



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MEDICAS ODONTOLOGICAS Y DE LA
SALUD**

Asociación genética de polimorfismos en genes
relacionados a inflamación con la susceptibilidad a
desarrollar Enfermedad Respiratoria Exacerbada por
Aspirina (EREA)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A

GANDHI FERNANDO PAVÓN ROMERO

TUTORES DE TESIS:

DR. LUIS MANUEL TERAN JUÁREZ DR. RAMCÉS FALFÁN-VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITE TUTOR: DR. JUAN JOSE CALVA MERCADO DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

ENERO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Dios por permitirme estar con Ustedes.

Al Programa de Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud de la Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de concluir mi objetivo profesional.

Al CONACYT por ayudarme económicamente durante mi formación como Maestro en Ciencias.

Al Dr. Luis M. Terán por su apoyo incondicional y por haberme enseñado la pasión por la investigación clínica-básica.

Al Dr. Ramcés Falfan por sus valiosas aportaciones durante mi formación profesional, pero sobre todo por darme la oportunidad de ser su amigo.

A mis amigos (que afortunadamente son muchos) que han convivido conmigo en el Departamento de Investigación en Inmunogenética y Alergia así como los del Laboratorio de HLA.

A mi familia Aurorita y Amélie por toda la comprensión y ayuda en estos años, pero sobre todo por todo su amor incondicional hacia mí. Muchas gracias.

A mis abuelos por sus consejos, a mis padres por su apoyo, a mis hermanos por darme ánimos cuando los días estaban nublados y las noches eran muy largas.

Índice	Página
Abreviaturas	III
1.0 Resumen	1
2.0 Abstract	3
3.0 Introducción	5
3.1 Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina	5
3.2 Fisiopatología de la EREA	8
4.0 Antecedentes genéticos en EREA	9
5.0 Planteamiento del problema	17
6.0 Justificación	18
7.0 Hipótesis	19
8.0 Objetivos	20
8.1 Objetivo general	20
8.2 Objetivo particular	20
9.0 Materiales y métodos.	21
9.1 Tipo de estudio	21
9.2 Tamaño de la muestra	21
9.3 Población de estudio	21
9.4 Definición de casos y controles	22
9.4.1 Definición de caso (EREA)	22
9.4.2 Definición de control relacionado a EREA (asma)	22
9.4.3 Definición de control no relacionado a EREA y Asma	22
9.5 Criterios de inclusión	22
9.6 Criterios de exclusión	22
9.7 Criterios de eliminación	22
9.8 Reto nasal con lisin aspirina	23
9.9 Reto con metacolina	25
9.10 Pruebas cutáneas	26
9.11 Extracción de ADN	27
9.12 Selección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	28
9.13 Genotipificación por TaqMan	28
9.14 Análisis estadístico	29
9.15 Aspectos éticos y legales	29
10.0 Resultados	30
10.1 Características clínicas de los sujetos de estudio	30
10.2 Discriminación alélica variantes tipo SNP	30
11.0 Discusión	35
12.0 Conclusión	40
13.0 Bibliografía	41
14.0 Anexos	47

Abreviaturas empleadas

AA	Ácido araquidónico
5-LO	5 lipooxigenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Asma con intolerancia a la aspirina
AINES	Analgésico inflamatorio no esteroideo
ALOX5	Araquidonato 5-lipoxigenasa
ANX4	Anexina A4
ASA	Ácido acetil salicílico
ATA	Asma tolerante a la aspirina
CACNG6	Gen de canal de calcio dependiente de voltaje subunidad gamma 6
CCR3	Receptor para quimiocina 3
COX	Ciclooxigenasa
CRTH2	Receptor quimioatrayente expresado en células Th2
CVF	Capacidad vital forzada
CYSLTR1	Cystenil leucotrieno tipo 1
CYSLTR2	Cystenil leucotrieno tipo 2
DDR	Discoidin domain receptor (Receptor dominio discoidina)
ELAM-1	Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (Molécula de adhesión leucocito endotelial tipo 1)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima)
EP2	Receptor para prostaglandina E2
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPOS	European Position Paper of Primary Care Diagnosis and Management of Rhinosinusitis and Nasal Poliposis
EREA	Enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina
FcεR1b	Receptor de alta afinidad para Ig E
FLAP	Proteína activadora de 5 lipooxigenasa
FNT	Flujo nasal total
GA2LEN	Global Allergy and Asthma European Network
GINA	Global initiative for control asthma
HLA	Human leukocyte antigen (Antígeno leucocitario humano)
HT	Haplotipo
IAPA	Intolerancia a la aspirina poliposis y asma
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule type 1(Molécula de adhesión intracelular tipo 1)
IL-17A	Interleucina 17A
IL-1R	Receptor para interleucina 1

IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL8R	Receptor para interleucina 8
LT	Leucotrienos
LTA4	Leucotrieno A4
LTA4H	Leucotrieno A4 hidrolasa
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTC4S	Leucotrieno C4 sintasa
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MAF	Frecuencia del alelo menor
OR	Odds Ratio (Razón de momios)
PgD2	Prostaglandina D2
pLTs	Péptido leucotrienos
PTGS2	Prostaglandina endoperóxido sintasa 2
RGS7BP	Regulator of G-protein signaling 7 binding protein
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
TBX	Tromboxano
TBXA2R	Receptor para tromboxano A2
TBXAS1	Tromboxano Sintasa
TFAP2A	Factor de transcripción AP2A
TLR3	Receptor tipo Toll 3
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UIA	Urticaria inducida por aspirina
VEF1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
ZNRD1	Zinc ribbon domain containing 1

1.0 Resumen

En 1922 describe los primeros reportes de hipersensibilidad a la aspirina, posteriormente en 1968 Ray Beer y Max Samter asocian esta reacción en pacientes con asma y poliposis nasal, estableciendo las características epidemiológicas clínicas e inmunológicas generales de la enfermedad, en 1990 Szczeklik propone la teoría del mecanismo fisiopatológico de la intolerancia a la aspirina, el cual comprende la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa por analgésicos no esteroideos induciendo al desvío metabólico hacia la vía de la lipooxigenasa, promoviendo la síntesis de leucotrienos, en específico de LTC₄, el cual se sobreexpresa de manera importante en los eosinófilos y los mastocitos de la mucosa respiratoria de los pacientes con intolerancia a la aspirina y que está cuatro veces más aumentada en comparación con los pacientes que no presentan esta condición, cuando se analiza lavado bronquioalveolar y diez veces más cuando se compara a nivel urinario con la consiguiente depleción de prostaglandinas, así como el decremento en las medidas de función pulmonar y nasal posterior a las pruebas de provocación con aspirina. Actualmente la tendencia de las investigaciones de asociación genética en esta patología se han enfocado en el estudio de los polimorfismos de los genes que están implicados en la síntesis de leucotrienos, esto debido a la plausibilidad biológica involucrada en la patogénesis de la EREA, sin embargo esta comprende otras enfermedades, como el asma, la rinitis y la poliposis nasal, las cuales son patologías inflamatorias donde la participación de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 están asociadas con la frecuencia y en algunos casos con la severidad de estos padecimientos.

El objetivo del presente estudio fue establecer la asociación genética entre los polimorfismos de *TNF* (rs1800629 G→A, rs361525 G→A), *IL1B* (rs16944G→A), *IL8* (rs4073 A→T), *IL6* (rs1818879A→G) en pacientes con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA), comparándolos con un grupo de pacientes asmáticos y sujetos control sanos.

Se incluyeron 75 pacientes mestizos mexicanos con EREA fenotipificados mediante reto nasal con lisin aspirina positivo, 134 pacientes con asma mediante reto con metacolina positivo y reto nasal con lisin aspirina negativo y 135 sujetos voluntarios con reto con metacolina negativo y reto nasal con lisin aspirina negativo que conformaron el grupo control. La muestra de ADN se extrajo a partir de sangre venosa por medio del kit comercial DBtrack, se utilizó el ensayo de 5' exonucleasa para la amplificación y detección de alelos específicos en las muestras de DNA genómico purificado, cada ensayo TaqMan el cual contuvo 2 cebadores para la amplificación de la secuencia de interés y 2 sondas TaqMan para la detección de los alelos, lo que permitió determinar el genotipo de los 2 posibles alelos. El ensayo tuvo la capacidad de determinar la presencia o ausencia de un SNP basado en el cambio de la fluorescencia asociada a las sondas, ya que se encuentran marcadas con un fluoróforo en el extremo 5' (VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2).

Los grupos se comportaron de acuerdo a lo establecido en los criterios de inclusión fueron significativamente diferentes entre si de acuerdo a las medidas de función pulmonar en el reto con meta colina y lisina aspirina ($p < 0.001$); con respecto al análisis genético se demostró en los 3 grupos de comparación solo se encontró asociación estadísticamente significativa cuando se

comparó las frecuencias alélicas del rs16944 (*IL1*), el alelo A entre el grupo EREA (44.87%) vs asma (32.59%), $p=0.015$, OR: 1.68 IC95% 1.10-2.58, el otro SNP donde se reporta asociación es con el alelo A del rs181879, pero solo al comparar los grupos asma vs controles (62.59% vs 71.26%), $p=0.04$, OR: 1.48 e IC95% (1.02 - 2.16). A nivel de genotipos solo se mantiene la asociación con el rs16944 (*IL1*) en la comparación de los grupos ya mencionados con el homocigoto AA, $p = 0.018$, OR = 2.98 IC = 95% (1.17 - 7.82)

El presente estudio establece una asociación al riesgo del genotipo AA en los pacientes con EREA casi de 3 veces más en comparación con los pacientes que padecen asma. Resulta deseable realizar trabajos de expresión para los productos que codifican este gen, en sitios directos de afección como tejido nasal y pulmonar con el objetivo de correlacionar con la enfermedad.

2.0 Abstract

In 1922 Widal described the first reports of hypersensitivity to aspirin; afterward in 1968 Ray Beer and Max Samter linked this reaction in patients with asthma and nasal polyposis, establishing the clinical, epidemiological and immunological disease. In 1990 Szczeklik proposed the pathophysiological mechanism of aspirin intolerance, which comprises cyclooxygenase pathway inhibition by non-steroidal analgesic, inducing metabolic diverted towards lipoxygenase pathway, promoting the synthesis of leukotrienes specifically LTC₄, this is highly overexpressed in eosinophils and mast cells of the respiratory mucosa of patients with aspirin intolerance and it is increased four folds in comparison with patients without this condition in bronchoalveolar lavage and ten times when compared in urine with subsequent prostaglandin depletion and the decrease in lung function measures after nasal provocation tests with aspirin. Currently the tendency of the genetic association research in this disease have focused on the study of gene polymorphisms that are involved in the synthesis of leukotrienes, this due to the biological plausibility involved in the pathogenesis of AERD, however the AERD diseases comprising asthma, rhinitis and nasal polyposis, which are inflammatory diseases where participation of cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 are associated with the frequency and in some cases the severity of this condition.

The objective of this study was to establish the genetic association between *TNF* polymorphisms (rs1800629 G→A, rs361525 G→A), *IL1B* (rs16944 G→A), *IL8* (rs4073 A→T), *IL6* (rs1818879 A→G) in patients with aspirin exacerbated respiratory disease (AERD), compared with a group related to the AERD (asthma) and control subjects.

75 AERD patients were included, classified by nasal challenge with positive aspirin lysine, 134 patients with asthma using positive methacholine test and negative nasal challenge with lysine aspirin and 135 volunteers without asthma through negative methacholine test and negative nasal challenge with lysine aspirin, as a control group. The DNA sample was extracted from venous blood using a commercial, it was used 5' exonuclease assay for the amplification and detection of specific alleles in samples of purified genomic DNA, each TaqMan assay which contained 2 primer for the amplification of the sequence of interest and 2 TaqMan probes for the detection of alleles, allowing to determine the genotype of the 2 possible alleles. The assay was able to determine the presence or absence of an allele based on the change in fluorescence associated with the probes, since they are marked with fluorescence at the 5' tail (VIC for allele 1 and FAM for allele 2).

The groups behaved in accordance with the provisions of the inclusion criteria were significantly different from each other according methacholine challenge and nasal challenge with lysine aspirin ($p < 0.001$), respect to genetic analysis in the 3 comparison groups only detected statistically significant association when comparing the allele frequencies of rs16944 (*IL1B*), the A allele between AERD group (44.87%) vs asthma (32.59%), $p = 0.015$, OR= 1.68, 95% CI (1.10-2.58), the other SNP where it was reported association was with the A allele of rs181879, but only between the contrast of asthma vs voluntary groups (62.59% vs 71.26%), $p = 0.04$, OR= 1.48, 95% CI (1.02 - 2.16).

In the genotype analysis, maintaining the association of rs16944 (*IL1B*) in the comparison between the aforementioned groups with homozygous AA, $p = 0.018$, OR = 2.98 95% CI = (1.17 - 7.82).

This study establishes an association to risk *IL1B* rs16944 AA genotype with AERD almost 3 folds higher than asthma patients. With these results is desirable to perform assays that codified this gene in direct site as nasal and lung tissue in order to correlate with the disease.

3.0 Introducción.

3.1 Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina.

Tres años después del ingreso de la aspirina al mercado farmacéutico en 1899, se presentaron reportes aislados de casos asociados a complicaciones respiratorias ¹. En 1922 los doctores Fernand Widal, Pierre Abrami y J. Lermoyez describen los primeros reportes que involucran a pacientes con hipersensibilidad a la aspirina y anafilaxia ². Posteriormente en 1968 Ray Beer y Max Samter estudian a una población de pacientes con asma, poliposis nasal e intolerancia a la aspirina, en el colegio de medicina de Chicago, estableciendo las características epidemiológicas clínicas e inmunológicas generales de la enfermedad ³, siendo conocida a partir de este momento con el epónimo de síndrome de Samter, sin embargo durante la segunda década del siglo XX recibe otros nombres como asma inducida por aspirina, sensibilidad a ácido acetil salicílico o asma intolerante al ácido acetil salicílico ⁴.

A partir de ese momento se editan algunos reportes de tipo epidemiológico y diagnóstico, no obstante la diversidad de tipos de estudio, las poblaciones utilizadas, la variación en las definiciones empleadas por los investigadores y los métodos que se utilizaron para determinar la sensibilidad a la aspirina fueron componentes que posiblemente afectaron la validez externa de sus protocolos. Tomando en cuenta estos factores, en 2004 Christine Jenkins, John Costello y Linda Hodge realizan la primera revisión sistemática con el objetivo de realizar el análisis de prevalencia de esta entidad, evaluando 66 artículos publicados entre 1966 y 2002 en diversas bases, solo 21 fueron considerados por su calidad metodológica, demostrando que la prevalencia global del asma inducida por aspirina en adultos era del 21% ⁵.

A principios de la década de los 90 del siglo XX el Dr. Andrew Szczeklik propone la teoría del mecanismo fisiopatológico de la intolerancia a la aspirina que comprende la inhibición de la vía de la ciclooxigenasa tipo 2 en el metabolismo del ácido araquidónico, con la consiguiente depleción

de prostaglandinas y consecuente incremento de leucotrienos ⁶. Este concepto es validado por Christie P, Tagari P y Lee T. en 1992 en el centro de investigación de alergia y asma en Suiza, al corroborar el aumento de los niveles de leucotrienos (E4y C4) a nivel pulmonar y urinario así como a la disminución de la función pulmonar posterior al reto con aspirina ⁷⁻⁸.

El propio Dr. Szczeklik en el año 2000 en Europa y Donald Stevenson en 2002 en Estados Unidos de América, por separado realizan las primeras investigaciones que describen la secuencia de eventos patológicos que conforman a esta enfermedad estableciendo los grupos de investigación líderes en el estudio de esta entidad patológica ⁹⁻¹⁰. Es así que en 2003 ambas escuelas establecen el concepto de Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina (EREA) (cuyo nombre en inglés corresponde a *Aspirin Exacerbated Respiratory Disease, AERD*), considerando que el término describe de mejor manera el proceso inflamatorio de la vía aérea, la exacerbación del asma y la rinitis posterior a la ingesta de ácido acetil salicílico (ASA) o analgésicos no esteroideos (AINES). Actualmente la EREA es definida como una enfermedad caracterizada por sinusitis crónica hipertrófica eosinofílica, asma, poliposis nasal y sensibilización a medicamentos que inhiban a la enzima ciclooxigenasa-1, en particular los AINES ¹¹.

La necesidad de identificar a la población asmática con sensibilidad a la aspirina , motivó a los investigadores a establecer métodos cuyo propósito fuera comprobar de manera objetiva la intolerancia a la aspirina, es así que en 1975 en Polonia A. Szczeklik, R. J. Gryglewski, G. Czerniawska-Mysik proponen la secuencia de administración de aspirina por vía oral ¹² y en 1977 en Italia los doctores Biaco S, Robuschi M, Petrigni G utilizan a la aspirina inhalada como procedimiento de diagnóstico, obteniendo ambos retos una adecuada sensibilidad diagnóstica y seguridad para el paciente, su aplicación se comienza a generalizar ¹³. A partir de 1998 el Dr. Mamert Milewskiski ¹⁴ propone el reto nasal, recomendado para pacientes en los cuales la administración de aspirina por vía oral o inhalada está contraindicada por la severidad de su

respuesta ¹⁴. En el año 2001 se publican las primeras guías de reto con aspirina por el grupo INTERASMA ¹⁵, basado en esta experiencia en 2007 La Red Global Europea de Alergia y Asma (GA2LEN) publica los protocolos de provocación con aspirina para el diagnóstico de la EREA y urticaria inducida por aspirina (UIA), estableciendo el estándar de oro al reto oral ¹⁶.

Con respecto al tratamiento de la EREA, este consiste en el control de las enfermedades que la definen, el asma se debe manejar con respecto a lo estipulado por las guía GINA 2011 (*Global Inicative for control Asthma*) y la rinitis y poliposis conforme al consenso EPOS 2007 (*European Position Paper of Primary Care Diagnosis and Managment of Rhinosinusitis and Nasal Poliposis 2007*), importante adición es la administración de los inhibidores de los leucotrienos ¹⁷, este tratamiento es considerado por su farmacodinamia, útil en el tratamiento para el asma, es incluido en las recomendaciones terapéuticas sugeridas por la GINA hasta 2005, sin embargo en 2002 el Dr. Sven-Erik Dahlén junto con un grupo de colaboradores europeos demuestra el beneficio en las medidas de función pulmonar y puntaje de evaluación en cuestionario de calidad de vida en pacientes intolerantes en comparación con asmáticos tolerantes. Otra vertiente específica ha sido la desensibilización, con el objetivo de tolerar el medicamento sin que se presente síntomas asociados a asma o rinitis, una de las primeros estudios es realizado por W. Pleskow y D. Stevenson ¹⁸ en 1982 desensibilizaron a los primeros 30 pacientes con intolerancia a la aspirina, estos métodos se fueron modificando hasta que en el año 2003 se publicó la experiencia de Berges-Gimeno y D. Stevenson , quienes desensibilizaron a 175 pacientes entre 1995 y al año 2000, concluyendo que existe una disminución en la frecuencia de sinusitis, disminución en el uso de esteroides sistémicos y mejoría del olfato, siendo más efectiva durante los primeros 6 meses de tratamiento y máximo de 5 años de seguimiento ¹⁹.

3.2 Fisiopatología de la EREA

En 1975 Szczeklik propone el mecanismo de la patogénesis de la EREA ²⁰, en la inhibición farmacológica de la enzima ciclooxigenasa (COX), de esta enzima se conocen 3 tipos; la ciclooxigenasa-1 (COX-1), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y ciclooxigenasa-3 (COX-3), indispensables en el metabolismo del ácido araquidónico o ácido eicosatetraenoico, ácido graso esencial polinsaturado, componente de las membranas celulares; estas proteínas son codificadas en el cromosoma 9q32-q33.3 para *COX-1* y *COX-3* y 1q25.2-q25.3 para *COX-2*. ²¹

El bloqueo de la vía de la ciclooxigenasa por analgésicos no esteroideos induce al desvío metabólico hacia la vía de la lipooxigenasa, en esta vía el araquidonato se convierte a ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico y leucotrieno A4 por la ALOX5 o la 5-lipoxigenasa (5-LO), cuyo gen está localizado en el cromosoma 10q11.2, y por su cofactor proteína activadora 5-lipoxigenasa (ALOX5AP y FLAP). El LTA4 sintetizado, se convierte en el leucotrieno B4 (LTB4) por LTA4 hidrolasa (LTA4H) y es conjugado por la leucotrieno C4 (LTC4) sintasa calcio-dependiente para formar LTC4 ²¹⁻²², la LTC4 sintasa (LTC4S) se sobreexpresa de manera importante en los eosinófilos y los mastocitos de la mucosa respiratoria de los pacientes con intolerancia a la aspirina, esta cuatro veces más aumentada en comparación con los pacientes que no presentan esta condición cuando se analiza lavado bronquioalveolar y diez veces más cuando se compara a nivel urinario ⁻²³⁻²⁴.

La proteína LTC4 contiene varias cadenas de aminoácidos en su región terminal, la cual puede ser degradada por proteínas citoplasmáticas, modificando la conformación de la proteína transformándola a LTD4 y LTE4. Los leucotrienos son proteínas identificadas en 1982 por Hammarstrom y Samuelsson, adquieren su nombre debido a que fueron descubiertos en los leucocitos además que su estructura química presentan de tres enlaces dobles conjugados ²⁵. Estas proteínas que son llamadas en conjunto peptidoleucotrienos (pLTs), pueden inducir la

quimiotaxis de las células inflamatorias, las actividades biológicas de los leucotrienos solo se ejercen como consecuencias de la unión a receptores de siete dominios transmembranales asociados a proteínas G, el receptor para cisténil leucotrieno tipo 1 y 2 (CYSLTR1 y CYSLTR2), en las superficies de células inflamatorias, los CYSLTR1 se encuentran con mayor distribución en la mucosa nasal de los pacientes con EREA ²⁶. Los mecanismos subyacentes de los leucotrienos inducen broncoconstricción, permeabilidad vascular, aumento en la secreción de moco, reclutamiento de eosinófilos e hipertrofia de músculo liso, además de deposición de colágeno en la pared bronquial ²⁵.

4.0. Antecedentes genéticos en EREA.

La predisposición genética de la EREA involucra a diversos genes en el desarrollo de esta entidad, se han incluido varios alelos de HLA, polimorfismos de un solo nucleótido “SNP” (*single nucleotide polymorphism*) para el receptor cisténil leucotrieno tipo 1 (CysLTR1) y tipo 2 (CysLTR2), receptores de tromboxano (TBXA2R), receptores de alta afinidad para Ig E (FceR1b), factor de transcripción T-box (TBX21), receptor de prostaglandinas (tipo EP2) y promotor del factor de necrosis tumoral, sin embargo, ninguno de estos genes están fuertemente asociados con enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina ²⁷.

En el año 2000 Marek Sanak ²⁸ analizó el SNP -444A→C del gen que codifica para la proteína LTC4S sintasa localizado en el cromosoma 5q35, este estudio fue realizado en población polaca, este hallazgo fue implicado en los mecanismos de alérgia y de hiperreactividad bronquial, por ser indispensable en la conversión para las diferentes clases de leucotrienos, elementos clave en la fisiopatología de la EREA. La presencia de alelo C se distribuyó con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con EREA en comparación con asmáticos ($p=0.01$) y sujetos controles ($p= 0.025$), su presencia en esta población tiene una razón de momios de 2.62 (IC 95%=1.38- 4.98), este hallazgo se corroboró al medir la expresión de RNA mensajero (RNAm) siendo también significativamente

mayor ($p > 0.001$) en el grupo de pacientes con EREA en comparación con asmáticos tolerantes, sin embargo Y. Kawagishi no pudo reproducir estos hallazgos al evaluar el mismo polimorfismo en población japonesa ($p=0.186$) y tampoco existió diferencia de la asociación entre los genotipos AA vs AC y CC con niveles de leucotrienos urinarios ²⁹, mismo resultado describió. Rachel Van Sambeek en población de Estados Unidos no encontrando asociación entre el alelo C o el genotipo AC o CC al comparar los tres grupos de estudio ³⁰.

Otro de los genes estudiados, involucrado en la síntesis de leucotrienos fue el del gen *ALOX5* analizado por J. M. Drazen en el cual tres polimorfismos fueron identificados dentro de la región codificante del gen, los cuales están en el exón 1 (C→T en la base 21), en el exón 2 (G → A en la base 270) y en el exón 13 (A→G), estos resultados son retomados por S. H-Kim³² y analizados en población coreana en 2005; sin embargo al comparar los grupos no existe una diferencia estadísticamente significativa, no así con la severidad de la hiperreactividad bronquial entre los grupos con EREA y asma ($p=0.003$) ³¹.

Con el objetivo de analizar una amplia región de genes candidatos al desarrollo de la EREA Jeong-Hee Choi describió el comportamiento de 4 SNPs en *ALOX5* (-1708G→A, 21C→T, 270G→A, 1728A→G), uno en *ALOX5AP* (218A→G), la prostaglandina-endoperoxidase sintasa 2 -*PTGS2*, *COX2* (-162C→G), *LTC4S*(-444A→C), y *CYSLTR1* (927T→C) en población coreana de 93 sujetos con asma e intolerancia a la aspirina, de todos los SNPs analizados el *ALOX5AP* (218A→G), fue el que demostró diferencia significativa $p < 0.04$. La frecuencia de *ALOX5*-HT1 [GCGA] contiene un genotipo en el grupo de asmáticos intolerantes a la aspirina –AIA (92.4%) fue significativamente más alto que en el grupo de asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA), en el 82.3%, ($p = 0.01$), OR = 5.0, IC 95% = 1.54- 17.9 y en los controles 90,0%, ($p = 0.03$), OR = 4,5, IC 95% = 1.1-18.4 ³³.

Los genes del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase II en su rol fundamental del procesamiento antigénico fueron estudiados en población polaca con EREA por Dekker en 1997,

describiendo que la frecuencia de *HLA-DPB1*0301* fue de 19.5% en el grupo con intolerancia a la aspirina, frente al 5.2% en los sujetos control ($p = 0.002$, OR = 4.4, IC 95% = 1.6-12.1) y del 4.4% en comparación con los asmáticos tolerantes ($p = 0.0004$, OR = 5.3, IC 95% = 1.9-14.4,); en cambio para la frecuencia alélica de *DPB1*0401* fue de 28.8% en el grupo EREA en comparación con el 49% de los controles ($p = 0.003$, OR = 0.42 IC 95% = 0.24-0.74) y de 45.6% en los asmáticos ($p = 0.008$ OR = 0.48; IC 95% = 0.28-0.83)³⁴.

En 2004, Hae-Sin Park evalúa 29 alelos de *HLA-DRB1*, 16 de *DQB1* y 21 de *DPB1* concordando con el estudio de Dekker acerca del alelo de *HLA-DPB1*0301*, 13.8% de los pacientes con EREA lo presentaban vs 4.1% de los asmáticos ($p = .004$. OR= 5.2, IC 95% = 1.8 a 14.7) y el 2.2% en los sujetos control ($p < 0.0001$, OR = 8.3, IC 95% = 2.7- 25.5), este mismo alelo fue analizado en pacientes con EREA, respecto a la dosis de montelukast utilizada para el control de la enfermedad, revelando que este alelo se encontraba en mayor frecuencia en los pacientes que tomaban >200mg/mes vs <5mg/mes ($p=0.004$)³⁵.

Park T. analizó el gen de la anexina A4 (*ANXA4*)^j, proteína relacionada con el influjo de calcio a nivel de células epiteliales, elemento relacionado con la broncoconstricción pulmonar, mediante un análisis de regresión logística ajustado por edad y sexo que involucró a población con EREA vs controles (1:4) se evaluaron 25 SNPs de los cuales (rs2168116 C→A, rs4853017 T→C, rs6546547 A→T, rs13428251 G→C, rs7577864 A→G, rs7559354 C→G, rs7588022 T→C, y rs3816491 C→T) y dos haplotipo de (*ANXA4-ht3* y *ANXA4-ht5*), siendo el rs3816491 C→T ($p = 0.003$, $p_c = 0.045$ en modelo dominante y $p_c = 0.038$ en modelo dominante)³⁶.

C. F. Pasaje hizo lo mismo con el gen de *ZNRD1* que codifica para una proteína dedo de zinc que cataliza la transcripción de ADN en ARN, localizado en el cromosoma 6p21.3, región que contiene marcadores como el *HLA-DPB1* asociado a esta enfermedad en pacientes coreanos, mediante la misma estrategia metodológica de Park T. estudió 3 SNPs cercanos a la región 5' (rs3132129 C→T,

rs3757329A→C y rs7769930A→C) y 3 en región intrónica (rs1150741 C→G, rs1150740 G→T y rs1150739 G→A), siendo el rs1150741C→G aquel que incrementaba el riesgo ($p=0.03$. OR=1.14, IC95%: 1.14-10.16) con respecto al grupo control ³⁷.

Recientemente, se ha reportado que la expresión de discoidina, *CUB* y *DCBLD2*- proteína que contiene un dominio LCCL 2, las cuales están reguladas por el factor de transcripción AP-2 α (TFAP2A), un componente de activador de la proteína-2 (AP-2) que regula la síntesis de IL-8, involucrada en la producción en fibroblastos de pulmón humano y células epiteliales. Tae-Joon Park, investigó las asociaciones entre la EREA y polimorfismos de *DCBLD2*, solo siete de los doce SNPs (rs1371687 C → T, rs7615856 T → C, rs828621 A→ T, rs828618 G→ A, rs828616 A→ G, rs106219 A→ G 6 y rs8833 T → C) y un haplotipo (*DCBLD2*-ht1) mostraron asociaciones con la susceptibilidad a EREA ($p=0.05$) en un modelo co-dominante, además, un SNP no sinónimo rs16840208 (Asp723Asn) demostró una fuerte asociación con la disminución del VEF₁ en pacientes AERD ($p=0.05$) ³⁸.

Otro gen que se encuentra localizado dentro del complejo mayor de histocompatibilidad es el *DDR1* (discoidin domain receptor tyrosine kinase 1), el cual se ha relacionado con la transcripción de los receptores de tirosina quinasas las cuales tienen un rol clave en la comunicación de las células con su microambiente. Así lo demostró Kim al estudiar 9 SNPs en 93 pacientes con EREA y 96 con asma tolerante; solo el SNP rs1264320 localizado en la región intrónica en su genotipo AA vs GA y GG mostró asociación con la disminución VEF₁, 8 veces más en el grupo asmático en comparación con el grupo EREA de este estudio aún después de las correcciones para múltiples pruebas ($p = 0.003$ y $p = 0.01$ corregido) ³⁹.

Po otra parte se ha estudiado el gen de la tromboxano sintasa (*TBXAS1*) convierte a la prostaglandina H a tromboxano, un potente constrictor del músculo liso respiratorio. Por lo tanto, las alteraciones funcionales del gen *TBXAS1* puede contribuir a la intolerancia a la aspirina Sun-Hee

Oh relacionó los SNPs del gen *TBXAS1* y la EREA, estudió pacientes con EREA y pacientes asmáticos tolerante, 101 SNPs se genotipificaron y la expresión de ARNm del gen *TBXAS1* por las células mononucleares de sangre periférica y la concentración en plasma de tromboxano (TXB₂) se midieron ELISA. El análisis de regresión logística mostró que la frecuencia del alelo menor rs6962291 en el intrón 9 fue significativamente menor en el grupo de EREA (n = 115) que en el grupo ATA (n = 270) ($p_c = 0.04$). A través de este método se demostró una fuerte asociación de rs6962291 con la caída del VEF₁ ($p = 0.003$) en el reto con aspirina. El nivel de TXB₂ en plasma fue significativamente menor en portadores del genotipo AA que en los pacientes con el genotipo TT ($p = 0.016$), concluyendo que el alelo menor de rs6962291 puede jugar un rol protector contra la hipersensibilidad a la aspirina a través de una menor actividad catalítica del gen *TBXAS1*, atribuido al aumento de una isoforma no funcionales de *TBXAS1* ⁴⁰.

Se ha descrito que la broncodilatación en la vía aérea está relacionada con la regulación de calcio, el gen de canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad gamma 6 (*CACNG6*) codifica una proteína que estabiliza el canal de calcio, en las células del musculo liso. Jin Sol Lee estudió su participación en la EREA ya que previamente se ha descrito en pacientes con poliposis nasosinusal, se analizó los SNPs (rs251850, rs4806481, rs158196, rs158199, rs192808, rs450227, rs2291068, rs459247). A través del análisis de regresión logística demostró que el SNP localizado en la región intrónica rs192808 C→T; $p = 0.0004$, $p_c = 0.0029$ OR = 2.88, IC95% 1.60-5.17, en modelo codominante, fue el que más frecuente se presentó en pacientes con EREA que en asmáticos tolerantes y se asoció significativamente con el riesgo de AIA ⁴¹.

Otras vertientes han estudiado es la prostaglandina D₂-PGD₂, un prostanoide principal producido por los mastocitos posterior a la exposición a alérgenos, mediador importante en la patogénesis de la inflamación de las vías respiratorias a través de su receptor, la molécula de receptor quimioatrayente expresado en células Th2 (*CRTH2*). El gen *CRTH2* humano codifica una proteína G

acoplada del receptor quimioatrayente que se expresa en linfocitos Th2, incluyendo otras células relacionadas con la alergia, como los eosinófilos, basófilos y monocitos. CRTH2 media también la quimiotaxis de los linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos por PGD₂, ha sido asociada con el asma alérgica en personas de origen caucásico y chinos provenientes de Taiwan. Palikhe reportó la asociación de 2 SNPs de CRTH2 (-466T→C y -129C→A), siendo la única asociación la reportada para el -466T→C, el cual se encontró en mayor distribución en el grupo de pacientes con EREA en comparación con los asmáticos (p= 0.044) además de la asociación con los niveles de eotaxina cuando se comparó el genotipo TT vs. CT y CC (p=0.046)⁴².

La persistente inflamación eosinofílica en las vías respiratorias es un rasgo característico de EREA y del receptor de quimiocinas CC motivo 3 (*CCR3*) el cual juega un papel importante en la infiltración eosinofílica en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos. Kim SH evaluó dos polimorfismos (-520T→G y -174C→T) del promotor *CCR3*, en 330 pacientes con hipersensibilidad a la aspirina (191 EREA y 139 vs 217 controles sanos, el estudio in vitro funcional mostró que el alelo -520G exhibió actividad significativamente mayor del promotor en comparación con el alelo -520T en las líneas celulares (p <0.001), sugiriendo que polimorfismos genéticos en *CCR3* puede contribuir al desarrollo del fenotipo de la EREA⁴³.

Lee investigó una proteína que se une al regulador de la señalización de la proteína G en la subfamilia R7 (*RGS7BP*). *RGS7BP* controla la función de GPCRs e indirectamente modula corrientes de potasio activados por acetilcolina a través de los receptores muscarínicos M2. Dado que muchos metabolitos del ácido araquidónico señalizan a través de GPCRs y su rol en los receptores M2, los autores investigaron si una asociación entre SNPs en el gen *RGS7B* encontrando un haplotipo (BL3-HT2) y 3 SNPs asociados con EREA rs98092 C→G y 98853 C→T, ambos en el intrón

5 y 104450 T→G en la región 3' UTR. Las frecuencias del haplotipo y SNPs se distribuyen en menor frecuencia en los pacientes con EREA en comparación con los asmáticos ⁴⁴.

Considerando la posibilidad que la EREA sea el resultado de una infección viral causada por rinovirus, Nami Sherstha Palikhe reportó el rol de la inmunidad innata, estudiando polimorfismos en *TLR3*. 2 polimorfismos de *TLR3* (-299698 G→T, rs3775296) en el 5'-UTR y rs293391 G→A (Leu412Phe, rs3775291), analizando tres modelos de regresión logística (co-dominante, dominante y recesivo) se utilizaron después de considerar la edad y el género como covariables. Los pacientes con EREA que llevaban el genotipo GG del -293391 G→A mostró una frecuencia significativamente menor que el grupo de ATA en el modelo co-dominante ($p=0.025$) y dominante ($p = 0.036$). De manera similar, la frecuencia del alelo menor alelo A fue significativamente mayor en los EREA vs asmáticos tolerantes ($p = 0.023$) para este polimorfismo. Al analizar los haplotipos se observaron diferencias significativas en sus frecuencias entre los tres grupos. Los pacientes homocigotos HT2 [GA] con EREA mostró una frecuencia significativamente mayor que otros haplotipos en los modelos co-dominante ($p = 0.02$) y recesivos ($p = 0.02$) sugiriendo que el polimorfismo en el gen de *TLR3* se asocia con EREA en la población coreana ⁴⁵.

Otra vertiente de la investigación se ha concentrado en el análisis de polimorfismos de los genes relacionados con mecanismos inmunopatológicos involucrados con la severidad del asma como lo demostrado por Kohyama en población Coreana *IL13* (-111C→>T y Arg110Gln rs20541) e *IL17* (-737C→T), reportando que el genotipo TT vs (CT/CC) es el que se distribuía en la población de pacientes con EREA ($p < 0.01$) y que esta asociación es más predominante en el sexo femenino ($p < 0.001$) ⁴⁶.

En este contexto también se ha estudiado la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido con las enfermedades que componen a la EREA, Witte JS estudio específicamente el SNP de TNF

rs1800629 (-308 G→A) en una población de 236 asmáticos vs 275 controles provenientes de Estados Unidos de América, la conclusión de este estudio reportó la asociación significativa con los casos en comparación con los controles $p=0.04$, OR= 1.86 (IC 95%= 1.03-3.34)⁴⁷. En población mexicana este polimorfismo se estudió en asmáticos por Wu H, obteniendo un riesgo relativo (RR) para este SNP de 2.06 (IC95%: 1.19–3.55), similarmente el rs361525 se presentó en mayor frecuencia en los pacientes asmáticos con un RR de 2.21; ($p= 0.01$, IC 95%:1.14-4.30)⁴⁸. Eventualmente también ha sido evaluado en otras patologías como la poliposis nasosinusal, Erbek lo asoció en población Turca al evaluar 95 sujetos con poliposis vs población abierta sin esta característica patológica, demostrando que el grupo con poliposis tuvo una frecuencia significativamente mayor de este polimorfismo en comparación con su control ($p = 0.015$). El análisis de regresión logística reveló que la presencia del SNP de TNF -308 G→A es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de poliposis ($p= 0.016$, OR= 3.2, IC 95%= 1.4--7.1)⁴⁹. Por otra parte Stemmler estudió el gen del receptor de IL8 (*IL8RA*) localizado en el cromosoma 2q35 quien analizó tres polimorfismos del gen 92T→G, 827G→C, 1003C→T, demostrando que el polimorfismo de 827G→C fue estadísticamente significativo, en pacientes pediátricos con asma ($p=0.0231$) en comparación con población control abierta⁵⁰.

5.0 Planteamiento del problema.

La EREA es una enfermedad inflamatoria caracterizada por asma, rinosinusitis crónica hiperplásica, poliposis nasal y exacerbación de los síntomas de cada una de estas entidades patológicas, posterior a la ingesta de ácido acetil salicílico u otro AINE.

El asma, la rinitis y la poliposis nasal, son enfermedades inflamatorias donde la participación de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 están asociadas con la frecuencia y en algunos casos con la gravedad de estos padecimientos, este precepto está a su vez coligado con la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes que codifican para estas interleucinas, dado que se ha reportado previamente polimorfismo que afectan directamente a la actividad biológica así como a su expresión.

Actualmente la tendencia de las investigaciones de este tipo de asociación(es) específicas en EREA se han enfocado en el estudio de los polimorfismos de los genes que están implicados en la síntesis de leucotrienos, esto debido a la plausibilidad biológica involucrada en la patogénesis de la EREA sin que hasta este momento existan evidencia de asociación de polimorfismos tipo SNP en genes de citocinas proinflamatorias con esta enfermedad.

6.0 Justificación.

La EREA es una enfermedad conformada por entidades patológicas de tipo inflamatorio, que se exacerban posterior a la ingesta de AINES, diversos protocolos han estudiado la asociación de citocinas inflamatorias con enfermedades crónicas de la vía aérea, como asma y poliposis nasal componentes esenciales de la EREA que hasta ahora no se han estudiado en nuestra población.

Estudiar el rol de los polimorfismos en los genes de citocinas inflamatoria como *TNF*, *IL1B*, *IL6* e *IL8* podría ayudar a comprender su participación en la EREA, así como el desarrollo en un futuro de pruebas diagnósticas que ayuden a identificar a individuos con susceptibilidad a padecer esta entidad, promoviendo el desarrollando de la medicina predictiva, principal activo de la medicina genómica actual.

7.0 Hipótesis

La frecuencia de los polimorfismos de *TNF* (rs1800629 G→A, rs361525 G→A), *IL1B* (rs16944G→A), *IL8* (rs4073 A→T) e *IL6* (rs1818879A→G) están asociados la susceptibilidad a EREA.

8.0 Objetivos.

8.1. Objetivo general.

Establecer si existe asociación genética entre los polimorfismos de *TNF* (rs1800629 G→A, rs361525 G→A), *IL1B* (rs16944 G→A), *IL8* (rs4073 A→T), *IL6* (rs1818879 A→G) en pacientes mexicanos con enfermedad pulmonar exacerbada por aspirina, asma y controles sanos.

8.2. Objetivo particular.

A. Determinar la frecuencia alélica y genotípica en pacientes con polimorfismos de *TNF* (rs1800629 G→A, rs361525 G→A), *IL1B* (rs16944G→A), *IL8* (rs4073 A→T), *IL6* (rs1818879A→G) en población de pacientes mexicanos con EREA, asma y controles sanos.

9.0 Materiales y métodos.

9.1. Tipo de estudio.

Transversal con diseño de casos y controles.

9.2. Tamaño de la muestra.

Para el cálculo del tamaño de la muestra, se tomó en cuenta la frecuencia del alelo menor (MAF, por sus siglas en inglés) más baja de los 5 SNPs analizados para este estudio, de acuerdo a lo reportado en el *SNP database* de la biblioteca nacional de salud (NHI, por sus siglas en inglés) en población con ascendencia mexicana residente en Los Angeles, California (E.U.A), la cual correspondió al SNP rs351525 (G→A) de *TNF*, siendo su MAF la del alelo A (adenina) de 0.046. Se utilizó la fórmula para dos proporciones $n = [z_{1-\alpha/2} \sqrt{(c+1)p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{cp_1(1-p_0) + p_1(1-p_1)}]^2 / c(p_0 - p_1)^2$.

Considerándose a este valor de MAF como p_0 (la que deberían portar los controles) y p_1 la FAM de los casos (0.15), estableciendo una relación caso control (1:2), obteniéndose una n de 98 casos y 196 controles por grupo, sin embargo debido a la prevalencia en nuestro instituto de esta enfermedad se realizó un análisis a conveniencia con una relación de 1caso:2controles (pacientes con asma y controles sanos), correspondiendo a 78 casos: 134 pacientes con asma y 135 controles.

9.3. Población de estudio.

Se incluyeron 75 pacientes mestizos mexicanos con EREA de la clínica de IAPA (Intolerancia a la Aspirina, Poliposis Nasosinusal y Asma) y 134 pacientes con asma de la clínica de Alergia e Inmunología Clínica, ambas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Los voluntarios que conforman al grupo control ($n=135$) fueron enrolados mediante campañas para la detección de asma.

9.4. Definición de casos y controles.

9.4.1 Caso (EREA): Paciente con diagnóstico de asma en base a antecedentes de sintomatología y evaluación de la hiperreactividad bronquial mediante reto con metacolina positivo, antecedente

de más de tres eventos de rinosinusitis en un año, poliposis nasal evidenciada a través de nasoendoscopia o antecedente de polipectomía previa reportada en el expediente clínico e intolerancia a la aspirina confirmada por reto nasal con lisin aspirina.

9.4.2 Control relacionado a EREA (Asma): Paciente con diagnóstico de asma en base a antecedentes de sintomatología y evaluación de la hiperreactividad bronquial mediante reto con metacolina positivo, sin antecedente de rinosinusitis, no evidencia de poliposis nasal a través de nasoendoscopia e intolerancia a la aspirina descartada por reto nasal con lisin aspirina.

9.4.3 Control no relacionado a EREA y Asma: Voluntario sin antecedente de asma descartada por síntomas y evaluación de la hiperreactividad bronquial mediante reto con metacolina negativa sin antecedente de rinosinusitis, no evidencia de poliposis nasal a través de nasoendoscopia e intolerancia a la aspirina descartada por reto nasal con lisin aspirina.

9.5 Criterios de inclusión:

1. Pacientes y voluntarios mestizo mexicanos (2 generaciones previas de nacidos en México)
- 2.- Pacientes y voluntarios mayores de 18 años.
- 3.- Pacientes con EREA y asma; con asma controlada de acuerdo a los criterios de GINA.

9.6. Criterios de exclusión:

- 1.- Pacientes con EREA y asma; con asma controlada de acuerdo a los criterios de GINA.
- 2.- Pacientes y voluntarios con alguna de las siguientes enfermedades que sean reportadas en el expediente clínico y mediante cuestionario de concentrado de datos: cáncer, autoinmunidad (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, etc.), tuberculosis, VIH, enfermedad pulmonar obstructiva crónica secundaria a tabaquismo.

9.7. Criterios de eliminación:

- 1.- Pacientes y voluntario que posea las condiciones necesarias para entrar en alguno de los grupos de estudio pero niegue su consentimiento a participar en el estudio.

9.8. Reto nasal con lisin aspirina.

A todos los pacientes se les suspendió con una semana de anticipación los esteroides intranasales en caso de ser portadores de poliposis y/o rinosinusitis. Así mismo, se restringió el uso de

cualquier descongestionante intranasal, manteniendo exclusivamente como tratamiento los aseo nasales. Con 7 días de anticipación se restringió la toma de cualquier tipo antihistamínico y antagonistas de los leucotrienos. Los esteroides inhalados y los beta-agonistas de larga duración se suspendieron solo con 5 días de anticipación. La restricción para los beta-agonistas de corta duración fue de solamente de 12 horas. En caso de tener tratamiento con anticolinérgicos inhalados, este se suspendió con 48 horas de anticipación, mismo tiempo de suspensión en caso de ingesta de metilxantinas. En caso de empleo de corticoesteroides sistémicos 15 días previos al reto, este no se llevó a cabo.

La elaboración del reto estuvo a cargo del investigador principal, el cual contaba con un segundo observador, ambos realizaron la captura de los datos en un formato específico que incluía los datos generales del paciente, la escala clínica y las mediciones de la función respiratoria y flujos nasales obtenidos por espirometría y rinomanometría respectivamente con un Espirómetro-Rinomanómetro Jaeger modelo Flowscreen calibrado diariamente y programado con los valores de referencia para espirometría obtenidos por Pérez-Padilla. Una vez evaluada la condición clínica del paciente y ya corroborado la suspensión de medicamentos de acuerdo a lo especificado con anterioridad, además de previa firma de consentimiento informado, se realiza espirometría basal hasta obtener criterios de repetibilidad y aceptabilidad que justifiquen un grado de calidad A. En caso de presentar Capacidad Vital Forzada (FVC) o VEF1 menores a 80% el reto era reprogramado. Se realizaron dos mediciones de flujos nasales, considerándolas aceptables cuando no existía diferencia de más del 20% en el flujo nasal total, se tomó en cuenta como valor basal la cifra mayor del flujo nasal total.

Con la finalidad de evaluar la presencia de hiperreactividad nasal inespecífica, se instilan sobre ambos cornetes medios 1 ml de solución salina previamente a temperatura de a 37°C, 20 minutos después se realiza nueva rinomanometría, en caso de caída del flujo nasal total mayor al 50% se

considera positiva y el reto es suspendido, una vez descartada esta condición se continúa con el reto nasal manteniendo al paciente con medición continua la saturación de oxígeno por medio de oximetría de pulso, además de contar con un acceso vascular permeable que permita la administración de medicamentos sistémicos en caso de reacción grave al AAS.

Para poder instilar Lisin aspirina a nivel nasal se elaboró una concentración en estado líquido de 50 mg/ml, mediante la dilución de un sobre de Coraspir^{MR} (Acetil Salicilato de Lisina) 160 mg (equivalentes a 80 mg de ácido acetilsalicílico) en 3.2 ml de solución salina al 0.9%.

Se instila (pipeta Eppendorf) en cada cornete medio 250 µL de la solución previamente descrita que equivalen a 12.5 mg de lisin-aspirina dando una dosis total de 25 mg, posterior a 20 y 30 minutos se realiza rinomanometría y espirometría respectivamente, si existe un descenso del 40% o más en el flujo nasal total se considera reto positivo, también si el VEF1 presenta una caída del 20% o más del valor inicial. En caso de no presentar criterios de positividad, se instilan nuevamente 12.5 mg en cada narina de lisin-aspirina para evaluar criterios de positividad por medio de rinomanometría y espirometría a los 20 y 30 minutos posteriores a esta nueva instilación. La ausencia de criterios positividad, conlleva a realizar nuevas instilaciones de 12.5 mg en cada narina con la misma frecuencia de las valoraciones. Este paso se repite hasta una cuarta ocasión si no existe descenso del flujo nasal o del VEF₁, es decir, dosis acumulada de lisin aspirina de 100 mg.

En caso de presentar criterios de positividad, ya sean nasales o bronquiales, de forma inmediata se administran corticoesteroides sistémicos, prednisona a razón de 1 mg/kg por vía oral. Si la reacción presentada fue broncoespasmo se inician micronebulizaciones con beta-agonista de corta acción, salbutamol 0.5 mg en tres ocasiones con espacio de 20 minutos entre cada una y se egresa al paciente hasta que este hayan cesado sus síntomas. El paciente se citó al a las 24 horas. siguientes y a los días 7 y 14 para revisión realizando espirometría y evaluación clínica.

9.9. Reto con Metacolina.

El reto con metacolina se realizó en todos los pacientes (EREA y asma) y voluntarios del estudio. Teniendo en consideración que para su desarrollo el grupo de pacientes debió tener adecuado control del asma. Los pacientes y los voluntarios como condición indispensable no debieron presentar infecciones de la vía aérea superior (sinusitis, faringoamigdalitis y rinitis infecciosa) al momento de realizar la prueba. En el grupo de pacientes con EREA y asma se suspendieron los siguientes medicamentos, en caso de que se estuvieran administrando: broncodilatador de corta acción 8hrs antes del estudio, bromuro de ipatropio y antagonistas de los receptores de leucotrienos con 1 día y metilxantina con dos días de anticipación, debido a que los factores previamente señalados pudieran incidir en la generación de resultados falsos negativos. En el caso de los sujetos controles no deberán haber presentado 15 días previos accesos de tos recurrentes y dificultad respiratoria así como procesos infecciosos de la vía aérea.

Una vez evaluada la condición clínica del paciente y corroborado la suspensión de medicamentos de acuerdo a lo especificado con anterioridad, además de previa firma de consentimiento informado, se realizó espirometría basal con espirómetro Jaeger modelo FlowScreen, hasta obtener criterios de repetibilidad y aceptabilidad que justifiquen un grado de calidad A. En caso de presentar Capacidad Vital Forzada (FVC) o VEF1 > a 70% del predicho considerándose a este valor como aceptable para iniciar la prueba, posteriormente se nebulizó con solución salina al 0.9% durante 20 segundos, de inmediato se realizará nueva espirometría, en caso de no obtener disminución del 20% en el VEF1 con respecto al basal se procedió con inhalaciones de metacolina a las siguientes concentraciones: 0.03mg, 0.06mg, 0.125mg, 0.5mg, 1mg, 2 mg, 4mg, 8mg, 16mg y 32mg, entre cada una de las inhalaciones se realizó espirometría con el objetivo de identificar la concentración de metacolina que provoque el decremento del 20% del VEF1 , en caso de obtenerse dicha condición la prueba se dará como positiva y se procedió a calcular PC20 de

acuerdo a la fórmula recomendada por la American Thoracic Society. Una vez concluida la prueba los pacientes con asma y sujetos control se les administró salbutamol inhalado y espirometría posterior al broncodilatador para evaluar la reversibilidad.

9.10. Pruebas cutáneas.

Previo explicación al paciente de la técnica se realizó interrogatorio con el objetivo de conocer si existió ingesta de medicamentos que pudieran provocar falsos negativos. Los antihistamínicos anti H1 debieron suspenderse con diez días de anticipación así mismo anti H2 y antidepresivos tricíclicos con dos días, esteroides tópicos tres semanas antes de las pruebas y en el caso de los esteroides sistémicos un mes. Se realizó asepsia de la cara anterior de antebrazos, inmediatamente se aplicó leve presión en esta región con punta roma, 15 minutos posterior a esta maniobra se evalúa la condición de dermografismo de estar ausente se procedió a marcar de manera lineal la piel transversalmente al eje del brazo con 3 cm de separación entre cada línea, en los extremos se aplicaron 43 alérgenos de la marca Alk-Abello (distribuidos de la siguiente manera: 16 árboles (*Betula verrucosa*, *Ligustrum vulgare*, *Cupressus arizónica*, *Acacia sp*, *Quercus rubra*, *Eucalyptus sp*, *Western juniperus (Wj.)*, *Schinus molle*, *Fraxinus americana*, *Ulmus sp.*, *Juglans sp*, *Platanus sp*, *Prosopis sp*, *Acer negundo*, *Casuarina esquistifolia*, *Populus sp*. 10 pastos (*Holcus lanatus*, *Sorghum halapense*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Agrostis alba*, *Anthoxanthum odoratum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*). 8 malezas (*Salsola kali*, *Taraxacum officinale*, *Artemisia vulgaris*, *Ambrosia trifida*, *Amarantus retroflexus*, *Rumex crispus*, *Lambs quarter*, *Bromus pratensis*), el resto de alérgenos fueron: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt.), mezcla 1:1 *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* (Df), mosquito, cucaracha y epitelio de gato, perro, caballo, conejo. Como control negativo se utilizó solución fisiológica 0.9% y clorhidrato de histamina (1:1000) como control positivo, todos los reactivos se aplicaron con lanceta de polipropileno tipo duotip, inmediatamente se retiró el exceso de

alérgeno en la piel, los diámetros ortogonales de la roncha se midieron 20 minutos después de la aplicación, con regla graduada en milímetros considerando positivas aquellas reacciones que midieron más de 3 mm comparadas con el diámetro de roncha provocada por el control negativo, el resultado se reportó en hoja de captura de pruebas cutáneas.

9.11 Extracción de ADN.

La muestra de ADN se extrajo a partir de sangre venosa por medio del kit comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA) para obtener ADN de alto peso molecular. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero y plasma posteriormente se separó el suero del tubo SST gel sin anticoagulante y se extrajo la capa de leucocitos del tubo BD EDTA, se colocó en un tubo cónico de 15 ml agregando 2 ml. de detergente DB1 dando vórtex para una mejor homogenización y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante del tubo y se agregó 2 ml. de BD2 dando vórtex y centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante, concluido los pasos anteriores se aplicó 1000 µl. de BD3 y homogenizó con el botón leucocitario formado, dejándose en baño maría por 15 minutos a 65°C. Posteriormente se pasó la muestra obtenida a un tubo ependorff y se agregó 400 µl. de BD4, centrifugándose a 14000 rpm durante 10 minutos posteriormente se extrajo el sobrenadante y se agregó 500 µl. de isopropanol al 100%, mezclándose por inversión vigorosamente hasta observar la hebra de ADN y volviéndose a centrifugar a 2,0000 rpm por 2 min. Posteriormente se decantó el residuo de isopropanol protegiendo el ADN el cual se encuentra precipitado como un botón blanco en el fondo del tubo ependorff, dejándose secar por 15 minutos aproximadamente. Para la hidratación del ADN a cada muestra se le agregaron de 300 a 500 µl de buffer TE dependiendo de la cantidad de DNA obtenido, dejándose incubar a 65°C por una hora. Para el almacenamiento en espera de la

realización de PCR se mantuvo a 4°C, ya transferido a un crio tubo. A partir de las muestras obtenidas se realizó PCR por el método de la 5' exonucleasa TaqMan.

9.12. Selección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

La selección de los SNPs se realizó en base a los hallazgos asociados con enfermedades de la vía aérea (asma, rinitis y poliposis nasal) en la literatura médica y en la base de SNP- database de la NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) de los Estados Unidos.

SNP	Cr	Gen		Cambio	Ancestral	MAF
		Símbolo	Posición			
rs1800629	6	<i>TNF</i>	-308	G/A	G	A=0.110
rs361525			-238	G/A	G	A=0.046
rs16944	2	<i>IL1B</i>	-511	G/A	A	A=0.462
rs1818879	7	<i>IL8</i>	+5485	A/G	G	A=0.424
rs4073	4	<i>IL6</i>	-251	A/T	A	T=0.492

9.13. Genotipificación por TaqMan.

Se utilizó el ensayo de 5' exonucleasa para la amplificación y detección de alelos específicos en las muestras de DNA genómico purificado, cada ensayo TaqMan contiene 2 cebadores para amplificar la secuencia de interés y 2 sondas TaqMan para la detección de alelos, lo que nos permite determinar el genotipo de los 2 alelos posibles. El ensayo determina la presencia o ausencia de un SNP basado en el cambio de la fluorescencia asociada a las sondas, ya que se encuentran marcadas con un fluoróforo en el extremo 5' (VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2), ambas sondas tienen en el extremo 3' un quencher el cual inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda no hibride con la secuencia específica de DNA, una vez que se haya dado la hibridación de la sonda con el DNA si se encontrará la presencia del polimorfismo la sonda TaqMan se unirá a una secuencia homóloga y la polimerasa degradará el quencher, lo que dará como resultado la liberación de fluorescencia, por lo que será posible la identificación del alelo basándonos en el tipo de emisión. El programa de ciclaje utilizado fue el siguiente:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-read	60°C	1 min	1
	50°C	2 min	1
Cuantificación absoluta	95°C	10 min	1
	95°C	15 seg	40
	60°C	1 min	
Post Read	60°C	1min	1

9.14 Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.20. Se realizó análisis univariado de las variables cuantitativas las cuales fueron sometidas a prueba de normalidad con prueba de Shapiro-Wilk y kolmogorov Smirnov. Para las variables cualitativas se obtuvo la frecuencia, posteriormente se realizó el análisis bivariado para comparar una variable independiente cuantitativa con una variable dependiente con tres categorías, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis obteniendo un valor de p , para la comparaciones entre frecuencias alélicas y genotípicas vs grupos de estudio (EREA, asma y controles) se utilizó el programa Epi Info versión 6.04., mediante la prueba de χ^2 obteniendo valor de p , considerándolo significativo si es <0.05 , razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95% (IC 95%).

9.15 Aspectos éticos y legales.

A todos los participantes del estudio se les entregó consentimiento informado. El estudio no representó ningún tipo de riesgo para los pacientes y voluntarios y tuvo la aprobación del comité de ética del INER bajo el registró: B14-12.

10. Resultados.

10.1 Características clínicas de los sujetos de estudio.

Se incluyeron 78 pacientes con EREA, 135 pacientes asmáticos y 134 voluntarios sin características compatibles con asma y/o EREA. La distribución de hombres y mujeres fue similar en los pacientes con EREA y asma sin embargo se invirtió en el grupo control. Con respecto al reto de metacolina el volumen espiratorio forzado en 1 segundo basal se encuentra disminuido en los voluntarios sanos en comparación con el de los pacientes ($p=0.001$), sin embargo el decremento que ocasiona el colinérgico en este parámetro es menor en este grupo cuando se contrasta con los pacientes con intolerancia a la aspirina y en asmáticos ($p<0.001$)-Figura1. Las mediciones del flujo nasal total (FNT) son mejores en los pacientes con intolerancia a la aspirina que en cualquier otro grupo ($p=0.01$) no obstante la disminución del FNT posterior a la administración de lisin aspirina se presenta con mayor intensidad en este mismo grupo ($p<0.001$)-Figura 2, los niveles séricos de eosinófilos e Ig E son significativamente menores en los voluntarios en comparación con los grupos de pacientes ($p=0.001$), siendo el grupo EREA el que contiene los niveles de mayor cantidad para ambos marcadores; con respecto a la sensibilidad a alérgenos esta tuvo la misma distribución en los tres grupos de estudio.

10.2 Discriminación alélica variantes tipo SNP.

Se genotificaron 5 SNPs localizados en 4 genes involucrados en la respuesta inflamatoria rs1800629 y rs361525 (*TNF*), rs16944(*IL1*), rs181879 (*IL6*) y rs4073 (*IL8*). En las tablas 2 y 3 se demuestran la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs asociados con la inflamación en tres grupos de comparación; pacientes con EREA, asmáticos y voluntarios, realizándose contraste de las frecuencias entre los grupos (EREA vs asma, ERA vs voluntarios y asma vs voluntarios).

Evaluamos las frecuencias alélicas y genotípicas de 5 SNPs en 4 genes que previamente han sido asociados a enfermedades inflamatorias tanto sistémicas como respiratorias; los resultados de la genotipificación en controles, nos muestran que la frecuencia más baja para el alelo menor entre los SNPs estudiados corresponde al alelo A del rs1800629 de TNF, presentándose en casi el 5% de los controles, hallazgo que refuerza estudios previos con este SNP en población mexicana.

En el estudio de asociación genética, comparamos los grupos de pacientes con EREA y asma con el grupo de controles, además de compararlos entre grupos de pacientes (EREA vs asma).

De los 5 SNPs analizados en los 3 grupos de comparación solo se encontró asociación estadísticamente significativa cuando se comparó las frecuencias alélicas del rs16944 (*IL1*), el alelo A entre el grupo EREA (44.87%) vs asma (32.59%), $p=0.015$, OR: 1.68 IC95% (1.10-2.58), el otro SNP donde se reporta asociación es con el alelo A del rs181879, pero solo entre el contraste de los grupos Asma vs voluntarios (62.59% vs 71.26%), $p=0.04$, OR: 1.48 e IC95% (1.02 - 2.16).

Sin embargo solo se mantiene la asociación en genotipos con el rs16944 (*IL1*) entre la comparación de los grupos ya mencionada con el homocigoto AA, $p=0.018$, OR = 2.98 IC = 95% (1.17 - 7.82). En el caso del rs181879 (*IL6*), se describe tendencia estadística también para el homocigoto AA, $p=0.059$, OR = 0.61, IC = 95% (0.37-1.02).

Tabla 1. Característica clínicas de los pacientes con EREA, asma y voluntarios.

	EREA	Asma	Control	p
N (número)	78	135	134	
Género % (H/M)	39.7/60.2	36.2/63.7	58.95/41.0	
Edad - años	44 (34-53)‡	30.5 (20-42)‡	23 (21.7-29.2)‡	
VEF₁ basal RM (%)	97 (88.5-109.5) ‡	100 (90-118) ‡	90 (85-98) ‡	0.001*
VEF₁ final RM (%)	77 (66-86)‡	84.5 (70-90.7) ‡	89 (85.75-98)	<0.001*
FNT basal mm³/L	805 (488-848)‡	649 (533.5-758) ‡	765 (631.2-956.7) ‡	0.01*
FNT final mm³/L	300 (234-446) ‡	616 (505-707) ‡	727 (632.7-926) ‡	<0.001*
Eosinofilos séricos/mm³	96.06‡	78.36‡	58.01‡	0.001*
Ig E sérica UI/mL ‡	99.3‡	79.52‡	53.52‡	0.001*
PC positivas, (%)	38	36	24	0.193†

H-Hombres, M- mujeres, VEF₁, volumen espiratorio forzado en 1 segundo, RM, reto con metacolina, FNT, flujo nasal total, PC- prueba cutánea, ‡ p50- percentil 50 (rango intercuartilar) * valor de p con prueba de Kruskal-Wallis, †valor de p con prueba de χ^2 (3x2).

Tabla 2. Distribución y comparación de las frecuencias alélicas de los pacientes con EREA, asma y voluntarios.

Gen/SNP	EREA n=78		Asma n=135		Controles n=134		p	OR	IC (95%)
	n	%	n	%	n	%			
<i>TNF</i>									
<i>rs1800629</i>									
G	144	92.31	259	95.93	256	95.52			
A	12	7.69	11	4.07	12	4.47			
<i>rs361525</i>									
G	141	90.38	252	93.33	252	94.02			
A	15	9.62	18	6.67	16	5.97			
IL1B <i>rs16944</i>									
G	86	55.13	182	67.41	166	61.94	0.015*	0.59	0.39-0.91
A	70	44.87	88	32.59	102	38.05		1.68	1.10-2.58
IL6 <i>rs181879</i>									
A	101	64.74	169	62.59	191	71.26	0.04†	1.48	1.02 - 2.16
G	55	35.26	101	37.41	77	28.73		0.67	0.46-0.98
IL8 <i>rs4073</i>									
A	103	66.03	165	61.11	169	63.05			
T	53	33.97	105	38.89	99	36.94			

*Cuando se compara EREA vs Asma (EvsA), † Cuando se compara Asma vs control AvsC, p= Valor de p con corrección de Yates, OR=Razón de momios, IC =Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de SNPs en genes relacionados a inflamación en pacientes con EREA vs asma.

Gen/SNP	EREA		Asma		Controles		p	OR	IC (95%)
	n= 78	FG (%)	n=135	FA (%)	n=134	FA (%)			
TNF									
rs361525									
GG	66	0.846 (84.62)	125	0.926 (92.59)	122	0.910 (91.04)			
GA	12	0.154 (15.38)	9	0.067 (6.67)	12	0.090 (8.96)			
AA	0		1	0.007 (0.74)	0				
rs1800629									
GG	63	0.808 (80.77)	119	0.881 (88.15)	118	0.881 (88.06)			
GA	15	0.192 (19.23)	14	0.104 (10.37)	16	0.119 (11.94)			
AA	0		2	0.015 (1.48)	0				
IL1B rs16944									
GG	23	0.295 (29.49)	57	0.422 (42.22)	47	0.351 (35.07)			
GA	40	0.513 (51.28)	68	0.504 (50.37)	72	0.537 (53.73)			
AA	15	0.192 (19.23)	10	0.074 (7.41)	15	0.112 (11.19)	0.018*	2.98	1.17-7.82
IL6 rs1818879									
AA	32	0.410 (41.03)	54	0.400 (40.00)	70	0.522 (52.24)	0.059†	0.61	0.37-1.02
GA	37	0.474 (47.44)	61	0.452 (45.19)	51	0.381 (38.06)			
GG	9	0.115 (11.54)	20	0.148 (14.81)	13	0.097 (9.70)			
IL8 rs4073									
AA	35	0.449 (44.87)	54	0.400 (40.00)	53	0.396 (39.55)			
AT	33	0.423 (42.31)	57	0.422 (42.22)	63	0.470 (47.01)			
TT	10	0.128 (12.82)	24	0.178 (17.78)	18	0.134 (13.43)			

*Cuando se compara EREA vs Asma. †Cuando se compara Asma vs Controles. p= Valor de p con corrección de Yates, OR=Razón de momios, IC =Intervalo de confianza al 95%.

11.0 Discusión.

El análisis presentado tuvo como objetivo evaluar la asociación genética de polimorfismos de un solo nucleótido en genes que codifican para citocinas proinflamatorias en pacientes mexicanos con Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina, comparando con un grupo patológico relacionado a la enfermedad en estudio y otro sin condiciones patológicas asociadas con los componentes de la EREA. La distribución en cuanto al género en el grupo EREA es similar a lo reportado en investigaciones acerca de la historia natural de la enfermedad (1 hombre:1.2 mujeres)⁵¹. Cabe señalar que ambos grupos de pacientes (EREA y asma) son pacientes de las diversas clínicas del INER, donde son invitados a participar y por lo tanto ya han recibido algún tipo de terapia con esteroides (nasal e inhalada) e inclusive resolución quirúrgica para el control de su sintomatología nasal, lo cual explica el comportamiento de los valores basales en las pruebas de provocación, tanto de los flujos pulmonares y nasales de estos dos grupos de estudio, los cuales son muy similares e inclusive en algunas comparaciones mejores aunque no significativamente en comparación con el grupo control.

En el presente estudio se reporta la tendencia estadística ($p=0.056$) del rs1818879 (*IL6*) entre el grupo asmático vs control, el gen de la interleucina 6 ha sido implicado en la patogénesis del asma, debido a que controla la producción de factores proinflamatorios y antiinflamatorios en las vías respiratorias, sobre todo en la inflamación alérgica⁵². En 2009 Harviet Corvol analizó la asociación entre respuesta al tratamiento con broncodilatador con los polimorfismos de *IL6* -174C→G (rs1800795), -572C→G (rs1800796), Pro32Ser (rs2069830) y Asp162Glu (rs13306435) para este gen en población asmática latinoamericana (mexicana y puertorriqueña) y africana, concluyendo que ninguno de los SNPs estuvo asociado con la respuesta al medicamento, sin embargo esta tendencia cambio cuando se realizó la comparación por haplotipos demostrando que la interacción gen-gen era contextual y depende de la ancestría poblacional, esta interacción es

importante al evaluar la respuesta al fármaco (albuterol) que fue superior en latinos, pero de menor respuesta en los afroamericanos⁵³. Otra evaluación para uno de los SNPs de *IL6* -174C→G (rs1800795), fue analizada por Saeed Daneshmandi al evaluar un patrón de SNPs relacionados con el antecedente de asma alérgica en población iraní sin embargo no demostró asociación estadística significativa cuando se le comparó con el antecedente de alergia y las mediciones de flujos pulmonares⁵⁴. El rs1818879 que se evaluó en el presente estudio es un SNP asociado a inflamación pulmonar *IL6* está involucrada en la síntesis de fibrinógeno a nivel pulmonar fenómeno que puede estar involucrado en la remodelación pulmonar del grupo asmático con o sin intolerancia, lo que lo asocia como un factor de protección en el grupo de voluntarios⁵⁵.

Con respecto a la distribución del alelo menor (A) para el rs16944 entre los grupos EREA vs asma demostró obtener una diferencia estadísticamente significativa, la cual se mantiene al analizar el genotipo homocigoto para esta variante entre los mismos grupos de comparación; en este contexto el gen de *IL1* y sus proteínas, *IL1α* e *IL1β*, son isoformas con actividad biológica similar que median la inflamación neutrofílica en el asma⁵⁶, ambos requieren para la expresión de su actividad biológica la presencia del receptor de *IL-1* (*IL1R*). Borish Len 1999 demostró que esta interleucina estaba incrementada en líquido bronquioalveolar en pacientes con asma en comparación con sujetos controles, mediante análisis de hibridación *in situ* reportó que se sintetizaba a nivel de macrófagos alveolares⁵⁷, este hallazgo fue consistente con lo reportado por Brasier AR en 2008, quien asoció fenotipos asmáticos de acuerdo al patrón de citocinas, encontrado en lavado bronquioalveolar, postulando que la reducción de *IL1R* puede ser el resultado compensatorio a una mayor intensidad de la señalización mediada por *IL-1β*⁵⁸, la cual promueve la inflamación neutrofílica y conduciendo a un asma más severa, característica del asma que compone a la EREA. Este fenómeno pudo ser comprobado por Lappalainen en modelo murino ya que esta citocina está involucrada en la síntesis de elastina que se halló en ratones que fueron

estimulados con IL1 β humano, contribuyendo así en la remodelación pulmonar ⁵⁹, como también lo está en su participación en la síntesis de ácido hialurónico ³ demostrado por Wilkinson TS, además de promover un microambiente para la expresión de otras citocinas inflamatorias como IL-6, IL-8 e IL-17A que potencializan este fenómeno ⁶⁰, con respecto a esta última citocina, estudios experimentales en asma indican que IL1 β puede inducir la diferenciación de células Th17 mediante IL-17, estimulando así a la inflamación neutrofílica pulmonar ⁶¹ En 2008 Bhawna analizó IL1 β entre pacientes hindúes con asma y EPOC(Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), demostrando que los pacientes con asma tenían niveles mayor en comparación con los de EPOC ($p < 0.05$), la conclusión de su investigación fue que podría utilizarse a IL1 β como biomarcador para distinguir entre estas 2 enfermedades ⁶², aseveración que resulta cuestionable. La inflamación mediada por IL1 β no está ligada exclusivamente a enfermedades pulmonares, pero su participación en la fisiopatología a nivel del órgano nasal se comporta similarmente a lo antes demostrado, desde 1993 Liu Y y Hamaguch en 1994, demostraron la presencia de niveles aumentados de IL1 β e IL1 α a nivel de la mucosa nasal en pacientes japoneses que padecían rinosinustis crónica con poliposis nasal, siendo la primera detectada significativamente en mayor concentración que su homónima ($p < 0.01$, para ambas investigaciones) y expresada en mayor cantidad en sujetos jóvenes ($p < 0.01$) ⁶³⁻⁶⁴, esto podría estar asociado a que los pacientes con EREA padecen con mayor frecuencia eventos infecciosos recurrentes que inciden en su descontrol nasal y pulmonar, en 1997 Bachert puntualizó que las citocinas proinflamatorias IL1 β , IL6 y en especial el quimioatrayente de neutrófilos IL8 desempeñan un papel dominante en la sinusitis aguda bacteriana, como se ha demostrado también en la rinitis alérgica y la de etiología viral, además de aumentar la expresión de moléculas de adhesión intracelular (intercellular adhesion molecule-1- ICAM-1 y endothelial-leukocyte adhesion molecule-1- ELAM-1) en la sinusitis crónica maxilar así mismo también se encuentran expresada otras citocinas inflamatorias como IL6, IL8, y TNF- α ⁶⁵.

La importancia de estas citocinas estriba en que cuando existe una terapia se usan como biomarcadores para validar la evolución hacia la mejoría de la enfermedad, creando así una validez de constructo, esto lo ha demostrado Furukido en 2005 al evaluar la mejoría de los pacientes con sinusitis a los que se les ha administrado solución salina y betametasona a través del catéter YAMIK, encontrando una disminución de IL1 e IL8 tres semanas después de iniciado el tratamiento, esto se corroboró con mejoría de escala de síntomas y evidencia radiológica ⁶⁶.

La importancia de estas evidencias a diferentes niveles como el clínico, pero sobre todo a nivel de expresión de proteínas, ha llevado al objetivo de establecer una asociación genética para esta interleucina. Se han descrito diferentes polimorfismos en el gen de la IL-1 β (*IL1B*), y al menos 2 de ellas se sabe que influyen en la producción de proteínas: uno se encuentra dentro de la región promotora en la posición -511 y el otro en el exón 5 ⁶⁷. Con respecto a ello se analizó en 2003 por Karjalainen la asociación exclusivamente con el polimorfismo de *IL1A* (+4845G \rightarrow T) en pacientes asmáticos con antecedente de poliposis nasosinusal, no reportándose por el autor ningún tipo de asociación con el SNP -511 ($p=0.84$) entre los grupos mencionados ⁶⁸. En 2006 Yuan Kai Cheng estudió los polimorfismos del promotor del gen *IL1B* (-511 C \rightarrow T, +3953 C \rightarrow T e IL1RN -intrón 2), reportando que existían diferencias significativas solo con este último en los pacientes que padecían sinusitis vs sujetos control ($p<0.05$), no así con el localizado a nivel del promotor ($p=0.69$) ⁶⁹. En 2007, Erbek estudió los genotipos derivados del polimorfismos de *IL1A* (-4845 GT), *IL1B* (-511 CC) y de TNF(-238 AA y -308 GA) en población turca con poliposis nasal ³⁹ y replicado por Mfunu en Canadá el cual asoció el alelo menor T de *IL1A* rs17561 ($p=0.02$, OR=1.48), rs2856838 ($p=0.003$, OR 0.63) y rs2048874 ($p=0.01$, OR=0.57), rs1800587 ($p=0.02$, OR=1.49), teniendo un similar resultado para el SNP de *IL1B* entre las dos poblaciones ($p=0.86$) ⁷⁰. Este es el primer estudio de asociación genética en población latina, en específico de población mexicana con EREA, que demuestra asociación entre el polimorfismo del gen de *IL1B* rs16944, en pacientes con EREA, sin

embargo es contrastante que las evidencia antes demostradas descartan este tipo de asociación y las que la sostienen la involucran con polimorfismos localizados en el gen de *IL1A*, pero solo en pacientes con sinusitis crónica con poliposis nasosinusal. Como anteriormente se ha explicado la EREA es una enfermedad que contiene al menos esta entidad pero además de otras 2 entidades patológicas, a expensas de una posible tercera condición que es la alergia, lo que podría incrementar la inflamación de los pacientes y por lo tanto su susceptibilidad con esta entidad, hay que tomar en consideración que la mayoría de los estudios se han realizado en poblaciones caucásica europea y asiática, lo que establece una diferencia esencial al momento de realizar la comparación entre diferentes poblaciones con un bagaje genético tan amplio, como la población mestiza-mexicana.

12. Conclusión.

El presente estudio establece una asociación a la susceptibilidad de EREA, con el genotipo AA del rs16944 (*IL1B*) el cual se encuentra incrementado casi en 3 veces más en comparación con los pacientes que padecen asma, tomando como base los resultados obtenidos en el presente estudio resulta deseable realizar trabajos de expresión para los productos que codifican este gen, en sitios directos de afección como tejido nasal y pulmonar con el objetivo de correlacionar con la enfermedad, tomando en cuenta que solo se explica el componente inflamatorio y no la etiopatogenia inmunológica de la enfermedad.

13. Bibliografía

- 1.- Hirschberg, V.G.S., 1902. Mitteilung über einen Fall von Nebenwirkung des Aspirin. A case report on the side effects of aspirin. Dtsch. Med. Wochenschr., 28, 416 and 1990. Allergy Proc. 11, 249–250.
- 2.- F Widal, P Abrami, J Lermoyez. Anaphylaxie et idiosyncrasie. La Presse Médicale, Paris, 1922, 30: 189-192.
- 3.-Samter M & Beers R F, Intolerance to aspirin: clinical studies and consideration of its pathogenesis. Ann. Intern. Med. 68:975-83, 1968.
- 4.- Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(5):913-21
- 5.- Jenkins C, Costello J, Hodge L. Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. BMJ. 2004; 21;328(7437):434.
- 6.- Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. Eur Respir J 1990;3(5):588–93.
- 7.- Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Black C, Markendorf A, Schmitz-Schumann M, Lee TH. Urinary leukotriene E4 after lysine-aspirin inhalation in asthmatic subjects. Am Rev Respir Dis. 1992 ;146(6):1531-4
- 8.- Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Black C, Markendorf A, Schmitz-Schumann M, Lee TH. Increased urinary LTE4 excretion following inhalation of LTC4 and LTE4 in asthmatic subjects. Eur Respir J. 1994;7(5):907-13.
- 9.- Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. Eur Respir J. 2000 ;16(3):432-6.
- 10.- Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. The natural history and clinical characteristics of aspirin-exacerbated respiratory disease. Ann Allergy Asthma Immunol. 2002;89(5):474-8
- 11.- Lee RU, Stevenson DD. Aspirin-exacerbated respiratory disease: evaluation and management. Allergy Asthma Immunol Res. 2011 ;3(1):3-10.
- 12.- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Relationship of inhibition of prostaglandin biosynthesis by analgesics to asthma attacks in aspirin-sensitive patients. Br Med J. 1975 11;1(5949):67-9.
- 13.- S Bianco, M Robuschi, and G Petrigni. Aspirin sensitivity in asthmatics. Br Med J (Clin Res Ed). 1981, 10; 282(6258): 146
- 14.- Milewski M, Mastalerz L, Nizankowska E, Szczeklik A. Nasal provocation test with lysine-aspirin for diagnosis of aspirin-sensitive asthma. J Allergy Clin Immunol. 1998;101(5):581-6.

- 15.-Melillo G, Balzano G, Bianco S, Dahlén B, Godard P, Kowalsky ML, Picado C, Stevenson DD, Suetsugu S. Report of the INTERASMA Working Group on Standardization of Inhalation Provocation Tests in Aspirin-induced Asthma. Oral and inhalation provocation tests for the diagnosis of aspirin-induced asthma. *Allergy*. 2001;56(9):899-911.
- 16.- Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczyńska M, Picado C, Scadding G, Kowalski ML, Setkowicz M, Ring J, Brockow K, Bachert C, Wöhrl S, Dahlén B, Szczeklik A. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis of aspirin hypersensitivity. *Allergy*. 2007;62(10):1111-8.
- 17.- Dahlén SE, Malmström K, Nizankowska E, Dahlén B, Kuna P, Kowalski M, Lumry WR. Improvement of aspirin-intolerant asthma by montelukast, a leukotriene antagonist: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 1;165(1):9-
- 18.- Pleskow WW, Stevenson DD, Mathison DA, Simon RA, Schatz M, Zeiger RS. Aspirin desensitization in aspirin-sensitive asthmatic patients: clinical manifestations and characterization of the refractory period. *J Allergy Clin Immunol*. 1982;69:11-9.
- 19.- Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. Long-term treatment with aspirin desensitization in asthmatic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):180-6.
- 20.- Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Clinical patterns of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;60(5):276-84.
- 21.- Kim SH, Park HS. Pathogenesis of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6(1):17-22.
- 22.- Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol*. 2006 8;533(1-3):145-55.
- 23.- Cowburn AS, Sladek K, Soja J. Overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest* 1998; 101:834–846.
- 24.- Sampson AP, Cowburn AS, Sladek K, et al. Profound overexpression of leukotriene C4 synthase in bronchial biopsies from aspirin-intolerant asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:355–357.
- 25.- Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007 1;357(18):1841-54.
- 26.- Hui Y, Funk CD. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1549–1557. 15 Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res* 2004; 50:1–11.

27. Sánchez-Borges M. NSAID hypersensitivity (respiratory, cutaneous, and generalized anaphylactic symptoms). *Med Clin North Am.* 2010;94(4):853-64.
- 28.- Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet.* 1997 Nov 29;350(9091):1599-600..
- 29.- Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki R, Higashi N. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:936-42.
- 30.- Van Sambeek R, Stevenson DD, Baldasaro M, Lam BK, Zhao J, Yoshida S. 5' Flanking region polymorphism of the gene encoding leukotriene C4 synthase does not correlate with the aspirin-intolerant asthma phenotype in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:72-6.
- 31.- In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest.* 1997 1;99(5):1130-7.
- 32.- . Kim SH, Bae JS, Suh CH, Nahm DH, Holloway JW, Park HS. Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: a positive association with airway hyperresponsiveness. *Allergy* 2005;60:760-5.
- 33.- Kim SH, Choi JH, Holloway JW, Suh CH, Nahm DH, Park CS. Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with ASA-induced urticaria and ASA-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. *J Korean Med Sci* 2005
- 34.-. Dekker JW, Nizankowska E, Schmitz-Schumann M, Pile K, Bochenek G, Dyczek A,. Aspirin-induced asthma and HLA-DRB1 and HLA-DPB1 genotypes. *Clin Exp Allergy* 1997;27:574-7.
- 35.-. Park HS, Kim SH, Sampson AP, Lee KW, Park CS. The HLA-DPB1*0301 marker might predict the requirement for leukotriene receptor antagonist in patients with aspirin intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:688-9.
- 36.- Park TJ, Kim JH, Bae JS, Park BL, Cheong HS, Pasaje CF. Potential association between ANXA4 polymorphisms and aspirin-exacerbated respiratory disease. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(3):164-71.
- 37.-Pasaje CF, Bae JS, Park BL, Cheong HS, Jang AS. A possible association between ZNRD1 and aspirin-induced airway bronchoconstriction in a Korean population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(3):193-200.
- 38.-. Park TJ, Kim JH, Park BL, Cheong HS, Bae JS. Potential association of DCBLD2 polymorphisms with fall rates of FEV(1) by aspirin provocation in Korean asthmatics. *J Korean Med Sci.* 2012;27(4):343-9.
- 39.- Kim JY, Kim JH, Park BL, Pasaje CF, Bae JS, Potential association of DDR1 genetic variant with FEV1 decline by aspirin provocation in asthmatics. *J Asthma.* 2012;49(3):237-42.

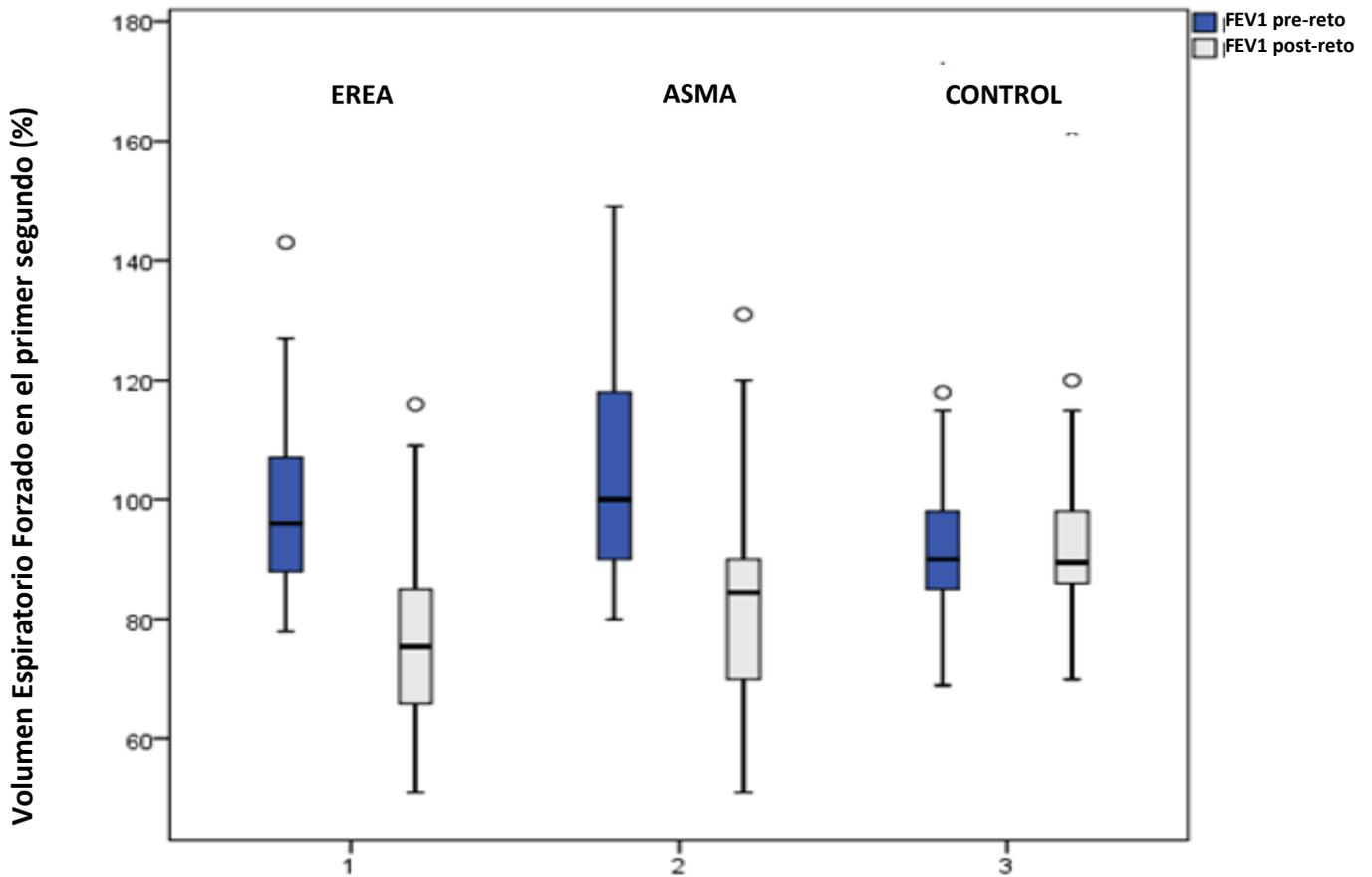
- 40.- Oh SH, Kim YH, Park SM, Cho SH, Park JS. Association analysis of thromboxane A synthase 1 gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(3):351-63.
- 41.- Lee JS, Kim JH, Bae JS, Kim JY, Park TJ. Association of CACNG6 polymorphisms with aspirin-intolerance asthmatics in a Korean population. *BMC Med Genet*. 2010 Sep 23;11:138.
- 42.- Palikhe NS, Kim SH, Cho BY, Ye YM, Choi GS, Park HS. Genetic variability in CRTH2 polymorphism increases eotaxin-2 levels in patients with aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy*. 2010;65(3):338-46.
- 43.- Kim SH, Yang EM, Lee HN, Choi GS, Ye YM, Park HS. Association of the CCR3 gene polymorphism with aspirin exacerbated respiratory disease. *Respir Med*. 2010;104(5):626-32.
- 44.- Lee EH, Park BL, Park SM, Lee SH, Park SW. Association analysis of RGS7BP gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(4):292-300.
- 45.- Palikhe NS, Kim SH, Kim JH, Losol P, Ye YM, Park HS. Role of Toll-like Receptor 3 Variants in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011;3(2):123-7.
- 46.- Kohyama K, Abe S, Kodaira K, Yukawa T, Hozawa S, Sagara H, Kurosawa M. IL-13 and IL-17A gene polymorphisms in Japanese patients with aspirin-exacerbated Ann Allergy Asthma Immunol. 2011;107(6):510-6.
- 47.- Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(1):82-5.
- 48.- Wu H, Romieu I, Shi M, Hancock DB, Li H. Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2):321-327.
- 49.- S. S. Erbek, E. Yurtcu, S. Erbek, F. B. Atac, F. I. Sahin, and O. Cakmak, "Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis," *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 133, no. 7, pp. 705–709, 2007.
- 50.- Stemmler S, Arinir U, Klein W, Rohde G, Hoffjan S. Association of interleukin-8 receptor alpha polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Genes Immun*. 2005 6(3):225-30
- 51.- Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. 2000;16(3):432-6.

- 52.- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Review Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006 Aug; 80(2):227-36
- 53.- Corvol H, De Giacomo A, Eng C, Seibold M, Ziv E, Chapela R. Genetic ancestry modifies pharmacogenetic gene-gene interaction for asthma. *Pharmacogenet Genomics.* 2009; 19(7):489-96.
- 54.- Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Pourpak Z, Heidarnazhad H, Kalvanagh PA. Cytokine gene polymorphism and asthma susceptibility, progress and control level. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1845-53.
- 55.- Yanbaeva DG, Dentener MA, Spruit MA, Houwing-Duistermaat JJ, Kotz D. IL6 and CRP haplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2009 Mar 9;10:23.
- 56.- Wanderer AA. Interleukin-1beta targeted therapy in severe persistent asthma (SPA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): proposed similarities between biphasic pathobiology of SPA/COPD and ischemia-reperfusion injury. *Isr Med Assoc J.* 2008;10(12):837-42.
- 57.- Borish L, Mascali JJ, Dishuck J, Beam WR, Martin RJ, Rosenwasser LJ. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 β in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol* 1992;149:3078-82.
- 58.- Brasier AR, Victor S, Ju H, Busse WW, Curran-Everett D. Predicting intermediate phenotypes in asthma using bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *Clin Transl Sci.* 2010;3(4):147-57.
- 59.- Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:311-18.
- 60.- Wilkinson TS, Potter-Perigo S, Tsoi C, Altman LC, Wight TN. Pro- and anti-inflammatory factors cooperate to control hyaluronan synthesis in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:92-9.
- 61.- Dragon S, Rahman MS, Yang J, Unruh H, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17 enhances IL-1 β mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;292:L1023-9.
- 62.- Mahajan B, Vijayan VK, Agarwal MK, Bansal SK. Serum interleukin-1beta as a marker for differentiation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers.* 2008 Nov;13(7):713-27.

- 63.- Liu Y, Hamaguchi Y, Taya M, Sakakura Y. Quantification of interleukin-1 in nasal polyps from patients with chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1993;250(2):123-5.
- 64.- Hamaguchi Y, Suzumura H, Arima S, Sakakura Y. Quantitation and immunocytological identification of interleukin-1 in nasal polyps from patients with chronic sinusitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;104(2):155-9.
- 65.- Bachert C, Van Cauwenberge PB. Inflammatory mechanisms in chronic sinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1997;51(4):209-17.
- 66.- Furukido K, Takeno S, Ueda T, Yajin K. Cytokine profile in paranasal effusions in patients with chronic sinusitis using the YAMIK sinus catheter with and without betamethasone. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005;262(1):50-4.
- 67.- Bioque G, Crusius JB, Koutroubakis I. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995;102:379- 383.
- 68.- Karjalainen J, Joki-Erkkilä VP, Hulkkonen J, Pessi The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults. *Allergy*. 2003;58(5):393-6.
- 69.- Cheng YK, Lin CD, Chang WC, Hwang GY, Tsai SW, Wan L, Tsai MH, Tsai JJ, Tsai FJ. Increased prevalence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients with chronic rhinosinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(3):285-90.
- 70.- L. Mfuna Endam, C. Cormier, Y. Bossé, A. Filali-Mouhim, and M. Desrosiers, "Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: a replication study," *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery*, vol. 136, no. 2, pp. 187–192, 2010.

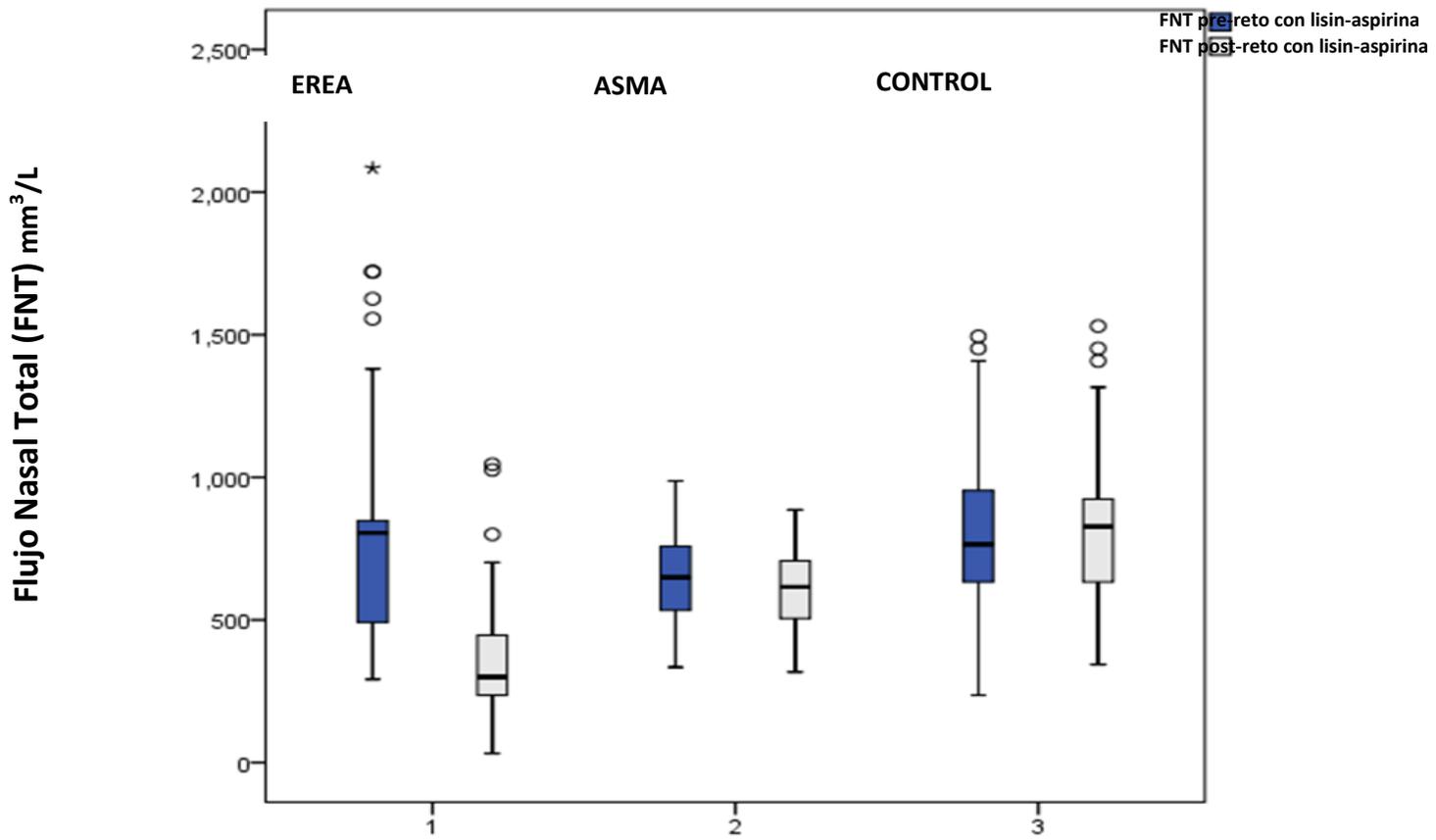
14.0 Anexos

Figura1. Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (FEV₁), pre y post reto con metacolina.



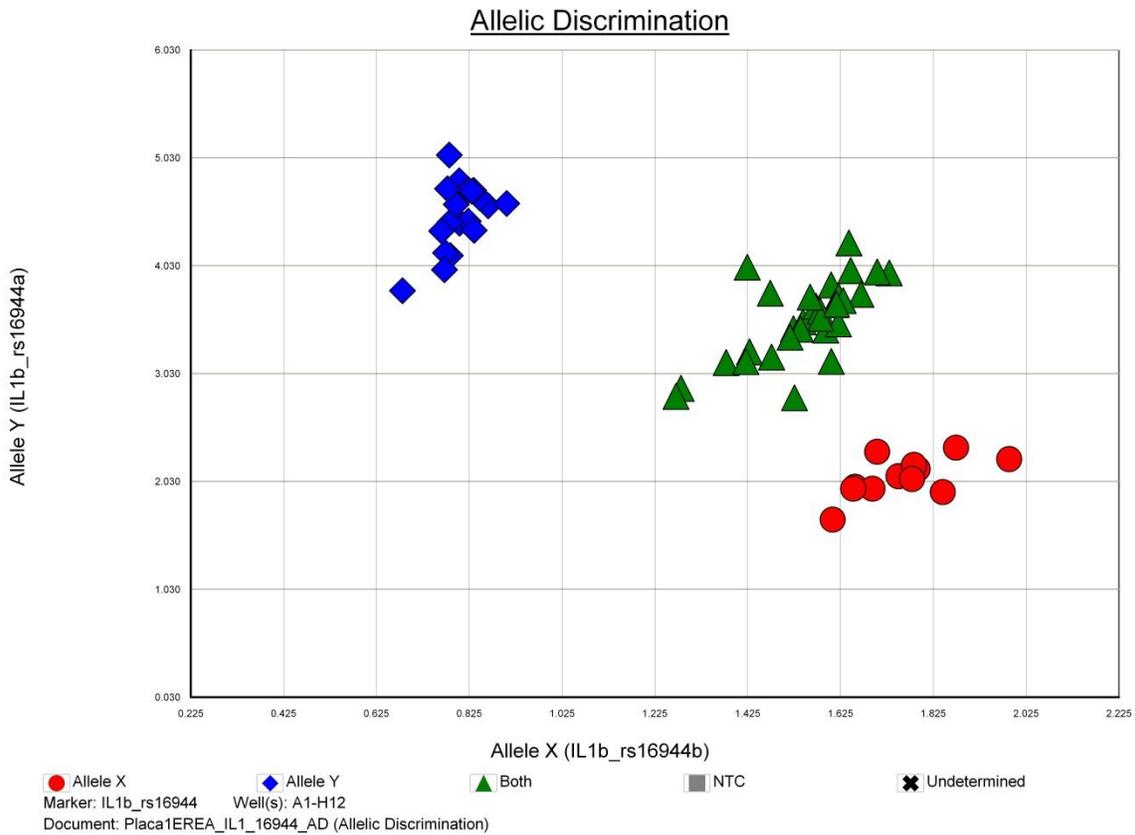
Comparación entre los VEF₁ entre los pacientes con EREA, asmáticos y controles pre metacolina y post metacolina.

Figura 2. Flujo Nasal Total (FNT) pre y post reto con lisin-aspirina.

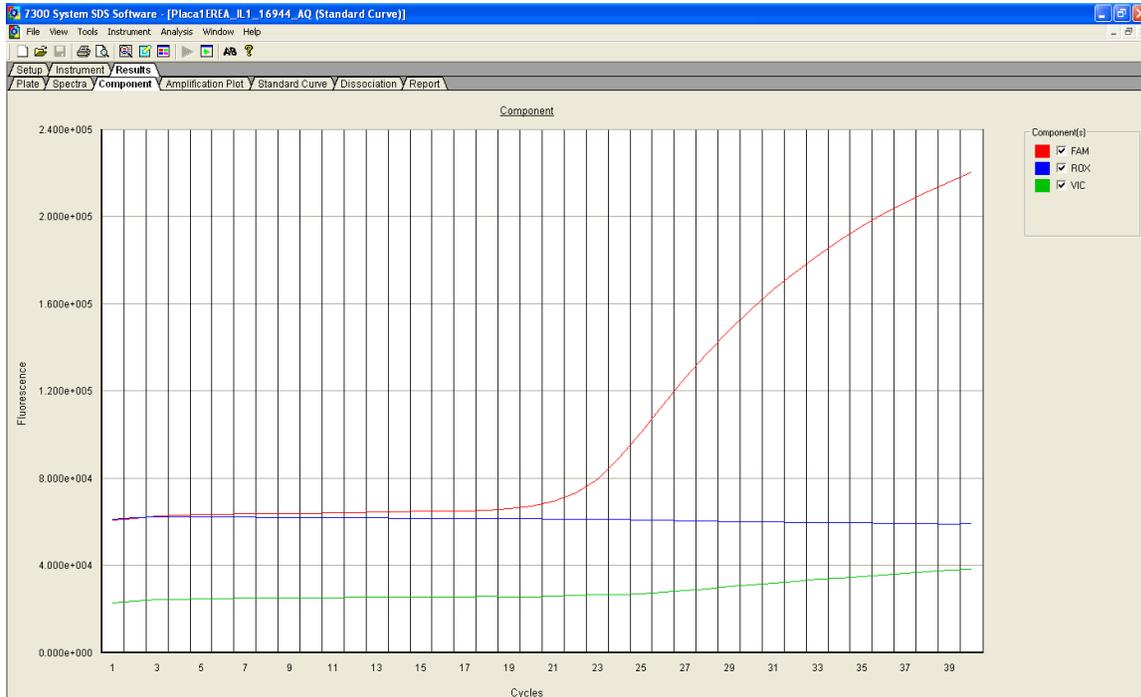


Comparación entre los FNT entre los pacientes con EREA, asmáticos y controles pre y post reto con lisin aspirina.

Figura 3. Discriminación Alélica de IL1B rs16944 en pacientes con EREA.

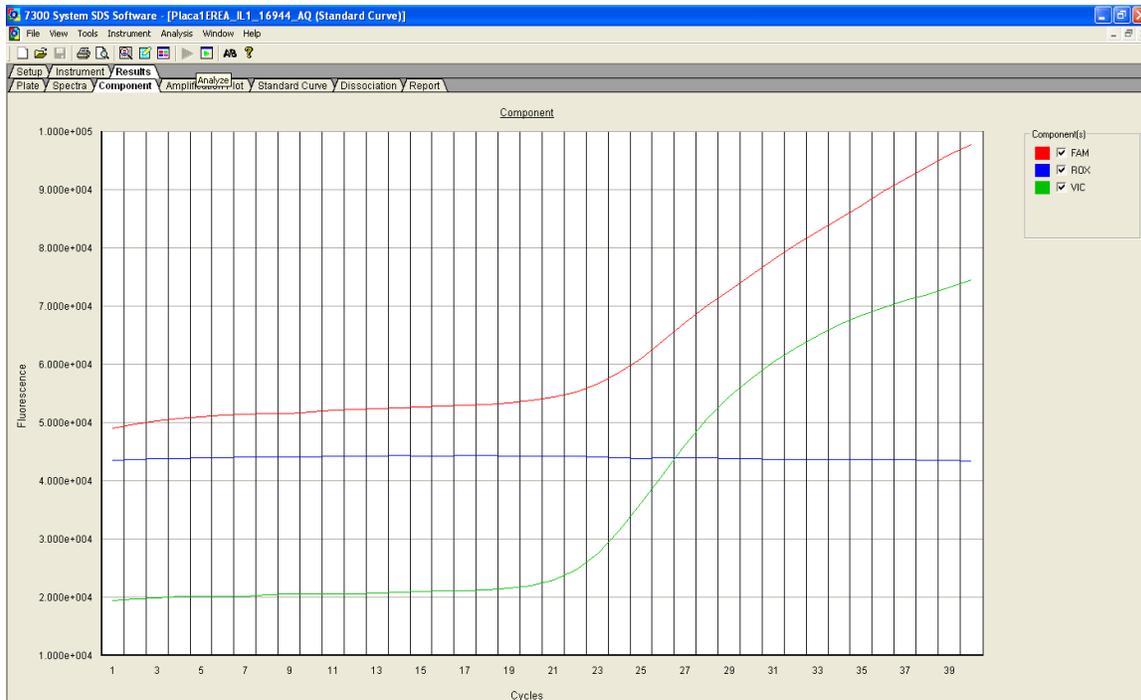


Ejemplo de un gráfico de discriminación alélica, los círculos representan los homocigotos para el alelo X (FAM), los triángulos a los heterocigotos, las unidades empleadas fueron unidades relativas de fluorescencia

Figura 4. Gráfico de amplificación en tiempo real.

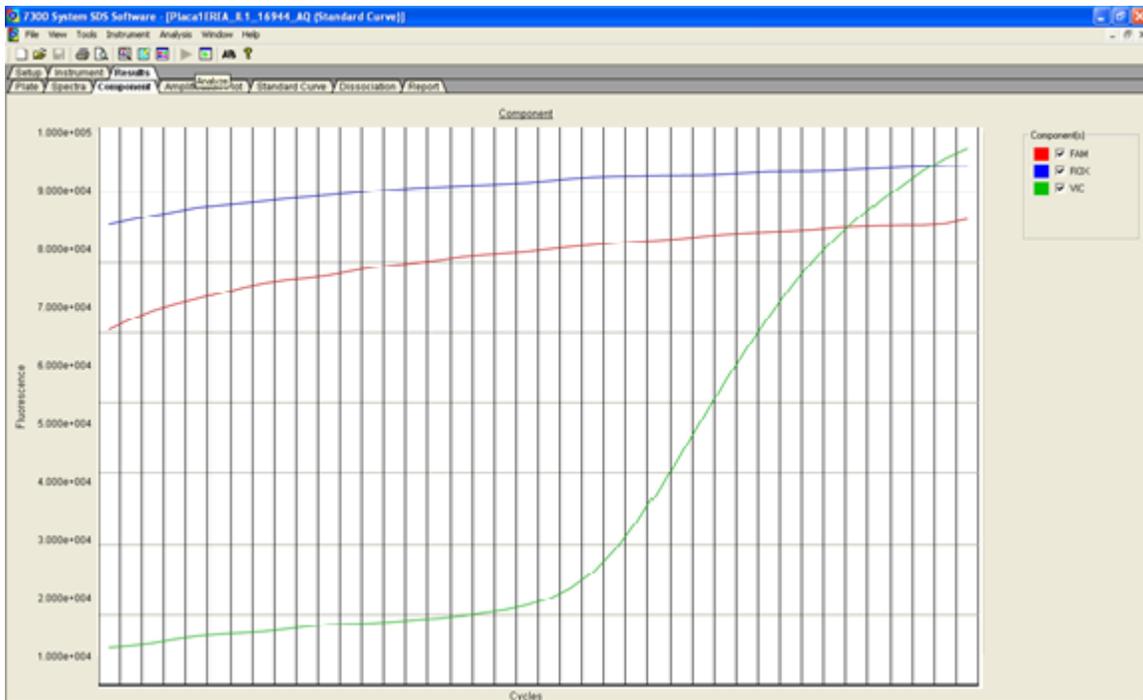
Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para sujetos homocigotos para el alelo X , la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

Figura 5. Gráfico de amplificación en tiempo real.



Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para sujetos heterocigotos, la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

Figura 6. Gráfico de amplificación en tiempo real.



Ejemplo de un gráfico de amplificación en tiempo real para sujetos homocigotos para alelo Y, la línea roja representa el alelo X (FAM), la línea verde el alelo Y (VIC) y la línea azul la referencia pasiva (ROX), las unidades utilizadas fueron unidades relativas de fluorescencia.

