considerando la clasificación de la GEMA 2009. Podría haber sucedido que todos los individuos estuviesen mezclados en la solución factorial y, sin embargo, se observa cómo la gran mayoría de los pacientes que presentan solo rinitis se sitúan en la parte inferior del

gráfico, al igual que los pacientes que tienen asma intermitente o persistente leve (valores negativos de los marcadores en la segunda dimensión).

Por otro lado, se observa que los marcadores positivos de los pacientes para esta segunda dimensión se corresponden con los pacientes que tienen asma y rinitis o asma exclusivamente, y que se corresponden con asma persistente moderada o grave en su gran mayoría.



**Figura 40.** Marcadores de los individuos en el plano factorial 1-2, identificados mediante la clasificación de Asma que presentan.

En este primer análisis no se tuvieron en cuenta las variables genéticas y su información, por lo que para tratar de analizar la importancia de dichas variables en la caracterización, tanto de pacientes como de controles, se procedió a realizar el análisis de correspondencias múltiples al conjunto de los 473 individuos, pero incluyendo ahora las variables genéticas.

El análisis preliminar sobre los resultados previos, en el que se incluyeron además todas las variables genéticas, proporcionó una solución con menor inercia explicada, razón por la cual se procedió a repetir el análisis excluyendo aquellas variables genéticas con menores medidas de discriminación y que estudios previos han demostrado no ser determinantes en la caracterización de pacientes con asma alérgica. El resultado de este nuevo análisis mejoró en relación a los valores de variabilidad explicada (64,7 %, según se muestra en la Tabla 22).

**Tabla 22.** Resumen del modelo del análisis para toda la muestra considerando información genética.

	Varianza contabilizada para	
Dimensión	Total (autovalor)	Inercia
1	17,415	0,458
2	7,168	0,189
Total	24,584	0,647

**Tabla 23.** Medidas de discriminación del análisis para los 473 individuos considerando variables genéticas.

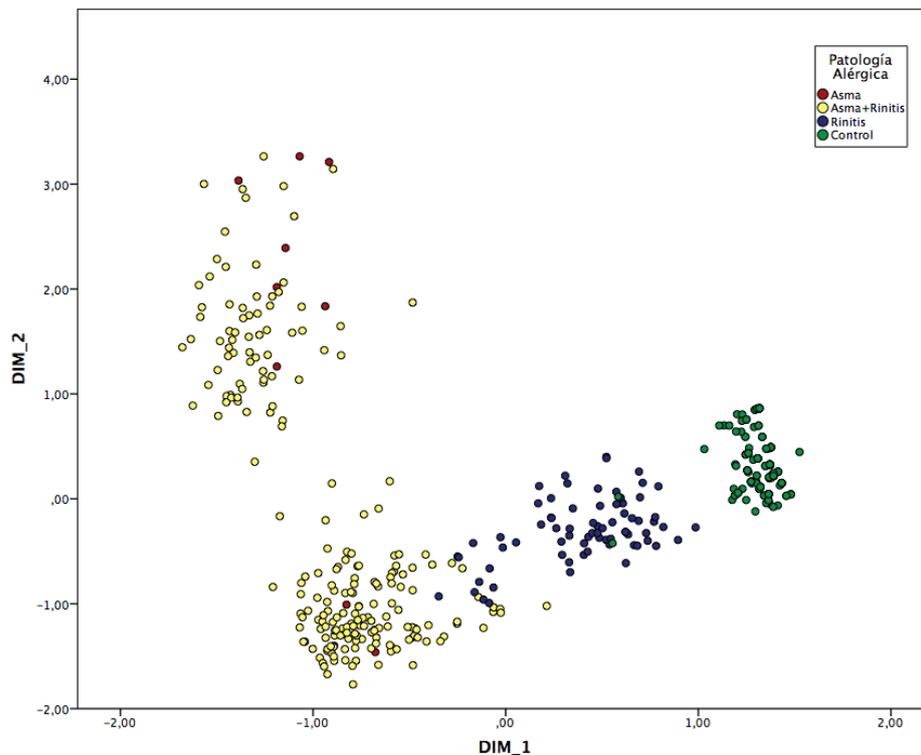
	Dimensión	
	1	2
CGRASClasificacióndelasmasegúnGEMA2009	1,035	,782
ESTERAEscalónterapéuticodelto.demantenimientodelasma	1,035	,899
ASMAPresencialeasma	,998	,017
COESCondicionesenla realizaciónde laespirometría	,981	,581
ESPIRealizadaespirometría	,957	,007
POLIPolisensibilización	,921	,072
PCPruebascutáneas	,897	,053
RIALPresencia de rinitis alérgica	,785	,079
POLPruebascutáneas para pólenes	,592	,053
PCMEDExistencia de alergia a medicamentos	,560	,021
ACAPruebascutáneas para ácaros	,492	,001
AS18Inicio de asma con < 18 años	,474	,016
CLASClasificación de la gravedad del asma cuando está con el to.	,428	,875
GCIIGlucocorticoides inhalados	,418	,558
IGENiveles de IgE total KU/l	,408	,028
CATINPresencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia	,400	,034
BADRETB adrenérgicos de acción de larga tipos	,399	,589
BADRELB adrenérgicos de acción de larga	,398	,583
RFEFPFEF25-75(%)	,392	,194
FEV1/FVCen%	,391	,310
RESPCClasificación según espirometría	,391	,301
FEV1PIVolumen espiratorio forzado en el primer segundo(%)	,388	,145
CONASClasificación del control del asma en el adulto	,386	,046
EDASEdad de aparición del asma	,386	,051
IMCÍndice de masa corporal	,386	,073
FVCPCapacidad vital forzada(%)	,385	,045
OXNIFracción de óxido nítrico exhalado realizado	,339	,001
EPIPruebas cutáneas para epitelios de animales	,319	,000
EDADREdad recodificada	,275	,126
TINMU Tipo de inmunoterapia	,248	,067
INMU Presencia de inmunoterapia	,242	,036
GCIBGlucocorticoides inhalados dosis baja	,234	,194
AFATAntecedentes familiares de grado de PC aeroalérgenos positivos	,225	,019
GCIMGlucocorticoides inhalados dosis media	,145	,274
GPTGDR835 > tSNP	,028	,006
GPTGDR882 > tSNP	,026	,008
GPTGDR549 > cSNP	,026	,017
GPTGDR613 > tSNP	,025	,008

Sin embargo, no se modificaron sustancialmente las medidas de discriminación que se obtuvieron en el análisis previo para las variables utilizadas (Tabla 23) y, además, el

análisis puso de manifiesto que las variables genéticas contribuyen en baja medida a la solución factorial, es decir, sus medias de discriminación resultan ser muy pequeñas.

Dado que la técnica, tal y como está implementada en el SPSS 22, permite definir una ponderación para cada variable (debe ser un número entero positivo), se realizó una prueba en la que se ponderaron con un 2 las variables genéticas con mayores medidas de discriminación en los análisis previos (frente a la ponderación que por defecto es 1 que presentan el resto de variables) para tratar de ver el cambio.

Sorprendentemente, el resultado obtenido, aún con esta ponderación, fue básicamente el descrito en el análisis previo, como se pone de manifiesto en la Figura 41 (que se muestra a modo de resumen de dicho análisis).



**Figura 41.** Individuos representadas en el plano factorial 1-2 (incluyendo en el análisis variables genéticas).

### 5.3.2. PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

En la búsqueda de uno de los objetivos del presente trabajo, la caracterización de los pacientes con asma alérgica, en una segunda fase de nuestro trabajo pasamos a analizar dichos pacientes, un total de 226 individuos sobre los que consideramos –a la luz de los resultados de los análisis precedentes– todas las variables de nuestra base de datos con relevancia, a excepción de la información genética.

La solución en 2 dimensiones del análisis de correspondencias múltiples sobre estos 226 pacientes asmáticos recoge un 63,2 % de la información total contenida en esta matriz de datos, como se observa en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Medidas de discriminación del análisis para los 473 individuos considerando variables genéticas.

Dimensión	Varianza contabilizada para	
	Total (autovalor)	Inercia
1	8,246	0,412
2	4,391	0,220
<b>Total</b>	<b>12,637</b>	<b>0,632</b>

Para este análisis, la reducción en el número de variables seleccionadas es evidente. Dicha reducción se produce no solamente por cuestiones del procedimiento multivariante empleado, ya mencionadas anteriormente (eliminación de aquellas variables que presentaban un mínimo porcentaje de celdas ocupadas y/o que portaban información redundante y/o que presentaban variabilidad cero), sino porque al tratarse de un estudio exclusivo sobre pacientes asmáticos, dejaba de tener sentido

que algunas variables fueran estudiadas en este colectivo. Además, estudios precedentes ya pusieron de manifiesto la escasa aportación de determinadas variables a la caracterización de los pacientes; por lo cual, fueron directamente descartadas.

Así, de las más de 100 variables de las que constaba la base de datos inicial, para este análisis consideramos tan solo 20, que aparecen listadas en la Tabla 25. Cabe señalar en este punto, que algunas variables, descartadas para formar parte de las variables activas en el análisis, fueron incluidas como variables suplementarias (no participan en los cálculos del análisis, pero se muestran en la solución final), para tratar de conocer cuál podría ser su aportación dada su relevancia en la práctica clínica. Estas variables han sido: niveles de IgE total (IGE), eosinófilos absolutos en sangre periférica (EOT), número de pruebas cutáneas positivas (POLI) y tipo de inmunoterapia (TINMU).

**Tabla 25.** Medidas de discriminación del análisis de los 226 pacientes asmáticos.

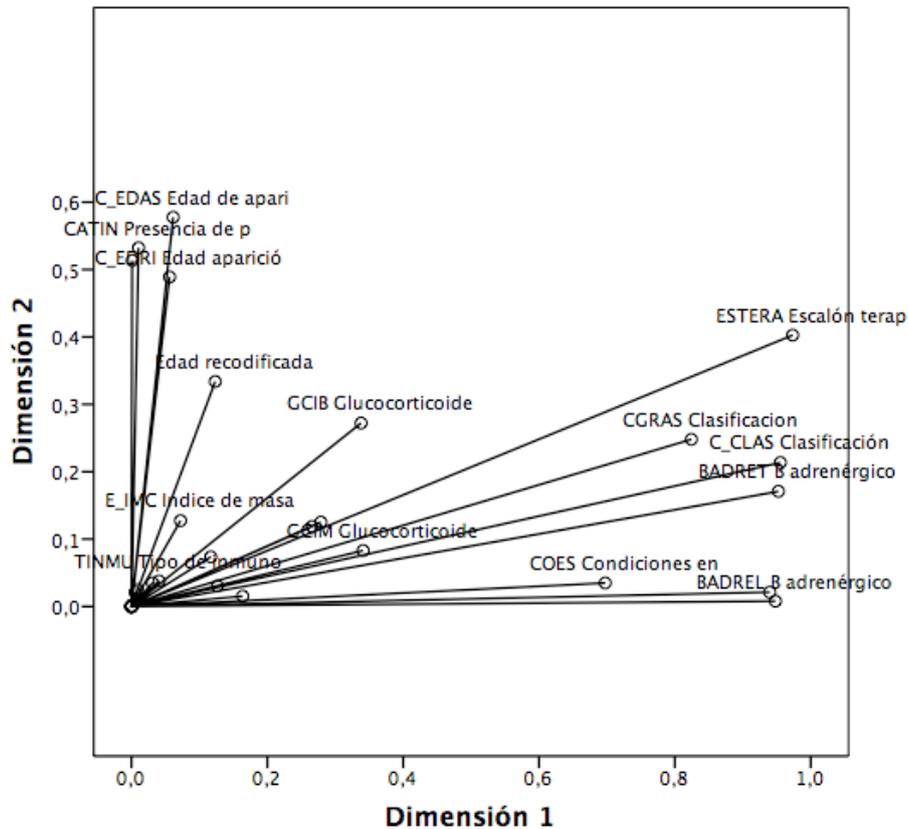
	Dimensión	
	1	2
FEV1P	,117	,074
RESPC	,266	,119
RFEFP	,164	,015
ESPI	,127	,030
ESTERA	,973	,403
FEV1/FVC	,279	,125
GCI	,940	,021
GCIB	,338	,272
GCIM	,341	,083
AS18	,001	,513
BADREL	,948	,008
BADRET	,953	,171
CLAS	,955	,214
EDAS	,061	,578
EDRI	,056	,489
CATIN	,010	,532
CGRAS	,824	,248
COES	,698	,035
IMC	,072	,127
Edad	,123	,334
IGE	,005	,021
EOT	,009	,025
POLI	,031	,035
TINMU	,041	,038

a. Variables suplementarias.

Las medidas de discriminación obtenidas con esta solución, tal y como se muestran en la tabla 25, nos permitieron obtener las variables más importantes en la configuración de la primera dimensión (en verde), así como cuáles participaron en mayor modo en la segunda dimensión (en azul), e igualmente las variables de plano (relevantes en ambas dimensiones, en color naranja). La representación gráfica de dichas medidas de discriminación en el primer plano factorial (Figura 42), permite apreciar visualmente esta implicación.

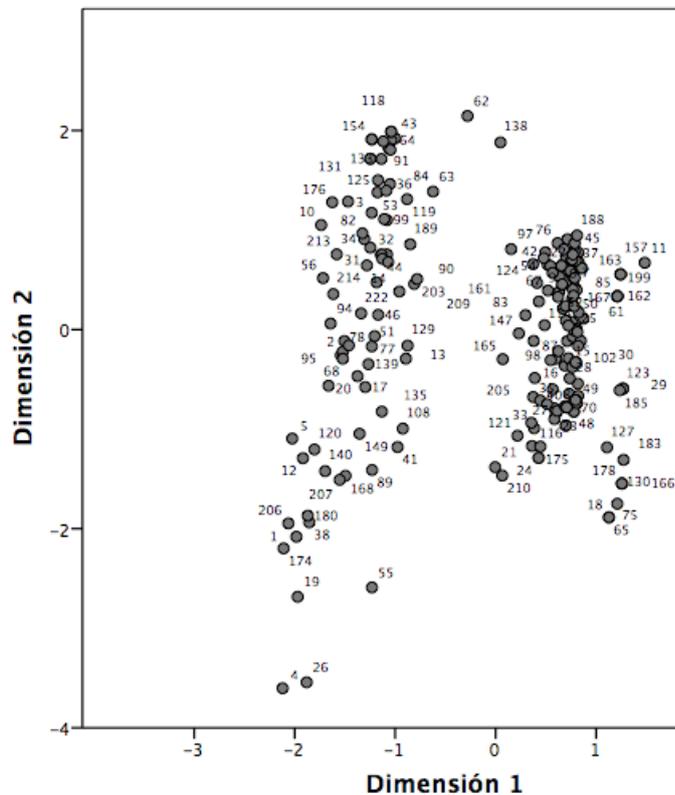
Las variables glucocorticoides inhalados (GCI) y beta adrenérgicos de acción de larga (BADREL) son las representadas con un vector de gran longitud y un ángulo más pequeño respecto de la primera dimensión. Por otro lado, las variables inicio de asma antes o después de los 18 años (AS18), edad de aparición del asma (EDAS) y presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia (CATIN), son las variables con mayor contribución a la definición de la segunda dimensión.

Las variables escalón terapéutico del tratamiento de mantenimiento del asma (ESTERA), clasificación de la gravedad del asma cuando está con el tratamiento (CLAS) y clasificación del asma según la GEMA 2009 (CGRAS) pueden considerarse variables de plano (en naranja) por su elevada contribución a ambas dimensiones. El resto de variables, como fácilmente se puede observar en la Tabla 25 y complementariamente en la Figura 42, contribuyen de modo testimonial a la solución final.



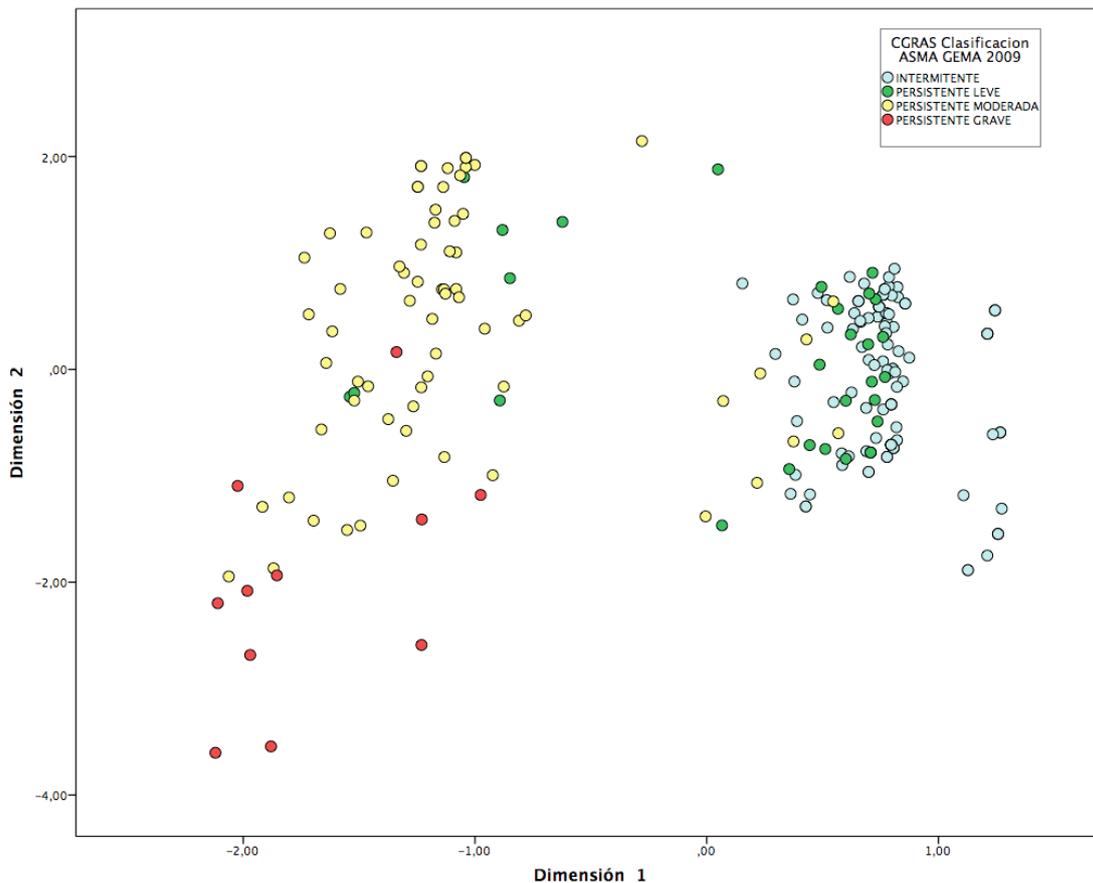
**Figura 42.** Medidas de discriminación de las representadas en la plano factorial 1-2.

La representación gráfica de los marcadores de los individuos en el diagrama cartesiano determinado por las 2 dimensiones de nuestra solución (Figura 43), nos permiten interpretar la relevancia que estas variables tienen en la posición de los pacientes asmáticos y, de este modo, caracterizarlos; pero, además, sirve para entrever las posibles agrupaciones de pacientes por sus posiciones relativas.



**Figura 43.** Marcadores de los 226 pacientes asmáticos en el primer plano factorial.

Como puede observarse en la figura anterior, la disposición de los pacientes en el primer plano factorial ha sufrido un pequeño cambio respecto de las figuras de análisis previos; lo cual era previsible, pues en este análisis ya no tenemos ni controles, ni pacientes únicamente con rinitis. Por ello, la nube de puntos correspondiente a los 226 pacientes asmáticos adopta la configuración que se puede observar en la Figuras 43 y 44 y, sin embargo, esta disposición de los pacientes es totalmente consistente con los resultados obtenidos en análisis previos.

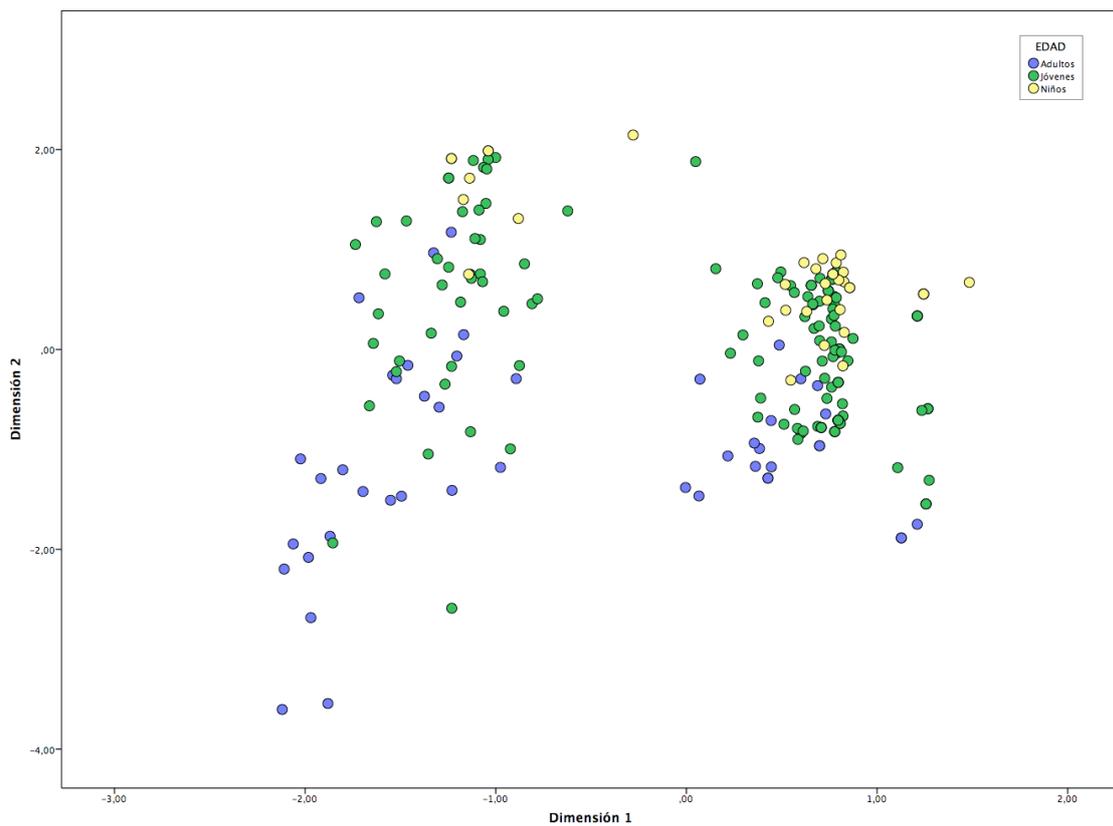


**Figura 44.** Marcadores de los pacientes asmáticos en el primer plano factorial, identificados mediante el tipo de asma que padecen.

Los pacientes en el gráfico se distribuyen en dos grandes grupos (Figura 44), según un gradiente de gravedad del asma marcada por la primera dimensión (recordemos que eran las variables como glucocorticoides inhalados y beta adrenérgicos de acción de larga, algunas de las más importantes en esta dimensión): pacientes con asma intermitente o intermitente leve (derecha del gráfico), y pacientes con asma persistentes moderada y/o grave (izquierda).

Dentro de cada uno de estos grupos de pacientes, se puede ver al menos que existe un segundo gradiente marcado por la segunda dimensión de nuestra solución correspondiente a edad (Figura 45). Cabe señalar que las variables con mayor

contribución a la definición de la segunda dimensión eran las que tenían relación con dicho aspecto: inicio de asma con < 18 años, edad aparición del asma y presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia, como ya se indicó previamente.



**Figura 45.** Marcadores de los pacientes asmáticos en el plano factorial 1-2, identificados mediante la clase de edad a la que pertenecen.

La inclusión de información genética fue el paso siguiente en este análisis. Se procedió a realizar el análisis de correspondencias múltiples al conjunto de los 226 pacientes asmáticos, incluyendo las variables genéticas, solución que proporcionó, en 2 dimensiones, un 55,1 % de inercia explicada (Tabla 26).

**Tabla 26.** Resumen del modelo del análisis de pacientes asmáticos, considerando ahora también las variables genéticas.

Dimensión	Varianza contabilizada para	
	Total (autovalor)	Inercia
1	8,268	0,359
2	4,415	0,192
<b>Total</b>	<b>12,683</b>	<b>0,551</b>

Esta disminución en la varianza contabilizada se explica por el incremento en el número de variables, sin que dicho incremento aporte información significativa, tal y como se observa en la Tabla 27, donde se muestran las medidas de discriminación de las variables genéticas (en verde). El resto de las medidas de discriminación son muy similares a las del estudio previo.

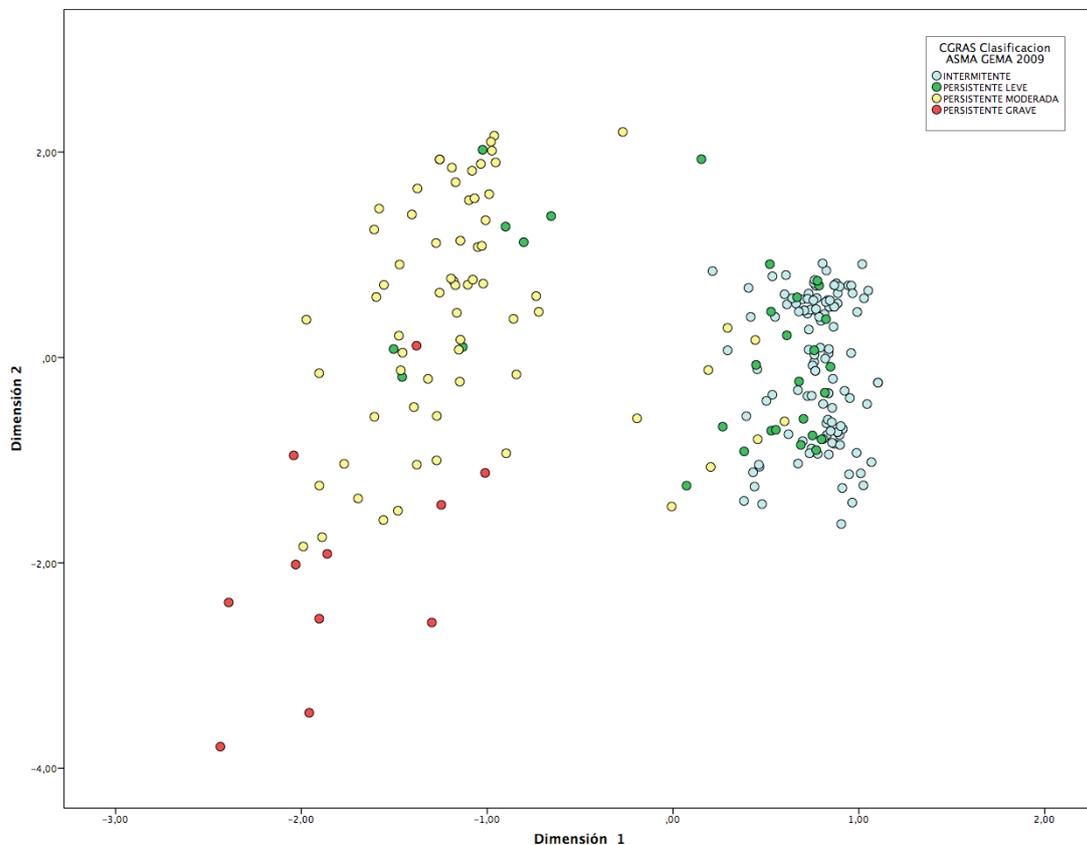
**Tabla 27.** Medidas de discriminación considerando variables genéticas.

	Dimensión	
	1	2
ESTERA Escalón terapéutico del to. de mantenimiento del asma	,963	,439
CLAS Clasificación de la gravedad del asma cuando está en to.	,948	,229
BADRET B adrenérgicos de acción de larga tipos	,943	,194
BADREL B adrenérgicos de acción de larga	,939	,013
GCI Glucocorticoides inhalados	,927	,030
CGRAS Clasificación del asma según GEMA 2009	,826	,251
COES Condiciones en la realización de la espirometría	,664	,019
GCIM Glucocorticoides inhalados dosis media	,342	,081
GCI B Glucocorticoides inhalados dosis baja	,322	,308
FEV1/FVC en %	,294	,106
RESPC Clasificación según espirometría	,282	,098
RFEFP FE <sub>F</sub> 25-75 (%)	,176	,012
Edad recodificada	,133	,316
FEV1P Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (%)	,117	,068
IMC Índice de masa corporal	,074	,122
EDAS Edad de aparición del asma	,064	,566
EDRI Edad de aparición de rinoconjuntivitis alérgica	,057	,466
GPTGDR 1389 >a NP	,055	,030
GPTGDR 123 >c NP	,049	,031
GPTGDR 41 >t NP	,042	,012
GPTGDR 49 >c NP	,042	,011
POL Polisensibilización (nº PC positivas) <sup>o</sup>	,026	,033
CATIN Presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia	,011	,512
INMU Presencia de inmunoterapia <sup>o</sup>	,008	,027
AS18 Inicio del asma en los 8 años	,001	,503

a. Variable complementaria.

La representación gráfica de los marcadores de los pacientes asmáticos en el diagrama cartesiano determinado por las 2 dimensiones de este análisis en el que participan las variables genéticas (Figura 46), nos permite interpretar el posicionamiento de dichos pacientes, que no ha sufrido apenas variaciones respecto del análisis previo (en el que no incluimos las variables genéticas).

Como puede fácilmente comprobarse, la disposición de los pacientes en el primer plano factorial se distribuye de nuevo en dos grandes grupos: pacientes con asma intermitente y/o persistente leve (derecha del gráfico), y pacientes con asma persistente moderada y/o grave (en la izquierda).

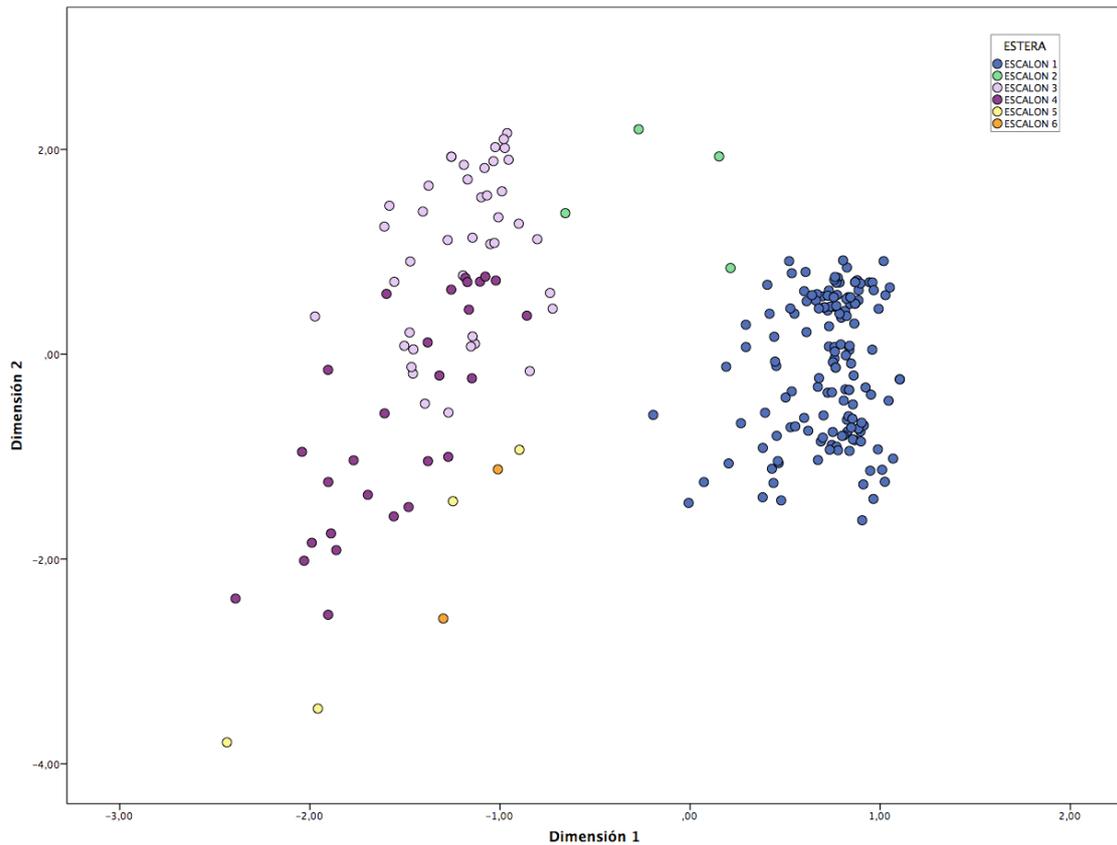


**Figura 46.** Marcadores de los pacientes en el primer plano factorial, identificados mediante la clasificación de la GEMA 2009.

El único cambio que puede apreciarse, resultado de la inclusión de variables genéticas en el análisis (Figura 46), es que los pacientes con asma persistente moderada y persistente grave se diferencian algo más de los pacientes con asma intermitente y asma persistente leve, que a su vez se parecen un poco más entre ellas. Este extremo debería ser estudiado con mayor profundidad en estudios posteriores.

Si la identificación de los pacientes en el primer plano factorial se realiza en función de su escalón terapéutico, de nuevo los pacientes se distribuyen en dos grandes grupos (ver Figura 47). Así, los pacientes que se posicionan en el escalón terapéutico 1 conforman una agrupación a la derecha del gráfico, mientras que el resto de pacientes

(escalones 3 a 6) se posicionan en el grupo de la izquierda del gráfico, encontrándose los pacientes del escalón terapéutico 2 entre ambos grupos.



**Figura 47.** Marcadores de los pacientes asmáticos identificados mediante el escalón terapéutico.

El primero de los grupos detectados, correspondiente al escalón terapéutico 1, incluye, como ya sabemos, a los pacientes con asma intermitente. En la agrupación de pacientes de la izquierda, correspondiente a los escalones terapéuticos 3 a 6, se encontrarían básicamente pacientes con asma persistente moderada y/o grave. En este segundo grupo se observa un gradiente de arriba a abajo en el escalón terapéutico.

### 5.3.3. CARACTERIZACIÓN DE FENOTIPOS EN PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

La caracterización del fenotipo de los pacientes con asma mediante el análisis de *clusters* (o de conglomerados), ha constituido el tercero de los abordajes multivariantes que hemos realizado sobre el total de los 226 pacientes con asma alérgica.

Conviene resaltar en este punto, que esta técnica estadística multivariante no ofrece soluciones únicas, a pesar de que existiera una estructura “cierta” de clasificación en los datos. Las soluciones dependen de las variables consideradas y de los distintos métodos para el cálculo de las distancias entre conglomerados que producen distintas clasificaciones, por lo que no existe una única clasificación correcta.

Las variables seleccionadas para este análisis de *clusters*, lo han sido basándose en criterios clínicos (descartadas las variables no relevantes o con información redundante en esta cohorte) y en evidencias bibliográficas previas [110, 111]. Las 12 variables finalmente utilizadas para el análisis, de entre las más de 100 que constituían nuestra base de datos de partida, son las siguientes:

- Antecedentes familiares de primer grado con asma (AFAS), rinitis (AFRI) y con pruebas cutáneas positivas para aeroalérgenos (AFAT).
- Características del paciente: género (SEXO), fumador activo (FUMA), índice de masa corporal (IMC) y edad de inicio del asma (AS18).
- Variables clínicas: niveles de IgE total (IGE), volumen espiratorio forzado en porcentaje en el primer segundo (FEV1P), clasificación según espirometría (ESPC), número de pruebas cutáneas positivas (POLI) y glucocorticoides inhalados (GCI).

Sobre estos datos se ha procedido a realizar un análisis de *clusters* jerárquico, que intenta identificar grupos relativamente homogéneos de pacientes a partir de las variables seleccionadas. Como método de agrupación, se optó por el método de Ward,

procedimiento jerárquico aglomerativo en el cual, en cada etapa, se unen los dos conglomerados para los cuales se tenga el menor incremento en el valor total de la suma de los cuadrados de las diferencias de cada individuo al centroide del *cluster*, dentro de cada *cluster*.

Si bien es posible analizar las variables brutas con sus distintos niveles de escalamiento, ya que las diferencias en el escalamiento pueden afectar a las soluciones en *clusters*, nosotros hemos optado por realizar el análisis de *clusters* a partir de la solución del análisis de correspondencias múltiples realizado con las variables descritas, resultado que recoge un 46,8 % de la información total contenida en la matriz de datos, tal y como se observa en la Tabla 28, y que tiene muy distribuida la inercia explicada por cada una de las 3 dimensiones encontradas.

**Tabla 28.** Análisis de correspondencias múltiples sobre 226 pacientes asmáticas.  
Solución en 3 dimensiones.

Dimensión	Varianza contabilizada para	
	Total (autovalor)	Inercia
1	2,322	0,193
2	1,790	0,149
3	1,503	0,125
<b>Total</b>	<b>5,615</b>	<b>0,468</b>

Que la solución del análisis de correspondencias múltiples en 3 dimensiones recoja tan solo un 46,8 % de la información total contenida en la matriz de datos (cuando el estudio precedente, para una solución en 2 dimensiones, recogía un 55,1 %), tiene que ver con el número de variables (12 frente a 23), las variables seleccionadas (que ahora son otras) y el distinto montante de información que aporta cada una de ellas.

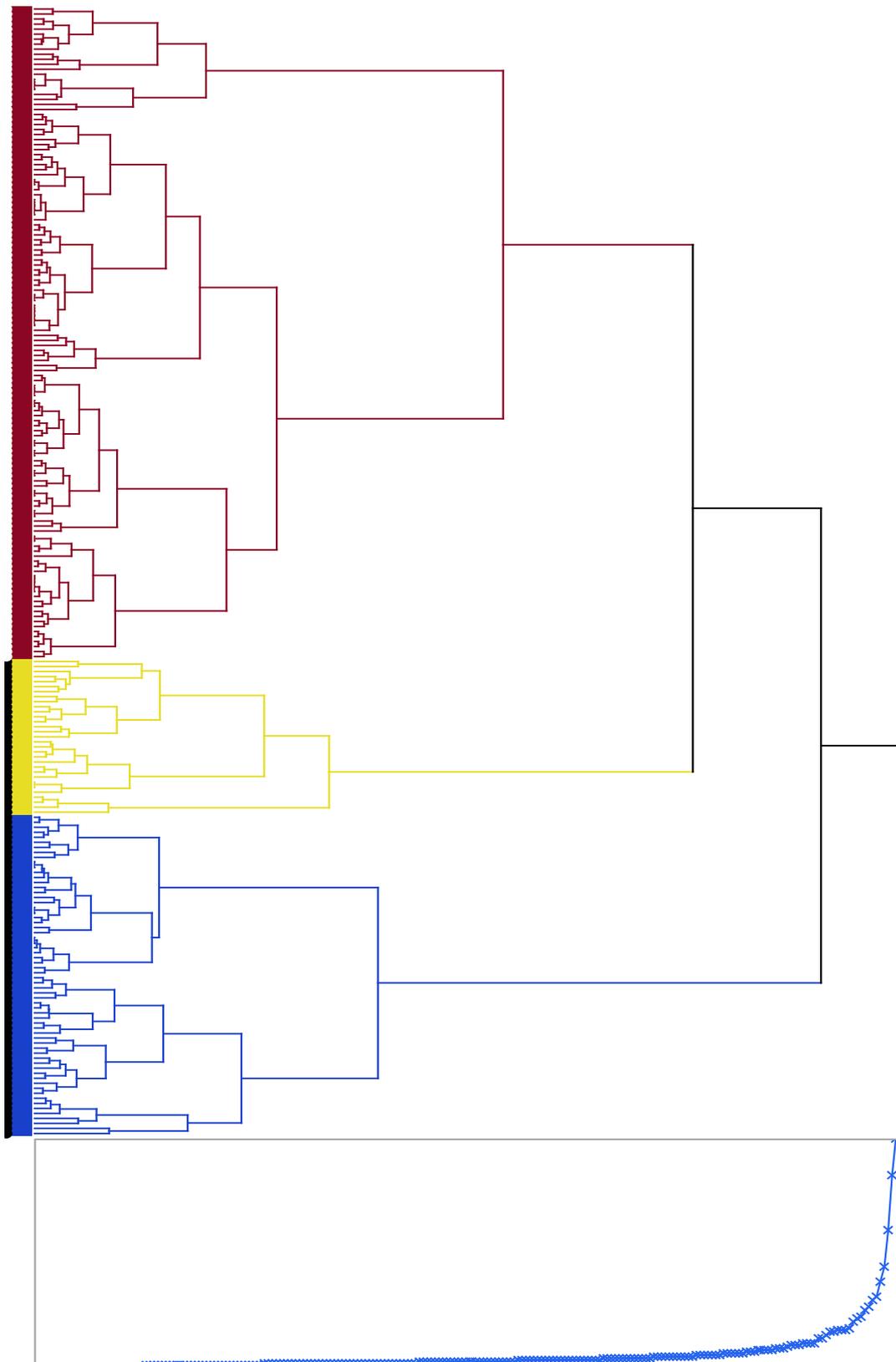
Adicionalmente, estas variables se han mostrado más adecuadas a la hora de caracterizar con el análisis de *clusters* a los pacientes asmáticos y su fenotipo.

Se consideraron los valores de las 3 dimensiones de la solución proporcionada por el análisis de correspondencias múltiples, relativas a todos y cada uno de los pacientes, en el enfoque jerárquico. La solución obtenida, tal y como se observa en la Tabla 29, está constituida fundamentalmente por tres conglomerados o agrupaciones de distinto tamaño, encontrándose la mayor parte de los pacientes, 133 (el 59,1 %), en el primer *cluster*. El *cluster* 3 es el más pequeño, al contar tan solo con 27 de los pacientes analizados, el 12 % de ellos.

**Tabla 29.** Tabla resumen del número de pacientes que constituyen cada *cluster*.

		Distribución de frecuencias		
		FRECUENCIA	%	COLOR
Cluster	1	133	59,1	Rojo
	2	65	28,9	Amarillo
	3	27	12,0	Azul

Este número de *clusters* o agrupaciones puede determinarse a partir del dendrograma que se muestra en la Figura 48. Un criterio a seguir para determinar dicho número puede ser el del gráfico de sedimentación, que se muestra en la parte inferior del dendrograma. También el de la distancia a la que se producen los conglomerados. En nuestro caso, la decisión de trabajar con 3 *clusters* se debió a la estabilidad que dichos grupos presentaban, estabilidad que no aparecía cuando se seleccionaba un número de grupos distinto.



**Figura 48.** Dendrograma (arriba) y gráfico de sedimentación (abajo).  
Análisis de *clusters* jerárquicos, método de Ward.

Las características principales del total de la cohorte en relación a los 3 conglomerados seleccionados se presentan en la Tabla 30. Solo se muestran aquellas variables que aportan información determinante en la caracterización fenotípica.

El *cluster* número 1, el más numeroso, se caracteriza porque la mayoría de los pacientes que forman parte de él presentan asma intermitente y carecen de antecedentes familiares de primer grado de asma, rinitis o pruebas cutáneas positivas para aeroalérgenos (atopia). Todo ello les diferencia claramente de los pacientes de otros dos conglomerados. En el resto de características, el *cluster* 1 se asemeja más al grupo 2 que al grupo 3.

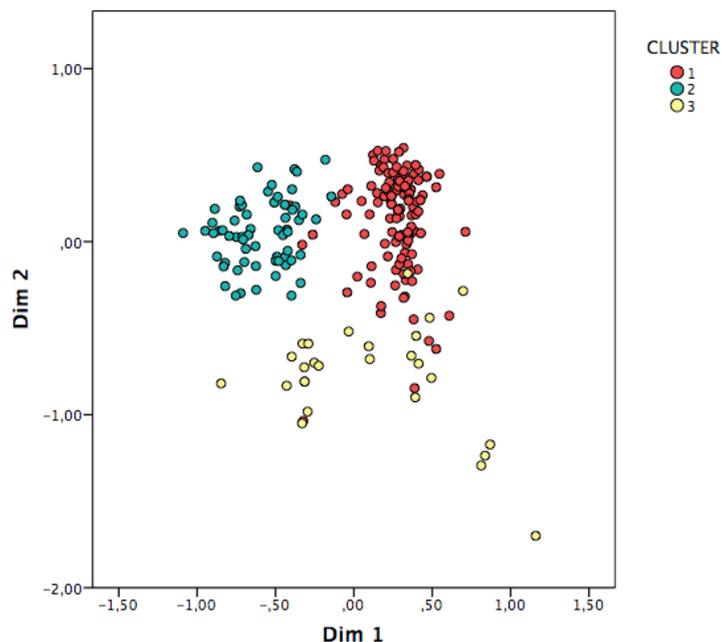
El segundo de los conglomerados encontrados está constituido por pacientes que presentan, todos ellos, antecedentes familiares de PC para aeroalérgenos y, la gran mayoría, antecedentes familiares de primer grado para asma y rinitis. En las pruebas respiratorias presentan valores normales y no requieren tratamiento con beta adrenérgicos de acción larga ni con glucocorticoides. Se corresponden con pacientes que se encuentran en escalones terapéuticos bajos del tratamiento del asma, para la mayoría una dolencia intermitente.

El tercer *cluster*, conformado tan solo 27 pacientes, se caracteriza porque éstos presentan, en su gran mayoría (81,5 %), un asma persistente moderada o grave; por lo que se encuentran sobre todo en escalones terapéuticos 3 o 4, siendo administrados con beta adrenérgicos de acción larga y glucocorticoides. Los valores espirométricos muestran grados importantes de obstrucción en una gran parte de los individuos. Los pacientes carecen, en su mayoría, de familiares de primer grado con antecedentes de asma o rinitis. En su mayoría iniciaron su asma con más de 18 años.

**Tabla 30.** Características principales definitorias de los conglomerados obtenidos.

	Categorías	Cluster 1 (N=133)	Cluster 2 (N=65)	Cluster 3 (N=27)	p-valor
Inicio de asma con < 18 años (%)	SI	<b>59,7</b>	<b>59,7</b>	34,6	0,053
	NO	40,3	40,3	<b>65,4</b>	
Antecedentes familiares de primer grado de atopia (%)	SI	6,1	<b>100</b>	<b>53,8</b>	<0,001
	NO	<b>93,9</b>	–	46,2	
Antecedentes familiares de primer grado de asma (%)	SI	2,3	<b>64,1</b>	34,6	<0,001
	NO	<b>97,7</b>	35,9	<b>65,4</b>	
Antecedentes familiares de primer grado de rinitis (%)	SI	1,5	<b>68,8</b>	15,4	<0,001
	NO	<b>98,5</b>	31,3	<b>84,6</b>	
Niveles de IgE total (kU/L)	< 100	31,5	18,8	16	0,055
	101-1000	61,5	65,6	80	
	> 1000	6,9	15,6	4	
FEV1 (%)	< 60	–	–	18,5	<0,001
	60-80	17,2	16,4	<b>40,7</b>	
	> 80	<b>82,8</b>	<b>83,6</b>	<b>40,7</b>	
FEV1/FVC (%)	< 70	4,3	–	92,6	<0,001
	> 70	<b>95,7</b>	<b>100</b>	7,4	
FEF 25-75 (%)	< 65	25,9	21,3	<b>92,6</b>	<0,001
	> 65	<b>74,1</b>	<b>78,7</b>	7,4	
Glucocorticoides inhalados (%)	SI	31,6	20	<b>88,9</b>	<0,001
	NO	<b>68,4</b>	<b>80</b>	11,1	
Beta adrenérgicos de acción larga (%)	SI	30,8	16,9	<b>85,2</b>	<0,001
	NO	<b>69,2</b>	<b>83,1</b>	14,8	
Clasificación del asma según la GEMA 2009	Intermitente	<b>58,6</b>	<b>58,5</b>	3,7	<0,001
	Persistente leve	11,3	16,9	14,8	
	Persistente moderada	28,6	23,1	<b>55,6</b>	
	Persistente grave	1,5	1,5	25,9	
Escalón terapéutico del tratamiento del asma	Escalón 1	<b>68,4</b>	<b>80</b>	11,1	<0,001
	Escalón 2	0,8	3,1	3,7	
	Escalón 3	18,8	12,3	<b>33,3</b>	
	Escalón 4	10,5	3,1	<b>44,4</b>	
	Escalón 5	1,5	–	3,7	
	Escalón 6	–	1,5	3,7	

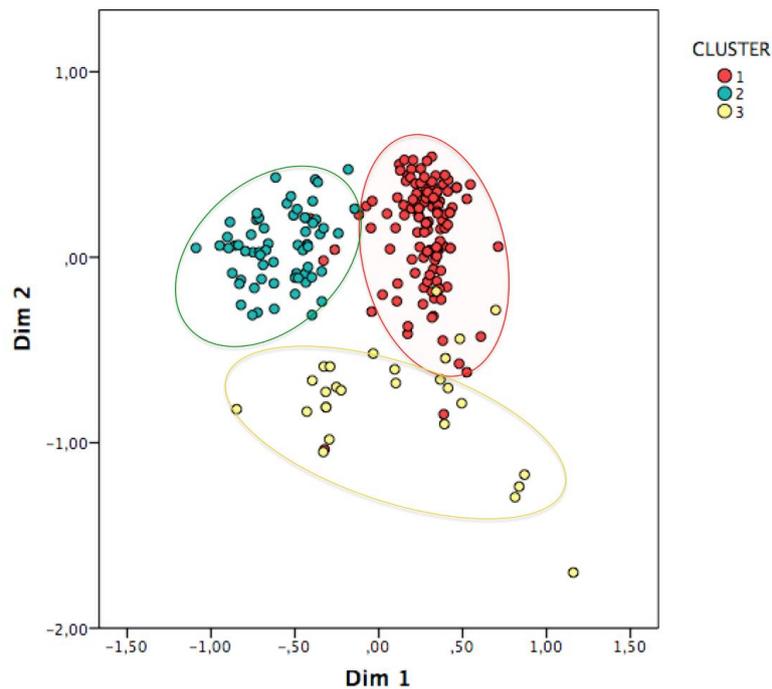
La figura 49 representa los pacientes respecto a la primera y tercera dimensión de la solución multivariante, estando marcados con un color diferente según el conglomerado al que han sido asignados como consecuencia del análisis de *clusters* jerárquico.



**Figura 49.** Marcadores de pacientes asmáticos en el plano 1-2, identificados mediante el *cluster* de pertenencia.

Este diagrama, generado para visualizar de otro modo los *clusters* formados, se ha creado utilizando las dimensiones latentes obtenidas en el análisis de correlación múltiple, mientras que los marcadores se han obtenido mediante la información del *cluster* de pertenencia marcado por el procedimiento análisis de conglomerados jerárquico.

A la vista de estos resultados, la solución de tres conglomerados parece satisfactoria: refleja la organización de los datos de manera coherente y se consigue una diferenciación del fenotipo clara en los tres grupos, tal y como se ejemplifica en la Figura 50.



**Figura 50.** Pacientes asmáticos en el plano factorial 1-2, rodeados de círculos que sugieren los conglomerados.

Los análisis previos nos permiten indicar que una solución con un mayor número de conglomerados no explicaría mejor las distancias existentes entre los casos, ni siquiera utilizando otro método de clasificación; tampoco otra combinación de variables.



# 6. DISCUSIÓN



## 6.1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

En este estudio se analizaron las variables clínico-biológicas de los pacientes alérgicos. Atendiendo inicialmente a la sintomatología, en relación con la rinitis alérgica se observó cierto predominio de la rinitis persistente (56 %). En el estudio observacional, transversal y multicéntrico ADRIAL realizado en España en 2010 [112] se observaba, sin embargo, un discreto predominio de la rinitis intermitente (51 %); así como, en un estudio realizado en población pediátrica [113], en el que el predominio de rinitis intermitente alcanzaba casi el 60 %. Por su parte, en un estudio ibérico, realizado en 3.225 pacientes con rinitis alérgica de España y Portugal [114], se observó que, en general, la rinitis intermitente leve y la persistente moderada-grave fueron las más frecuentes.

Por el contrario, en el caso del asma el predominio fue del asma tipo intermitente seguida de la persistente moderada. En el caso del estudio ibérico, también el asma intermitente resultó la más frecuente, con un 56 % de los casos [115].

Respecto a las pruebas funcionales, como era de esperar, se observó una correlación entre la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1), relación conocida y empleada en la práctica clínica –se utiliza el índice FEV1/FVC para evaluar el nivel de obstrucción– [116]. También se observó una correlación directa entre FEV1 y el flujo espiratorio forzado entre el 25 y el 75 % de la FVC (FEF25-75), y entre FEV1/FVC y FEF25-75. Era previsible que existiera esta relación entre parámetros espirométricos ya que FEV1, FEV1/FVC y FEF25-75 son utilizados para determinar el nivel de obstrucción de las vías respiratorias. La disminución de FEV1 confirma la obstrucción, lo que puede ayudar a establecer la gravedad de la misma y es indicativo de un mayor riesgo de exacerbaciones [117]. FEV1/FVC es el parámetro más importante para valorar la existencia de obstrucción e indica la proporción de la FVC que se expulsa durante el primer segundo de la maniobra de espiración forzada. FEF25-

75, teóricamente, reflejaría el estado de las vías aéreas de pequeño calibre, aunque se debe considerar la existencia de una gran variabilidad interindividual. En sí, estas correlaciones están bien descritas y sirven para corroborar la correcta selección de los pacientes y la calidad en la introducción de los datos.

Al relacionar los valores espirométricos con el grado de asma, como era de esperar, encontramos diferencias significativas en los valores espirométricos (FEV1, FEV1/FVC y FEF 25-75) entre el asma intermitente y la persistente grave; y lo mismo al relacionar el asma persistente leve con la persistente grave. Entre el asma intermitente y la persistente moderada solo hallamos diferencias significativas en FEV1/FVC y FEF 25-75. Al comparar asma persistente moderada y persistente grave solo hemos hallado diferencias en FEV1/FVC. Estas relaciones son conocidas porque las cifras más bajas de los valores espirométricos se producen en el asma persistente grave y, además, son criterio de clasificación de la gravedad del asma [7, 117].

En cuanto a los parámetros inflamatorios, encontramos una relación entre los valores de FE<sub>NO</sub> y el número total de eosinófilos en sangre periférica. Está descrito en la bibliografía que el nivel de NO en vías respiratorias es un indicador de la inflamación en el asma y que se relaciona con los eosinófilos en el esputo [118]. Se ha intentado relacionar la cifra de eosinófilos en sangre periférica con el nivel de eosinófilos en las vías respiratorias. Jia *et al.* (2012) describieron una tendencia en este sentido, aunque no llegó a alcanzar significación estadística [119]. Berry *et al.* encontraron un aceptable valor en las curvas ROC al comparar los valores de FE<sub>NO</sub> con la eosinofilia en esputo [120]. Finalmente, Wagener *et al.* (2015) en pacientes tanto con asma persistente leve, moderada o grave, han demostrado recientemente que los eosinófilos en sangre periférica tienen una mayor precisión para la identificación de la cantidad de eosinófilos en el esputo, seguidos en importancia por el FE<sub>NO</sub> [121].

En nuestra población asmática encontramos una relación entre la sensibilización a los ácaros y el grado de asma, de modo que entre los pacientes con asma persistente grave existía una mayor prevalencia de sensibilización a estos aeroalérgenos. Esta

relación se mantuvo cuando analizamos la sensibilización a los ácaros en la población asmática agrupando asma intermitente con persistente leve y persistente moderada con grave. Es conocido que la sensibilización a los ácaros es un importante factor de riesgo para el desarrollo de asma [122]. En nuestro caso encontramos, además, una cierta correlación entre la alergia a los ácaros y la gravedad del asma. En el citado estudio ibérico [114], se encontró una correlación entre un mayor número de sensibilizaciones y el desarrollo de asma, y hay que tener en cuenta que la sensibilización a los ácaros estaba presente en el 62 % de la población. Esta observación podría ser interesante desde el punto de vista del manejo clínico de los pacientes, ya que cuando inicialmente se diagnostique el asma con sensibilización a ácaros, además de tomar las medidas higiénicas necesarias para evitar la exposición a los mismos, podría ponernos sobre aviso de una posible evolución a un cuadro asmático más grave.

También observamos una relación entre el grado de asma y la sensibilización a los epitelios: los pacientes diagnosticados de asma persistente grave presentaban mayor frecuencia de sensibilización a los epitelios que el resto de asmáticos. Esta relación se mantuvo cuando comparamos la sensibilización a los epitelios con la población asmática agrupada en asma intermitente con persistente leve y persistente moderada con grave. No se dispone de datos a este respecto, pero en el estudio ibérico, el porcentaje de sensibilización a epitelios animales estuvo presente en alrededor de un tercio de la población [114].

Pudimos también confirmar en nuestra población de pacientes con asma alérgica la relación entre el grado del asma y el control de la misma. La mayor parte de los pacientes con asma intermitente, lógicamente, presentan un buen control de su sintomatología, mientras que en los pacientes con asma persistente grave se observa igual proporción de los que presentan parcial y buen control. Esta relación se mantiene cuando agrupamos a la asmáticos en asma intermitente con persistente leve y persistente moderada con grave. Esto mismo se observaba en el estudio MAGIC

realizado en España, en el que se encontró un peor control en los pacientes con mayor gravedad del asma [123].

También encontramos una relación de la gravedad del asma con la utilización de glucocorticoides inhalados (GCI). Nuestra población con asma intermitente no los empleaba, mientras que casi la totalidad de los diagnosticados de asma persistente grave los utilizaban a diario. Esta es una relación conocida previamente, pues la mayor parte de los diagnosticados de asma intermitente presentan una buena evolución y escasas necesidades farmacológicas, mientras que el asma persistente grave suele tener una evolución más tórpida y que precisa del empleo de una amplia batería terapéutica [7]. Es, nuevamente, un control de calidad del estudio.

Al agrupar a la población asmática de nuestro estudio en asma intermitente-persistente leve y persistente moderada-grave, encontramos una relación con significación estadística entre el asma intermitente-persistente leve y la monosensibilización. En el caso de la rinitis, Ciprandi y Cirillo (2011) encontraron que la monosensibilización se asociaba a una menor gravedad de la rinitis alérgica [11]. Por su parte, Fasce *et al.* (2004) llegaron a la conclusión de que la alergia respiratoria se inicia siempre con la monosensibilización y que la evolución a la polisensibilización es frecuente [124]. Debemos recordar que en nuestro estudio se observa un predominio de la polisensibilización a aeroalérgenos. Este predominio de la polisensibilización en los pacientes alérgicos es ya conocido, y ha sido previamente descrito [10].

Hemos encontrado también que un mayor número de sensibilizaciones se relaciona significativamente con niveles más elevados de IgE total en suero. Parece lógico que al incrementarse el número de sensibilizaciones también se incrementen los niveles de IgE. En este sentido, Dávila *et al.* (2015) han encontrado, en los pacientes con asma alérgica, unos niveles séricos de IgE total significativamente superiores a los de los pacientes monosensibilizados [125].

Por otro lado, hemos hallado un número de eosinófilos totales en sangre periférica más elevado en los asmáticos que presentaban más sensibilizaciones. Esta relación alcanzó significación estadística cuando las sensibilizaciones se agruparon en dos o menos sensibilizaciones y más de dos sensibilizaciones, siendo en estos pacientes los niveles de eosinófilos totales fueron más elevadas. Aunque este dato puede estar influido por el hecho de que los pacientes con mayor número de sensibilizaciones presentan mayor gravedad, también parece evidente que podría deberse a una mayor respuesta de linfocitos Th2 y, por tanto, de IL4, IL5 e IL13 y la consiguiente activación de eosinófilos y aumento de los mismos en las vías respiratorias y en sangre periférica.

Respecto a la relación entre eosinofilia en sangre periférica y niveles de IgE total con la gravedad del asma, hemos observado un incremento, tanto en el recuento de eosinófilos en sangre periférica como en los niveles de IgE total, al incrementarse la gravedad del asma; exceptuando el caso del asma persistente grave, en la que se observa una gran heterogeneidad que interfiere en la asociación. En lo referente a la IgE total, en el ya citado estudio de Dávila *et al.* [125], los autores encontraron un incremento de los niveles de IgE total en relación con la gravedad del asma; si bien, dicho incremento no alcanzó significación estadística. No obstante, los autores observaron un porcentaje significativamente mayor de pacientes con IgE sérica total superior a 400 kU/L en el grupo de pacientes con asma grave. En cuanto a los niveles de eosinófilos en sangre periférica, está descrita su asociación con la gravedad del asma [126].

## 6.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA

### 6.2.1. NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

En este estudio hemos identificado una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión del gen *PTGDR* y la presencia de atopia. Este resultado ya había sido identificado previamente por nuestro grupo, y podría indicar el importante

papel del receptor de la prostaglandina D2 en la sensibilización alérgica. *PTGDR* ha sido descrito como un marcador importante de activación mastocitaria [79, 80]. Sin embargo, en este estudio se identifican por primera vez los niveles de expresión de *PTGDR* en sangre periférica en los pacientes con atopía.

Esta asociación se confirma también para los pacientes con asma alérgica y con el grado de asma. Como ya hemos referido, la PGD2 es importante en la patogenia del asma y, por consiguiente, también lo es el receptor de la misma, del que ya hemos mencionado que es un marcador importante de activación mastocitaria [79, 80]. No obstante, resulta interesante mencionar que, si bien los niveles de *PTGDR* aumentan a medida que se incrementa la gravedad del asma, al llegar al asma persistente grave se observa una enorme heterogeneidad. Esta heterogeneidad en los pacientes con asma persistente grave en relación a los niveles de expresión de *PTGDR* se ha observado también para los niveles de IgE y de eosinófilos, lo que podría indicar que estas tres variables podrían tener mayor influencia en los estadios previos de gravedad de asma. Además, esta heterogeneidad del asma grave le confiere una peculiaridad fenotípica que debería ser estudiada en más profundidad.

También hemos hallado una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de *PTGDR* y la presencia de rinitis alérgica. Es la primera vez que se describe esta asociación, que confirma el importante papel de la PGD2 en la patogenia de la rinitis alérgica. Al igual que en el asma, hemos identificado una asociación con los grados más leves de rinitis y, del mismo modo, no encontramos asociación en las formas más graves.

Entre los pacientes con asma alérgica identificamos un incremento significativo de los niveles de *PTGDR* en aquellos con antecedentes familiares de primer grado de atopía y de asma. Es bien conocida, y cuenta con amplio respaldo bibliográfico [127, 128], la relación entre enfermedades atópicas y predisposición genética; sin embargo, no existen estudios previos sobre los antecedentes familiares y los niveles de expresión del gen *PTGDR*. Este resultado refuerza la hipótesis del relevante papel de *PTGDR* en

estos pacientes, que puede explicar en parte el mecanismo molecular que subyace a las asociaciones clínico-biológicas.

### 6.2.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE *PTGDR*

En el análisis de SNP de *PTGDR* identificamos la relevancia de la posición -1289 G>A en la gravedad de asma. Describimos por primera vez un aumento del genotipo mutado AA en los pacientes con grados más graves de asma. Este incremento se relaciona también con una disminución significativa de los valores FEV1/FVC y el incremento el grado de expresión de *PTGDR*. Sin embargo, esta asociación, aunque presentaba un poder estadístico elevado, no pudo confirmarse en la regresión logística ajustada por edad y sexo, por lo que son necesarios más estudios para su confirmación.

En relación al polimorfismo -549 T>C, los pacientes con asma persistente grave fueron más frecuentemente portadores del alelo mutado en homocigosis. Estos resultados, con un elevado poder estadístico, fueron confirmados en la regresión logística ajustada. Este incremento de la frecuencia se acompañó de una disminución significativa de los niveles de FEV1/FVC y un aumento en los niveles de expresión de *PTGDR*, de forma que los pacientes con genotipo CC y asma más grave presentaron mayores niveles de expresión. Cuando se analizó la gravedad de asma agrupando a los pacientes en asma intermitente y persistente leve frente a persistente moderada y grave se confirmó tanto la asociación de la frecuencia genotípica como de los niveles de expresión.

Estos resultados podrían indicar que la presencia del nucleótido C en la posición -549 del promotor del gen *PTGDR* podría modificar el mecanismo de unión de los factores de transcripción, dando lugar a un aumento en la expresión. Esto, de nuevo, podría apoyar la hipótesis de que el aumento en la expresión de *PTGDR* podría estar implicado en el mecanismo inflamatorio que subyace en el asma alérgica en nuestros pacientes.

La asociación de este polimorfismo y el riesgo de asma ya había sido previamente descrita en adultos europeos [82], aunque no fuera replicada en otros estudios [88, 129-132]; si bien, las asociaciones descritas en estos trabajos no se centraban en el asma alérgica. En nuestro caso, hemos llevado a cabo el primer estudio pormenorizado, analizando cada una de las variantes génicas de *PTGDR* en los distintos subfenotipos de asma alérgica. Esto nos ha permitido comprobar un hecho que la comunidad científica plantea hace tiempo sobre la necesidad de analizar la base genética de la patología asmática en cada uno de los subtipos de asma de forma separada, pues parece ser que los antecedentes genéticos pudieran ser distintos para los diferentes subfenotipos clínicos [133-135].

Este resultado explicaría, además, la controversia observada en distintos estudios al no haber tenido en cuenta los subtipos, ni la gravedad del asma, en la selección de los pacientes para los que se llevó a cabo el estudio de la asociación con el SNP -549 T>C. Por otro lado, el hecho de que la asociación sea específica de este grupo de pacientes con asma grave es especialmente interesante, debido al avanzado desarrollo de la patología en estos pacientes y al gran porcentaje de mal control con el tratamiento que presentan. Resulta muy interesante que, aunque en el asma grave los niveles de *PTGDR* fueran más elevados en los pacientes portadores del genotipo CC (debido a la heterogeneidad previamente comentada de este grupo), no se observara un mayor nivel de expresión de este gen en el conjunto de los pacientes con asma grave.

El genotipado previo de este polimorfismo, junto con la detección de los niveles de expresión del gen *PTGDR* en etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad, podría ser un marcador que ayude a caracterizar un grupo específico de pacientes. En este sentido, cabe destacar también que los resultados de este trabajo confirman el papel del polimorfismo -549 T>C como interesante diana terapéutica y que podrían explicar resultados controvertidos reportados en ensayos clínicos realizados con moduladores del receptor.

El polimorfismo -197 T>C se asoció con características de la sensibilización alérgica, como es el caso de la monosensibilización a los ácaros frente a los pólenes, especialmente en los pacientes con rinitis. Esta asociación, además, se confirmó con la regresión logística y podría apuntar a una diferente contribución del componente genético en la sensibilización alérgica.

Curiosamente, describimos por primera vez la asociación del alelo mutado de este polimorfismo con el recuento de eosinófilos, lo que pone de manifiesto, de nuevo, la relevancia de este gen en el mecanismo inflamatorio. Como es conocido, existe un incremento de los eosinófilos en las vías respiratorias los pacientes con asma y con rinitis en respuesta a la activación de linfocitos y la liberación de citocinas [22, 44]. En este caso, la presencia del genotipo homocigoto CC podría condicionar un incremento en la expresión del gen *PTGDR* y, por tanto, una mayor presencia de receptores para la PGD<sub>2</sub>, por lo que se podrían incrementar sus acciones y provocar un incremento de los eosinófilos en sangre periférica. Es decir, la presencia de este polimorfismo en los pacientes nos podría indicar un incremento de los eosinófilos en sangre periférica y, posiblemente, en las vías respiratorias.

Este polimorfismo ha sido descrito previamente por nuestro grupo en pacientes europeos con asma alérgica [86, 130]. Estos resultados no han sido replicados en otras poblaciones, en las que, no solo los pacientes eran de origen étnico distinto, sino que además no se analizaba el asma alérgica [129, 131, 132]. De nuevo, se pone de manifiesto la importancia de los criterios de inclusión y del análisis detallado de los distintos fenotipos de alergia.

## 6.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS DATOS

### 6.3.1. ANÁLISIS GLOBAL

El análisis multivariante de todos los individuos incluidos en el estudio permitió identificar un patrón de agrupación en el cual los pacientes con formas más leves de la enfermedad, como la presencia de rinitis sin asma asociada, se localizarían en una zona más próxima a las formas más leves de la gravedad de asma, como el asma intermitente indicando una tendencia de agrupación de las variables relacionadas con los estadios de gravedad.

Resulta interesante constatar que la introducción de los datos genéticos en el estudio multivariante global no modificó esta disposición, ni supuso una aportación importante, incluso después de ser ponderados. Esto puede poner de manifiesto el carácter complejo de la enfermedad, en la que la aportación de marcadores genéticos aislados puede verse diluida en su carácter multifactorial cuando no están definidos los fenotipos, como es el caso de la población total. Esto refuerza de nuevo la importancia de la caracterización poblacional.

### 6.3.2. PACIENTES CON ASMA ALÉRGICA

Cuando estudiamos de forma específica el grupo de pacientes con asma alérgica se definen las variables con más peso. En una dimensión destacaron fundamentalmente los aspectos terapéuticos, como la prescripción de glucocorticoides inhalados y beta adrenérgicos de acción de larga; mientras que en la otra dimensión destacaron como más informativas las variables relacionadas con el momento de aparición de la enfermedad: el inicio de asma antes o después de los 18 años, la edad de aparición del asma sin categorizar y la presencia de pruebas cutáneas positivas en la infancia.

En este estudio, en el que la población se circunscribe al asma alérgica, resulta muy interesante que las variables más importantes se relacionen con la edad de aparición de la sintomatología, lo cual ha sido recientemente reportado por otros grupos de investigación [136]. En algunos estudios, los 12 años se han considerado como edad de aparición de asma; sin embargo, nuestros resultados han sido más relevantes tomando como edad de aparición los 18 años (edad que caracteriza de forma más clara la edad de comienzo en el adulto).

Finalmente, las variables escalón terapéutico del tratamiento de mantenimiento del asma, clasificación de la gravedad del asma cuando está con el tratamiento y clasificación del asma según la GEMA 2009 pueden considerarse variables de plano por su elevada contribución a ambas dimensiones. Hemos de tener en cuenta que estas variables incluyen ya los criterios diagnósticos y terapéuticos.

Resulta interesante destacar que en el grupo de pacientes con asma alérgica la inclusión de las variables genéticas adquiere algo más de relevancia, ya que en este caso se acentúa la diferenciación entre los pacientes con asma persistente moderada y persistente grave frente a los pacientes con asma intermitente y asma persistente leve, que a su vez se parecen un poco más entre ellas. El efecto de las variables genéticas sobre esta clasificación podría indicar que la relevancia del componente genético se incrementa a medida que se acota la caracterización fenotípica de los pacientes.

### 6.3.3. ESTUDIO DE FENOTIPOS EN EL ASMA ALÉRGICA

El análisis de fenotipos en los pacientes con asma alérgica proporciona una solución de tres *clusters*, en la que el *cluster* número 1 se caracteriza porque los pacientes que forman parte de él presentan, fundamentalmente, un asma intermitente y no tienen, en su gran mayoría, antecedentes familiares de primer grado ni de asma, ni de rinitis,

ni de atopia (pruebas cutáneas para aeroalérgenos positivas). Este grupo podría denominarse asma alérgica leve sin antecedentes familiares.

El segundo de los conglomerados encontrados es el de los pacientes que presentan, todos ellos, antecedentes familiares de atopia (pruebas cutáneas positivas para aeroalérgenos) y, la gran mayoría, antecedentes familiares de primer grado de asma y de rinitis. En las pruebas respiratorias presentan valores dentro de la normalidad y no precisan tratamiento ni con beta-adrenérgicos de acción prolongada, ni con glucocorticoides. Se corresponden con pacientes que se encuentran en escalones terapéuticos bajos del tratamiento del asma, para la mayoría una dolencia intermitente. Este grupo se podría etiquetar como de asma alérgica leve con antecedentes familiares.

Finalmente, el *cluster* 3 se caracteriza por agrupar a la gran mayoría de pacientes con asma persistente moderada y grave, por lo que se encuentran en escalones terapéuticos 3, 4 o superiores, requiriendo tratamiento con beta adrenérgicos de acción prolongada y glucocorticoides inhalados. Estos pacientes presentan una función respiratoria disminuida y carecen, la mayoría de ellos, de familiares de primer grado con antecedentes ni de asma, ni de rinitis. En su mayoría iniciaron su asma con más de 18 años. Este grupo podría recibir el nombre de asma alérgica grave de inicio en la edad adulta.

Curiosamente los antecedentes familiares se centran en el *cluster* 2 en los que podría tener más relevancia los aspectos genéticos y posiblemente la edad de aparición fuese menor aunque la sintomatología no parece tan grave como en el *cluster* 3.

En un meta-análisis reciente sobre caracterización fenotípica del asma se concluye que los pacientes con edad de aparición precoz (en su mayoría menores de 12 años) presentarían más características atópicas y un mayor peso del componente genético, mientras que una edad de aparición mayor se relacionaría con un mayor componente del riesgo ambiental [136].

En nuestro estudio identificamos que el *cluster* 3, en el que la edad de aparición de asma es predominantemente superior a los 18 años, el componente genético también parece menor y, curiosamente, la gravedad de la enfermedad parece ser superior. Este grupo de pacientes, en el que el peso genético es menor, sería más susceptible de beneficiarse de medidas preventivas relacionadas con los factores ambientales. Nuestro estudio, además de realizarse específicamente en pacientes con asma alérgica, aporta una nueva caracterización de la edad de aparición de la sintomatología, en la que la adolescencia se incluye en aparición precoz y que consideramos permite definir mejor a los pacientes.

Nuestro estudio aporta tres *clusters*, en los que el 1 y el 2 que tendrían, ambos, un predominio de pacientes con sintomatología más leve, pero en el que el componente genético podría ser diferencial, centrado más en el *cluster* 2. Resulta muy interesante que en nuestros pacientes el componente genético se centraría más en un subgrupo de pacientes de gravedad intermedia, lo que podría explicar la ausencia de asociación de los niveles de expresión de *PTGDR* en los pacientes con asma más grave (previamente descrita).

En definitiva, este estudio proporciona una nueva caracterización fenotípica del asma alérgica. Si bien se ha tratado ampliamente la caracterización fenotípica del asma, son muy escasos los estudios en los que se analizan fenotipos en asma alérgica.

Moore *et al.* [137] realizan un análisis de *clusters* jerárquico no supervisado y encuentran 5 fenotipos. Al comparar sus resultados con los nuestros, su grupo 4 es el más parecido a nuestro *cluster* 3: ambos presentan antecedentes personales de atopia, tienen valores más bajos de función pulmonar, precisan para su control tratamiento con beta-adrenérgicos de acción prolongada y glucocorticoides inhalados, aunque difieren en la edad de aparición del asma. Por otra parte, nuestros *clusters* 1 y 2 se podrían asemejar a su *cluster* 1, en el sentido de que tienen antecedentes personales de atopia e inicio de la sintomatología asmática en la infancia, presentan valores normales de función pulmonar y los requerimientos terapéuticos son escasos,

si bien en nuestro estudio existe un porcentaje más elevado de individuos que no precisan tratamiento para su control. Sin embargo, los autores no reflejan los antecedentes familiares de atopia, asma o rinitis.

Haldar *et al.* [138] realizan un análisis de *clusters* en tres poblaciones independientes, una procedente de atención primaria y dos procedentes de atención especializada. En conjunto, encuentran cinco *clusters*, pero también describen tres *clusters* en la población procedente de atención primaria y cuatro en la de atención especializada. Nuestros pacientes de los *clusters* 1 y 2 podrían corresponder al *cluster* que denominan “asma benigna”, que tiene escasa sintomatología clínica y valores normales de función pulmonar, si bien el porcentaje de atopia en este grupo es del 64%, por lo que no puede descartarse que al menos una parte de nuestros pacientes pueda corresponder al *cluster* que denominan asma atópica de inicio precoz, en el que el porcentaje de atopia alcanza el 95,1 %. Por otra parte, de los *clusters* derivados del análisis de los pacientes provenientes de atención especializada, el primero de los *clusters*, que denominan “asma atópica de inicio precoz” (grave en este caso) sería el que se asemejaría a nuestro *cluster* 3.

Respecto al estudio que Kim *et al.* llevaron a cabo en Corea [139], nuestros *clusters* 1 y 2 podrían corresponder con los *clusters* C/C', que presentan un porcentaje elevado de antecedentes de atopia, inicio temprano de la sintomatología asmática y valores espirométricos normales mientras que nuestro *cluster* 3 se correspondería con los pacientes atópicos de los *clusters* B/B', que presentan valores espirométricos más bajos.

Considerando los fenotipos de asma grave definidos tanto en la GEMA 4.0 [7] como en la normativa sobre asma grave no controlada [61], nuestro *cluster* 3 podría estar encuadrado en el fenotipo denominado “asma alérgica grave”, por su base atópica, si bien no coincide con la edad de inicio de los síntomas asmáticos.

En definitiva, en este estudio nos hemos centrado en el asma alérgica y hemos encontrado los tres fenotipos anteriormente citados: dos de asma leve, uno de ellos con antecedentes familiares de atopia en el 100 % de los casos y el otro sin

antecedentes familiares de atopia; y un tercero de asma alérgica moderada-grave de inicio predominantemente en la edad adulta.



# 7. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. Aunque en el asma alérgica el recuento de eosinófilos, los niveles séricos de IgE total y el porcentaje de sensibilización a los ácaros se incrementan a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad, solo la sensibilización a ácaros se asocia significativamente incluso con el asma persistente grave. En nuestra población, el asma persistente grave presenta una heterogeneidad en relación con estos marcadores biológicos, hecho que debería estudiarse con más detalle en otras poblaciones.
2. En nuestro estudio observamos un predominio de pacientes sensibilizados a más de un grupo de aeroalérgenos. Estos pacientes presentan niveles de IgE y recuento de eosinófilos más elevados. La sensibilización a un solo grupo de aeroalérgenos se asocia a los grados más leves de asma.
3. Los niveles de expresión del gen *PTGDR* en sangre periférica se asocian de forma general con todas las características de la atopia, incluida la gravedad de la rinitis y del asma. La utilidad de la expresión de *PTGDR* como biomarcador en el asma alérgica parece ser más relevante en los estadios menos graves de la enfermedad.
4. El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la región promotora del gen *PTGDR* permitió identificar que el polimorfismo -549 T>C se asocia con la gravedad de asma, el valor de FEV1/FVC y unos mayores niveles de expresión del gen. El cambio del nucleótido T por C en la posición -549 de la región promotora del gen podría modificar la unión de factores de transcripción, dando lugar a un incremento de su expresión, lo que, a su vez, podría estar implicado en el mecanismo inflamatorio que subyace en el asma alérgica.

5. En el análisis multivariante de los pacientes con asma alérgica, destacan como variables más informativas las relacionadas con la clasificación de la gravedad de asma, con la edad de aparición de los síntomas y con el tratamiento.
6. En el asma alérgica identificamos 3 *clusters* determinados fundamentalmente por la gravedad de la enfermedad, la edad de aparición de la sintomatología y la presencia de antecedentes familiares.
7. En nuestros pacientes con asma alérgica caracterizamos 3 fenotipos que podrían denominarse “asma alérgica leve con antecedentes familiares”, “asma alérgica leve sin antecedentes familiares” y “asma alérgica moderada-grave de inicio en el adulto”.
8. En el asma alérgica solo uno de los fenotipos presentó predominio de antecedentes familiares, lo que podría poner de manifiesto que los factores genéticos tienen una contribución compleja en la enfermedad, que se manifiesta con más relevancia en el inicio a edades más tempranas y en los grados más leves de la enfermedad.

# 8. BIBLIOGRAFÍA



## REFERENCIAS

1. Johansson SG, et al., Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113(5):832-836.
2. Jones CA, et al., Does atopic disease start in fetal life? *Allergy* 2000, 55(1):2-10.
3. Blackley CH, *Experimental researches on the causes and nature of catarrhusaestivus*. London: Tindal & Cox, 1873.
4. Pepys J, Skin testing. *Br J Hosp med* 1975, 14:412-416.
5. Dreborg S, Skin test used in type I allergy testing Position paper. Subcommittee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989, 44(Suppl. 10):1-59.
6. Alamar Martínez R, et al., Prick-test en el diagnóstico de alergia cutánea. *Formación Dermatológica* 2012, 17:23-33.
7. *GEMA 4.0 Guía española para el manejo del asma. 2014*. FENAER, GRAP, SEAIC, SEFAC, SEFC, SEICAP, SEMERGEN, SEMES, semFYC, SEMG, SENP, SEORL, SEPAR, SEPEAP.
8. Martínez Quesada J, El papel del laboratorio en el diagnóstico de la alergia. *Ed Cont Lab Clín* 2006, 10:13-21.
9. Torres Borrego J and M Fontán Domínguez, Pruebas diagnósticas en Alergología Pediátrica. *Protoc Diagn Ter Pediatr* 2013, 1:185-205.
10. Miguères 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.

11. Ciprandi G and I Cirillo, Monosensitization and polysensitization in allergic rhinitis. *Eur J Intern Med* 2011, 22:e75-e79.
12. Martín Mateos MA (Coord.), *Guía de tratamiento de la dermatitis atópica en el niño*. Documento de Consenso Grupo de Expertos. 2ª edición (2011).
13. Seite S and T Bieber, Barrier function and microbioticdysbiosis in atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2015, 8:479-83.
14. Bieber T, Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010, 22(2):125-137.
15. Breninkmeijer EE, et al., Diagnostic criteria for atopic dermatitis: a systematic review. *Br J Dermatol* 2008, 158(4):754-765.
16. Bousquet J, et al., Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008, 63(Suppl. 86):8-160.
17. Valero A, et al., A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. *J Allergy Clin Immunol* 2007, 120(2):359-365.
18. Navarro A, et al. (Rhinoconjunctivitis Committee of the SEAIC), Epidemiology of allergic rhinitis in allergy consultations in Spain: Alergológica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009, 19(Suppl. 2):7-13.
19. Bjorksten B, et al., Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2008, 19(2): 110-24.
20. Osguthorpe JD, Pathophysiology of and potential new therapies for allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2013, 3(5):384-392.
21. Poole JA and LJ Rosenwasser, The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005, 5(3):252-258.
22. Prussin C and CC Metcalfe, 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117(2 Suppl. Mini-Primer):S450-456.

23. Salib R and P Howarth, Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy* 2003, 33(12):1629-1633.
24. Mullol i Miret J and A Valero Santiago, Manejo de la rinitis alérgica, rinosinusitis y poliposis nasal. En: *Actualización en Patología Inflamatoria Nasosinusal* (Mullol i Miret, et al. eds.). 2010, pp.5-36.
25. Rodríguez-Rodríguez M, et al., Protocolo diagnóstico del asma. *Medicine* 2013, 11(29):1829-1834.
26. Chung KF, et al., International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014, 43:343-373.
27. Trisán Alonso A, Documento de consenso sobre asma grave ATS/ERS. *Rev Patol Respir* 2014, 17(Supl.1):S75.
28. GINA 2014. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Global INitiative for Asthma 2014.
29. Urrutia I, et al., Cambios en la prevalencia de asma en la población española del Estudio de Salud Respiratoria de la Comunidad Europea (ECRHS-II). *Arch Bronconeumol* 2007, 43(8):425-430.
30. Bjornson CL and I Mitchell, Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J. Gend Specif Med* 2000, 3:57-61.
31. Lethbridge-Çejku M, et al., Summary Health Statistics for U.S. Adults: National Health Interview Survey, 2002. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat* 2004, 10(222):1-151.
32. Blackwell DL, et al., Summary Health Statistics for U.S. Adults: National Health Interview Survey 2012. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat* 2014, 10(260):1-161.
33. Beuther DA, et al., Obesity and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174(2):112-119.
34. Been JV, et al., Preterm birth and childhood wheezing disorders: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2014, 11:e1001596.

35. Dezateux C, et al., Impaired airway function and wheezing in infancy: the influence of maternal smoking and a genetic predisposition to asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159(2):403-410.
36. Gdalevich M, et al., Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J Pediatr* 2001, 139(2):261-266.
37. Devereux G and A Seaton, Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115(6):1109-1117.
38. Sigurs N, et al., Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* 2010, 65(12):1045-1052.
39. Stein RT, et al., Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999, 354(9178):541-545.
40. Brooks C, et al., The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013, 13(1):70-77.
41. de Meer G, et al., Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy* 2005, 60(5):619-625.
42. Levine SJ and SE Wenzel. Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Ann Intern Med* 2010, 152(4): 232-237.
43. Lloyd CM and EM Hessel, Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 2010, 10:838-848.
44. Rosenberg HF, et al., Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013, 13:9-22.
45. Galli SJ and M Tsai, IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012, 18:693-704.
46. Macdowell AL and SP Peters, Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007, 7(6):464-468.

47. Lambrecht BN and H Hammad, The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 2010, 376:835-843.
48. Scanlon ST and AN McKenzie, Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Curr Opin Immunol* 2012, 24(6):707-712.
49. Bernink JH, et al., The role of ILC2 in pathology of type 2 inflammatory diseases. *Curr Opin Immunol* 2014, 31:115-20.
50. Barnes PJ, et al., Exhaled nitric oxide pulmonary disease: a comprehensive review. *Chest* 2010, 138:682-692.
51. Al-Muhsen S, et al., Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 128:451-462.
52. Grainge CL, et al., Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 2011, 364:2006-2015.
53. Koziol-White CJ and RA Jr. Panettieri, Airway smooth muscle and immunomodulation in acute exacerbations of air way disease. *Immunol Rev* 2011, 242:178-185.
54. O'Byrne PM and MD Inman, Airway hyperresponsiveness *Chest* 2003, 123:411S-416S.
55. Wenzel SE, Complex phenotypes in asthma: current definitions. *EPulm Pharmacol Ther* 2013, 26(6):710-715.
56. Wenzel SE, Asthma Phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012, 18:716-725.
57. Wenzel SE, Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006, 368(9537):804-813.
58. Quirce Gancedo S, *Fenotipos en el asma*. Monografías de Neumología. Hacia un mejor control de la enfermedad asmática. <<http://www.neumologiaysalud.es/descargas/M6/M6-2.pdf>>

59. Anderson GP, Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* 2008, 372:1107-1119.
60. Lötvall J, et al., Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J. Allergy Clin Immunol* 2011, 127(2):355-360.
61. Cisneros Serrano C, et al., Normativa sobre asma grave no controlada. *Arch Bronconeumol* 2015; 51(5):235-246.
62. Postma DS, et al., Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness co inherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995, 333(14):894-900.
63. Moffatt MF, et al., A large-scale, consortium-based genome wide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010, 363(13):1211-1221.
64. Daley D, et al., Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2012, 130(6):1284-1293.
65. Rogers AJ, et al., Assessing the reproducibility of asthma candidate gene associations, using genome-wide data. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 179(12):1084-1090.
66. Bégin P and KC Nadeau, Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2014, 10(1):27.
67. Isidoro-García M, et al., Interactions between genes and the environment. Epigenetics in allergy. *Allergol Immunopathol (Madrid)* 2007, 35(6):254-258.
68. Kabesch M, Epigenetics in asthma and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2014, 14(1):62-68.
69. Razin A, CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J* 1998, 17(17):4905-4908.

70. Kwon NH, et al., DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol* 2008, 28(2):139-146.
71. Pascual M, et al., Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma. *Epigenetics* 2011, 6(9):1131-1137.
72. Breton CV, et al., DNA methylation in the ARG-NOS pathway is associated with exhaled nitric oxide in asthmatic children. *Amer J Resp Crit Care Med* 2011, 184(2):191-197.
73. Weissmann F and F Lyko, Cooperative interactions between epigenetic modifications and their function in the regulation of chromosome architecture. *BioEssays* 2003, 25(8):792-797.
74. Lu TX and ME Rothenberg, Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013, 132(1):3-13.
75. Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, 294(5548):1871-1875.
76. Boie Y, et al., Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* 1995, 270(32):18910-18916.
77. Pettipher R, et al., Antagonism of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6(4):313-325.
78. Bochenek G, et al., Plasma 9alpha, 11beta-PGF2, a PGD2 metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. *Thorax* 2004, 59(6):459-464.
79. O'Sullivan S, On the role of PGD2 metabolites as markers of mast cell activation in asthma. *Acta Physiol Scand Suppl* 1999, 644:1-74.
80. Dahlén SE and M Kumlin, Monitoring mast cell activation by prostaglandin D2 in vivo. *Thorax* 2004, 59(6):453-455.
81. Narumiya S, et al., Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999, 79(4):1193-1226.

82. Oguma T, et al., Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med* 2004, 351:1752-1763.
83. Isidoro-García M, et al., PTGDR gene in asthma: a functional, genetic and epigenetic study. *Allergy* 2011, 66(12):1553-1562.
84. Matsuoka T, et al., Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000, 287:2013-2017.
85. Bos CL, et al., Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(7):1187-1205.
86. Sanz C, et al., A new PTGDR promoter polymorphism in a population of children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2009, 20:151-156.
87. Lee YH, et al., PTGDR polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013, 40(3):2195-2203.
88. *GEMA 2009. Guía Española para el Manejo del Asma. 2009.* FENAER, GRAP, SEAIC, SEFAC, SEFC, SEICAP, SEMERGEN, SEMES, semFYC, SEMG, SENP, SEORL, SEPAR, SEPEAP.
89. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Skin tests used in type I allergy testing Position paper. *Allergy* 1989, 44(Suppl. 10):1-59.
90. Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC), Comité de Enfermería de la SEAIC. *Protocolo de espirometría forzada.* 2012, 19 pp.
91. Serrano C, et al., Óxido nítrico nasal. *Arch Bronconeumol* 2004, 40(5):222-230.
92. Giaid A and D Saleh. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995, 333(4):214-221.
93. Kobzik L, et al., Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 9:371-377.

94. American Thoracic Society and European Respiratory Society, ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171(8):912-930.
95. Yates DH, et al., The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 1996, 9(6):1130-1133.
96. Kharitonov SA, et al., Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:609-612.
97. Kharitonov SA, et al., Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153:454-457.
98. Dweik RA, et al., An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 184(5):602-615.
99. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), Comité de Enfermería de la SEAIC. *Protocolo de provocación bronquial inespecífica*. 2014, 16 pp.
100. Wagener AH, et al., External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax* 2015, 70(2):115-120.
101. Livak KJ and TD Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001, 25:402-408.
102. Patton S and S Stenhouse, *Draft Best Practice Guidelines for Laboratory Internal Quality Control*. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), 2002 <[http://www.genetics.ie/emqn/IQC\\_eu.pdf](http://www.genetics.ie/emqn/IQC_eu.pdf)>
103. Wacholder S, et al., Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96(6):434-442.

104. Fleiss JL, et al., *Statistical Methods for Rates and Proportions* (Segunda Edición, 1981, John Wiley & Sons, NY, capítulo 3).
105. Tomalá Robles JE, *Evaluación de la Calidad y Nivel de Satisfacción de los Servicios Básicos en la parroquia Letamendi de la ciudad de Guayaquil*. Tesis de Grado. Instituto de Ciencias Matemáticas, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil (Ecuador). 2002.
106. Abad J, et al., Análisis de correspondencias simples y múltiples. En: *Análisis Multivariable para las Ciencias Sociales* (Lévy Mangin JP and Varela Mallou J, coords.). Pearson Educación (Prentice Hall), Madrid, 2003, pp.361-416.
107. Gifi A, *Nonlinear Multivariate Analysis*. Wiley, New York-NY, 1990.
108. Ledesma RD, et al., *Análisis de Homogeneidad en ViSta*, «*The Visual Statistics Systems*». 2005 <<http://www.mdp.edu.ar/psicologia/vista/Using-HOMALS.PDF>>
109. Everitt B, *Cluster analysis*. Wiley, Chichester, UK. 2011.
110. Serrano-Pariente J, et al., Identification and characterization of near-fatal asthma phenotypes by cluster analysis. *Allergy* 2015, 70(9):1139-1147.
111. Siroux V, et al., Identifying adult asthma phenotypes using a clustering approach. *Eur Respir J* 2011, 38:310-317.
112. del Cuvillo A, et al., Validation of ARIA duration and severity classifications in Spanish allergic rhinitis patients – The ADRIAL cohort study. *Rhinology* 2010, 48(2):201-205.
113. Jáuregui I, et al., Validation of ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) classification in a pediatric population: the PEDRIAL study. *Pediatr Allergy Immunol* 2011, 22(4):388-392.
114. Pereira C, et al., Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006, 38(6):186-194.
115. Valero A, et al., Interrelationship between skin sensitization, rhinitis, and asthma in patients with allergic rhinitis: a study of Spain and Portugal. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009, 19(3):167-172.

116. Pellegrino R, et al., Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005, 26(5):948-968.
117. Kitch BT, et al., A single measure of FEV1 is associated with risk of asthma attacks in long-term follow-up. *Chest* 2004, 126:1875-1882.
118. Lim KG and C Mottram, The use of fraction of exhaled nitric oxide in pulmonary practice. *Chest* 2008, 133(5):1232-1242.
119. Jia G, et al., Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma (BOBCAT) Study Group. J Allergy Clin Immunol* 2012, 130(3):647-654.
120. Berry MA, et al., The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 2005, 35:1175-1179.
121. Wagener AH, et al., External validation of blood eosinophils, FE(NO) and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax* 2015, 70(2):115-120.
122. Peat JK, et al., Asthma severity and morbidity in a population sample of Sydney schoolchildren: Part II – Importance of house dust mite allergens. *Aust N Z J Med* 1994, 24(3):270-276.
123. Olaguibel JM, et al., Measurement of asthma control according to Global Initiative for Asthma guidelines: a comparison with the Asthma Control Questionnaire. *Respir Res* 2012, 13:50.
124. Fasce L, et al., The natural history of allergy: the development of new sensitisations in asthmatic children. *Immunol Lett* 2004, 93:45-50.
125. Dávila I, et al., Relationship between serum total IgE and disease severity in patients with allergic asthma in Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015, 25(2):120-127.
126. Koshak EA and OS Alamoudi, Do eosinophil counts correlate differently with asthma severity by symptoms versus peak flow rate? *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999, 83(6 Pt 1):567-571.

127. Chatila TA, Genetics of atopic diseases. *Curr Opin Pediatr* 1998, 10(6):584-587.
128. Heinzmann A and KA Deichmann, Genes for atopy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001, 1(5):387-392.
129. Tsai YJ, et al., Genetics of Asthma in Latino Americans Study; Study of African Americans, Asthma, Genes and Environments Investigators. The PTGDR gene is not associated with asthma in 3 ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118(6):1242-1248.
130. Sanz C, et al., Promoter genetic variants of prostanoid DP receptor (PTGDR) gene in patients with asthma. *Allergy* 2006, 61(5):543-548.
131. Li J, et al., Lack of association between three promoter polymorphisms of PTGDR gene and asthma in a Chinese Han population. *Int J Immunogenet* 2007, 34(5):353-357.
132. Jamrozik EF, et al., Functional haplotypes in the PTGDR gene fail to associate with asthma in two Australian populations. *Respirology* 2011, 16(2):359-366.
133. Binia A and M Kabesch M, Respiratory medicine – genetic base for allergy and asthma. *Swiss med Weekly* 2012, 142:1-11.
134. Ober C and TC Yao, The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011, 242(1):10-30.
135. Sanz Lozano C, et al., *Methods in Molecular Biology. Molecular Genetics in Asthma*. Springer Science Business Media Springer. In press.
136. Tan DJ, et al., Age-of-asthma onset as a determinant of different asthma phenotypes in adults: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Expert Rev Respir Med* 2015, 9(1):109-123.
137. Moore WC, et al., Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 181(4):315-323.
138. Haldar P, et al., Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 178(3):218-224.

139. Kim TB, et al., Identification of asthma clusters in two independent Korean adult asthma cohorts. *Eur Respir J* 2013, 41(6):1308-1314.



# APÉNDICE I



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

Nº LABORATORIO:

Nº SUERO:

FECHA:

Nº HISTORIA:
EDAD:
SEXO: V / M

DOCTOR:

CONTROL:  SI  
 NO

ESTUDIO:  β-Lactámicos  
 AINE

ASMA  
 POLIPOSIS

PRUEBAS CUTÁNEAS:

<input type="checkbox"/> Negativas	<input type="checkbox"/> Ácaros	<input type="checkbox"/> Hongos	<input type="checkbox"/> Alimentos
<input type="checkbox"/> Pendientes	<input type="checkbox"/> Epitelios	<input type="checkbox"/> Pólenes	<input type="checkbox"/> Otros.....

ASMA:  NO  SI

RINITIS:  NO  SI

Intermitente   
Leve   
Persistente Moderada   
Grave

Intermitente Leve   
Moderada-Grave   
Persistente Leve   
Moderada-Grave

EDAD APARICION ASMA:

EDAD APARICION RINITIS/CONJUNTIVITIS:

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

FAMILIARES: MADRE ATOPIA  MADRE ASMA

INTOLERANCIA AINES: NO  SI:  Respiratoria  
 Cutánea

POLIPOSIS:  SI  
 NO

INMUNOTERAPIA: SI  NO  Especificar:

IgE TOTAL:

OBSERVACIONES:



<b>FUMADOR</b>	SI	NO	<b>FUMADOR PASIVO INFANCIA</b>				SI	NO
<b>ASMA EN LA INFANCIA</b>	SI	NO	<b>ATOPIA (PC POSITIVAS) INFANCIA</b>				SI	NO
<b>ESPIROMETRIA</b>	SI	NO	<b>IMC</b>					
<b>VALORES DE</b>								
FVC			ABSOLUTO			%		
FEV1			ABSOLUTO			%		
FEV1/FVC						%		
FEF25-75			ABSOLUTO			%		
<b>PRUEBA BRONCODILATADORA</b>			NO	NEGATIVA		POSITIVA		
<b>FENO</b>	NO		ABSOLUTO	< 30 PPB		>30 PPB		
<b>TEST METACOLINA</b>	NO	NEGATIVO	POSITIVA	(VALOR ABSOLUTO)				
<b>EOSINOFILOS EN SP</b>	ABSOLUTO		%					
<b>GRADO DE POLIPOSIS</b>		I/II/III	<b>ANT. CIRUGIA POLIPOSIS</b>			NO	SI	
<b>ASA TRIADA</b>			NO			SI		
<b>TIPO INMUNOTERAPIA</b>		ACAROS	EPITELIOS	HONGOS	POLENES			
<b>ESCALON TERAPEUTICO</b>		1	2	3	4	5	6	
<b>B-ADREN A CORTA</b>	NO (< DE 2 DIAS SEMANA)			+2 DIAS SEMANA NO A DIARIO				
	TODOS LOS DIAS			VARIAS VECES AL DIA				
<b>GCI (especificar fármaco y dosis)</b>							NO/SI	
<b>B-ADRE A LARGA (especificar fármaco y dosis)</b>							NO/SI	
<b>CORTICOIDES ORALES</b>							NO/SI	
<b>ANTILEUCOTRIENOS</b>							NO/SI	
<b>TEOFILINA</b>							NO/SI	
<b>OMALIZUMAB</b>							NO/SI	
<b>CLASIFICACION CONTROL ASMA</b>			BIEN	PARCIALMENTE		MAL		
<b>ASISTENCIA URG EN ULTIMO AÑO</b>		NO	1	2	3	4		
<b>INGRESO HOSPITAL ULTIMO AÑO</b>		NO	1	2	3	4		





