

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DEL DIAGNÓSTICO



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

*ESTVDiO FARMACOGENÉTICO DE REACCIONES DE  
HiPERSENSiBiLiDAD A ANTiBiÓTiCOS BETA-LACTÁMiCOS Y A  
ANTiINFLAMATORiOS NO ESTERoiDEOS*

Memoria presentada por Dña. María Luisa Rivera Reigada

para optar al Título de Doctor

2015



Dedico este trabajo a mi madre por su amor incondicional, su fuerza y su enorme generosidad

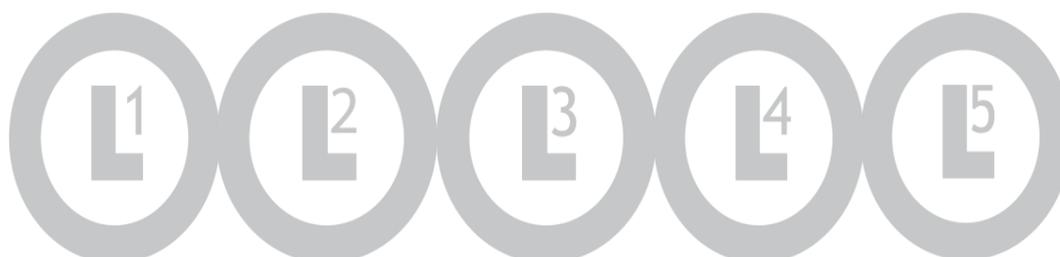


VNIVERSIDAD  
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# AGRADECIMIENTOS

---





## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ignacio Dávila González, director de esta tesis, por orientar la parte clínica de esta tesis siempre con una sonrisa y palabras de ánimo, por su dedicación, su apoyo y su buen sentido del humor.

A la Dra. Esther Moreno Rodilla, codirectora de esta tesis, por asesorarme en los aspectos clínicos de esta tesis, por su dedicación y ayuda a lo largo de este trabajo que ha resultado complicado en muchos momentos.

A la Dra. Catalina Sanz Lozano, codirectora de esta tesis, por su apoyo, su respaldo, por animarme y conseguir que viese siempre el lado positivo de las cosas.

A la Dra. María Isidoro García, tutora de esta tesis, por su apoyo incondicional, su capacidad de sacrificio y porque me ha enseñado muchísimas cosas a nivel profesional, pero sobre todo humano.

Al Dr. Félix Lorente Toledano por su disponibilidad, su cercanía y su ayuda en muchos aspectos en lo referente a temas burocráticos.

A Laura, David, Virginia y posteriormente Choni por su acogida en el Laboratorio de Inmunoalergia y por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.

A Juana por sus muchos momentos de dedicación enseñándome en el Laboratorio.

A Carmen por su paciencia, su alegría y sus consejos en los muchos momentos compartidos.

A todo el Servicio de Inmunoalergia gracias por su comprensión, paciencia y colaboración.

A todos los que forman parte del Servicio de Bioquímica y que he tenido la suerte de compartir con ellos 4 años maravillosos gracias por todo lo que me habéis enseñado, por acogerme y hacerme sentir como en casa, en especial a David, Iñaki, Aarón, Elena, M.Paz, Paqui, Charo, Belén, Julián, Lourdes, Teresa, Piedad y Cristina.

A mis amigos: Karen, Bárbara, Edwin, Antonio, María, Mikel, Miguel, Pino y Suso gracias por los grandes momentos, viajes, risas, pero sobre todo gracias por ser mi gran y querida familia en Salamanca.

A mi hermana porque no tengo palabras para describir la profunda admiración y cariño que siento hacia ella y porque en todos los momentos de mi vida siempre está ella apoyándome y respaldándome en cada uno de ellos.

A mis padres por su apoyo y amor incondicional, por todos los valores y la capacidad de sacrificio que me han inculcado, por estar siempre ahí y porque todo lo que soy se lo debo a ellos.

Para finalizar a mis abuelos que estén donde estén se sentirán muy orgullosos al igual que yo de ellos.

*“Nuestra sociedad, en la que reina un urgente deseo de riquezas y lujos, no entiende el valor de la ciencia. No se da cuenta de que la ciencia es una de las partes más preciosas de su patrimonio moral. Ni ha asumido de modo suficiente el hecho de que la ciencia está en la base de todo el progreso que aligera la carga de la vida y disminuye su sufrimiento”*

**Marie Curie**



# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
1.1 DEFINICIÓN DE REACCIÓN ADVERSA A FÁRMACOS .....	21
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS A FÁRMACOS.....	21
1.3 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALÉRGICAS O ALÉRGICAS A FÁRMACOS (RAF).....	25
DEFINICIÓN DE REACCIÓN ALÉRGICA A FÁRMACOS (RAF).....	25
CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS A FÁRMACOS .....	26
1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR FÁRMACOS .....	32
INCIDENCIA Y PREVALENCIA.....	33
1.5 REACCIONES ALÉRGICAS A LOS BETA-LACTÁMICOS.....	40
1.5.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANTIBIÓTICOS BL.....	40
1.5.2 INMUNOGENICIDAD Y ALERGENICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS BL .....	42
1.5.3 TIPOS DE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A BL.....	45
1.5.4 DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS BL.....	46
1.5.4.1 MÉTODOS “IN VIVO” .....	48
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA A BL .....</b>	<b>48</b>
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD NO INMEDIATA A BL .....</b>	<b>50</b>
<b>PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA.....</b>	<b>52</b>
1.5.4.2 MÉTODOS “IN VITRO” .....	53
<b>DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA .....</b>	<b>53</b>
1.6 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A LOS AINE .....	55
1.6.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS A AINE .....	55
1.6.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE .....	57
1.6.3 PATOGENIA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	58
1.6.4 DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	62
<b>HISTORIA CLÍNICA .....</b>	<b>62</b>
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS.....</b>	<b>63</b>
<b>PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA (PEC) .....</b>	<b>64</b>
<b>PRUEBAS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>65</b>

1.7 POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS.....	65
1.7.1 POLIMORFISMOS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A BL .....	66
1.7.2 POLIMORFISMOS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE .....	72
MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A EREA (AIA) .....	72
MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A ECEA (AIU).....	76
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>82</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>86</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>90</b>
4.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA.....	90
DATOS DE FILIACIÓN.....	90
DATOS CLÍNICOS Y ANÁLITICOS.....	90
PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE ALERGIA A BETA-LACTÁMICOS.....	90
1. ESTUDIO INICIAL O FASE I.....	91
2. REPETICIÓN DEL ESTUDIO O FASE II.....	94
3. DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL.....	95
4. DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA.....	96
PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	97
1.- En caso de presentar reacción aguda .....	98
2.- En caso de presentar reacción no sugestiva .....	100
3.- En caso de presentar reacción retardada .....	101
POBLACIÓN ESTUDIADA .....	102
CONTROLES.....	102
PACIENTES.....	104
4.2 ANÁLISIS MOLECULAR.....	104
EXTRACCIÓN DE ADN .....	104
EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ADN .....	107
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS.....	108
AMPLIFICACIÓN DE LOS SNP.....	108
PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN.....	111
VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	113
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	115
INTERPRETACIÓN DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS.....	120
CONTROL DE CALIDAD .....	122
4.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	124

ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN ENTRE PACIENTES Y CONTROLES.....	126
ANÁLISIS DESCRIPTIVO .....	126
ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.....	127
COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.....	127
ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS.....	128
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>132</b>
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL.....	132
DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES .....	133
ANÁLISIS GENOTÍPICO .....	135
5.1 GRUPO PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL.....	138
5.1.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA .....	138
5.1.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL.....	142
<b>NIVELES DE IgE TOTAL</b> .....	142
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS CON AEROALÉRGENOS COMUNES</b> .....	143
<b>SENSIBILIZACIÓN A UNO O VARIOS GRUPOS DE AEROALÉRGENOS</b> .....	145
5.1.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS EN LA HIPERSENSIBILIDAD A BL..	147
5.2 GRUPO PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	147
5.2.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA .....	147
5.2.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	150
<b>NIVELES DE IgE TOTAL</b> .....	152
<b>POLIPOSIS Y/O ASMA</b> .....	153
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS CON AEROALÉRGENOS COMUNES</b> .....	156
<b>SENSIBILIZACIÓN A UNO O VARIOS GRUPOS DE AEROALÉRGENOS</b> .....	157
5.2.4 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	159
<b>GEN TNFA (-308/-238)</b> .....	159
<b>GEN TGFB1 (c10/c25)</b> .....	160
<b>GEN IL4 (-1098/-590/-33)</b> .....	161
<b>GEN IL2 (-330/166)</b> .....	163
<b>GEN IL10 (-1082/-819/-592)</b> .....	163
5.3 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE.....	164
5.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA .....	164
5.3.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE.....	167

5.3.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE .....	169
<b>GEN TNFA (-308/-238)</b> .....	169
<b>GEN IL4 (-1098/-590/-33)</b> .....	170
<b>GEN IL10 (-1082/-819/-592)</b> .....	171
<b>6. DISCVSIÓN</b> .....	<b>175</b>
6.1 GRUPO DE INDIVIDUOS CON HIPERSENSIBILIDAD A LOS BETA-LACTÁMICOS.....	175
GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1 .....	176
GEN DE LA INTERLEUCINA 2.....	177
GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y LA SUBUNIDAD $\alpha$ DE SU RECEPTOR.....	178
GEN DEL INTERFERON GAMMA.....	181
GEN DEL FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO $\beta$ 1.....	182
GEN DE LA INTERLEUCINA 10 .....	183
6.2 GRUPO DE INDIVIDUOS CON HIPERSENSIBILIDAD A LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS .....	184
GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1 .....	185
GEN DE LA INTERLEUCINA 2.....	186
GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DE SU RECEPTOR.....	187
GEN DE LA INTERLEUCINA 6.....	190
GEN DE LA INTERLEUCINA 10 .....	191
GEN DE LA INTERLEUCINA 12 .....	192
GEN DEL INTERFERON GAMMA.....	194
GEN DEL FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO $\beta$ 1.....	195
GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA .....	197
6.3 GRUPO DE PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE.....	200
GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1 .....	200
GEN DE LA INTERLEUCINA 4.....	201
GEN DE LA INTERLEUCINA 10 .....	202
GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA .....	203
<b>7. CONCLVSIONES</b> .....	<b>209</b>
<b>8. BiBLiOGRAfía</b> .....	<b>214</b>

## TABLA DE ABREVIATURAS

**AAS:** Ácido acetil salicílico

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AEMPS:** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

**AF:** Alergia a Fármacos

**AIA:** Asma inducida por aspirina

**AIAU:** Urticaria aguda inducida por aspirina

**AICU:** Urticaria crónica inducida por aspirina

**AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos

**AIU:** Urticaria inducida por aspirina

**Arg:** Arginina

**ARNm:** ARN mensajero

**ALOX5:** Araquidónico-5-lipooxigenasa

**ASL:** Acetilsalicilato de lisina

**AX:** Amoxicilina

**BL:** Beta-lactámicos

**BPO:** Bencil-peniciloil

**CAP:** Método *Cap-System*

**CisLT:** Leucotrienos cisteinílicos o cisteinileucotrienos

**CisLT-R:** Receptores de los leucotrienos cisteinílicos

**CMH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**COX:** Enzima ciclooxigenasa

**DE:** Desviación estándar

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato

**DRESS:** Síndrome de Hipersensibilidad inducido por fármacos

**EAACI** : Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica

**ECEA**: Enfermedad cutánea exacerbada por AINE

**ECP**: Proteína catiónica del eosinófilo

**EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético

**EMP**: Exantema Maculopapular

**ENCePP**: European Network of Centres for Pharmacoepidemiology and Pharmacovigilance

**ENDA**: Grupo de interés en Alergia a Fármacos

**EMQN**: European Molecular Genetics Quality Network

**EREA**: Enfermedad respiratoria exacerbada por AINE

**EB**: Exantema Bulloso

**ELISA**: Enzimoimmunoanálisis

**FcεR1**: Receptor de alta afinidad para IgE

**FEIA**: Fluoroimmunoanálisis

**FPRP**: Probabilidad de encontrar un resultado positivo falso

**GA2LEN**: Global Allergy and Asthma European Network

**GATA 3**: Factor de transcripción activador específico de la transcripción

**Gln**: Glutamina

**HLA**: Antígeno leucocitario humano

**HNMT**: Histamina N-metil transferasa

**HSA**: Albúmina sérica humana

**IFN**: Interferón

**IgE**: Inmunoglobulina E

**IgG**: Inmunoglobulina G

**IgM**: Inmunoglobulina M

**IL**: Interleucina

**Ile**: Isoleucina

**5-LO:** 5-lipooxigenasa

**LTs:** Leucotrienos

**LTE4:** Leucotrieno E4

**MDM:** Determinantes antigénicos minoritarios o secundarios

**NET:** Necrosis Epidérmica Tóxica

**NF-KB:** Factor nuclear K activador de las células B

**NF-AT:** Factor nuclear activador de células T

**ng:** nanogramos

**nm:** nanómetro

**NOD:** Gen de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** Odds Ratio

**PAP:** Probabilidad *a priori*

**Pb:** Pares de base

**PE:** Poder estadístico

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEAG:** Pustulosis Exantemática Aguda Generalizada

**PEB:** Prueba de exposición controlada bronquial

**PECO:** Prueba de exposición oral controlada

**PEN:** Prueba de exposición controlada nasal

**PG:** Prostaglandinas

**PGE2:** Prostaglandina E2

**PPL:** Peniciloil con polilisina

**RAF:** Reacciones alérgicas a fármacos

**RAM:** Reacciones adversas a medicamentos

**RAST:** Prueba de radioalergosorbencia

**RI:** Rango intercuartílico

**RIA:** Radioinmunoanálisis

**SEFV-H:** Sistema Español de Farmacovigilancia de medicamentos de uso Humano

**SNP:** Polimorfismo de único nucleótido

**SSJ:** Síndrome de Stevens Johnson

**SSP-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos de secuencia

**STAT6:** Transductor de señal y activador de la transcripción 6

**TAE:** Tampón Tris-Acético-EDTA

**TBE:** Tampón Tris-Bórico-EDTA

**TBXA2:** Tromboxano A2

**TBX<sub>21</sub>:** Factor de transcripción T-box

**TGFβ1:** Factor transformador del crecimiento β1

**Th:** T colaborador

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**μg:** microgramos

**μL:** microlitro

**UV:** Ultravioleta

**Val:** Valina

**WAO:** World Allergy Organization

**X<sup>2</sup>:** Chi cuadrado



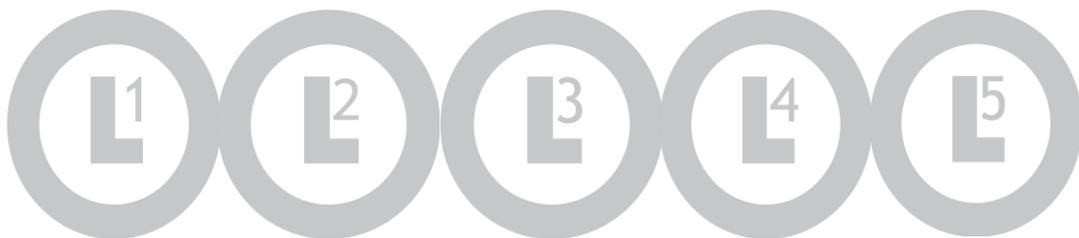


UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# INTRODUCCIÓN

---





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 DEFINICIÓN DE REACCIÓN ADVERSA A FÁRMACOS

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) se definen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como cualquier efecto perjudicial y no intencionado, producido por un fármaco, que ocurre a las dosis utilizadas en humanos para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento [1, 2, 3]. La definición original de RAM establecida por la OMS no incluye: errores en la administración y dosificación, sobredosis accidental o intencionada, incumplimiento de la prescripción ni la no obtención del efecto terapéutico [4]. Este criterio restrictivo para catalogar una RAM, frecuentemente ha implicado una falta de acuerdo entre clínicos y farmacólogos sobre lo que constituye una RAM “verdadera” [5]. En este sentido, publicaciones posteriores han adoptado un criterio menos restrictivo y caracterizan la RAM como cualquier efecto perjudicial e indeseable producido por un fármaco; incluyéndose como RAM las presentadas por los pacientes que, voluntaria o accidentalmente, sufren una sobredosis, ya que esto es un riesgo posible y previsible al prescribir un medicamento [6, 7, 8].

Un buen número de reacciones no son consecuencia del fármaco en sí mismo, sino de su forma de administración y se excluyen de la consideración de RAM, como son:

- Reacciones psicógenas (cuadros vasovagales y otras reacciones vegetativas, especialmente tras inyecciones, y que pueden manifestarse en forma de ansiedad, náuseas, letargias o síncope). Así, un placebo puede producir una reacción similar a la de un medicamento [9, 10].
- Síntomas coincidentes: debido a la enfermedad en tratamiento, que pueden atribuirse de forma errónea a los medicamentos empleados, como sucede con los exantemas víricos en niños tratados con antibiótico.

### 1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS A FÁRMACOS

Existen diferentes clasificaciones de las RAM.

En base a una adaptación de Rawlins y Thompson [11], las reacciones adversas a fármacos se dividen en dos grupos:

### **RAM tipo A (Augmented)**

Son dosis dependientes, predecibles, están relacionadas con la actividad farmacológica y pueden aparecer en cualquier individuo (afectan a pacientes no susceptibles). En muchos casos son inevitables, lo que obliga a sopesar las ventajas e inconvenientes de iniciar un tratamiento. Son las RAM más frecuentes, suponen hasta el 80% - 90% de las RAM [12, 13]. Generalmente, son descubiertas antes de la comercialización.

A su vez, las RAM de tipo A se pueden clasificar en [14, 15, 16]:

- Sobredosis/Toxicidad: Efecto farmacológico tóxico de un medicamento, en relación directa con su concentración en el organismo, dependiente de un exceso de dosis, de una reducción de su excreción o de ambas (depresión respiratoria por sedantes, sordera por aminoglucósidos) [15,16].
- Efectos colaterales: Se deben a una o varias de las múltiples acciones farmacológicas de un medicamento, terapéuticamente no deseadas, pero inevitables y que se producen a dosis normales. Constituyen las RAM más frecuentes (taquicardia tras inyección de adrenalina) [15, 16].
- Efectos secundarios o indirectos: son la consecuencia indirecta de la acción farmacológica principal del medicamento. Implican efectos farmacológicos indeseables a las dosis recomendadas (osteoporosis por corticoides) [15,16].
- Interacción farmacológica: son consecuencia de la acción de un fármaco sobre la eficacia o toxicidad de otro fármaco. Un fármaco puede alterar la fisiología normal del paciente (absorción, distribución, metabolismo, excreción renal) y modificar su respuesta frente a otro u otros fármacos (inducción enzimática por un medicamento que altera el metabolismo de otro). La interacción de un fármaco puede dar lugar a la aparición de RAM por el fármaco sobre el que interacciona [7, 16].

### **RAM tipo B (Bizarre)**

No dependen habitualmente de la dosis del fármaco, la mayoría son impredecibles y afectan solamente a determinados individuos. La predisposición individual para presentar estas reacciones depende de características genéticas en individuos susceptibles

(idiosincrasia, intolerancia) o de la posibilidad de desarrollar una respuesta inmunológica o no inmunológica (hipersensibilidad, en ocasiones también asociada a factores genéticos). Estas reacciones, en muchos casos graves, limitan el uso de fármacos que por otra parte son eficaces, y causan la retirada de fármacos tras su comercialización.

Debido a la importancia de la influencia genética en estas reacciones, se pretende analizar los determinantes genéticos de la susceptibilidad al desarrollo de reacciones de tipo B. El proyecto Eudragene integra una colaboración internacional europea para analizar los polimorfismos del genoma que determinan esta susceptibilidad [17].

Por otro lado, desde 1990 cobran importancia los estudios de farmacogenética y farmacogenómica. En los últimos años estos estudios se han multiplicado exponencialmente [18], intentando comprender cómo el mismo fármaco a la misma dosis produce efectos totalmente diferentes a distintos pacientes. Estos estudios clasifican a los pacientes en metabolizadores lentos, intermedios, rápidos y ultra-rápidos según su genotipo, lo que conlleva a posibles fallos terapéuticos o intoxicaciones según el caso. Estos estudios recientes se centran en la farmacocinética (estudiando la concentración y metabolismo del medicamento) o en la farmacodinámica (estudiando la acción del medicamento). El objetivo final de su aplicación se basa en poder prescribir medicamentos de forma individualizada “a medida” (tailored) a cada paciente, según su genotipo. La importancia viene reflejada en la creación de la red ENCePP (European Network of Centres for Pharmacoepidemiology and Pharmacovigilance).

Las RAM de tipo B se pueden subclasificar en [19, 12]:

- **Idiosincrasia**

Es una respuesta cualitativamente anormal a un fármaco, distinta de las acciones farmacológicas del mismo, en las que están involucradas alteraciones genéticas relacionadas con deficiencias metabólicas o enzimáticas y no implican un mecanismo inmunológico. Pueden corresponder a una alteración de la farmacocinética o de la farmacodinamia del medicamento implicado [16, 20].

Algunos ejemplos de idiosincrasia son: la primaquina puede producir anemia hemolítica en pacientes con déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, los barbitúricos pueden precipitar una crisis de porfiria en pacientes con porfiria hepática y existe un aumento de la toxicidad por azatioprina en pacientes con déficit de tiopurina metil

transferasa. Con excepción de estos y algunos otros cuadros bien definidos, el mecanismo de la mayoría de las reacciones idiosincrásicas es desconocido.

- **Intolerancia**

Es un fenómeno de toxicidad farmacológica producido con pequeñas dosis e incluso dosis subterapéuticas de un medicamento, que aparece sólo en determinadas personas, aquellas que tienen una sensibilidad exagerada a los efectos farmacológicos del fármaco implicado y/o una alteración en su metabolismo [16].

Ejemplos de intolerancia son los individuos que desarrollan tinnitus tras la toma de una única dosis de AAS o la menor respuesta a los beta-bloqueantes que tienen los hipertensos de raza negra [21].

- **Reacciones de hipersensibilidad**

En base a los diferentes acuerdos en nomenclatura y definición nosológica por la World Allergy Organization (WAO), y su reconocimiento por diversas Sociedades y Academias de Alergia e Inmunología Clínica, así como por un reciente Consenso Internacional de Alergia a Fármacos [22-26], las reacciones de hipersensibilidad son RAM (producidas por principios activos y excipientes) que se presentan clínicamente con signos y síntomas que difieren de los efectos farmacológicos del medicamento. Las reacciones de hipersensibilidad están mediadas por mecanismos inmunológicos y otros tipos de mecanismos (no inmunológicos) y solamente afectan a individuos susceptibles. Al igual que el resto de las reacciones de tipo B, habitualmente son independientes de la dosis, aunque algunas reacciones son dosis dependientes como en el caso de AINE, anticonvulsivos y el alopurinol. Representan sólo entre un 10% y un 15% de las RAM [27, 12, 28] pero afectan al 7 - 10% de la población general por lo se consideran un importante problema de salud pública.

Según la WAO, las reacciones de hipersensibilidad pueden ser alérgicas y no alérgicas [22, 26]:

### Reacciones de hipersensibilidad no alérgicas

Las reacciones de hipersensibilidad a fármacos no alérgicas se presentan clínicamente con síntomas y signos que mimetizan reacciones alérgicas [22], y en ellas están implicados mediadores liberados a partir de mecanismos no inmunológicos [29, 30].

La WAO, las diferentes Sociedades y Academias de Alergia e Inmunología Clínica y el reciente Consenso Internacional de Alergia a Fármacos, desestiman los términos: intolerancia, idiosincrasia y reacción “anafiloide”, para denominar este tipo de reacciones de hipersensibilidad empleados habitualmente hasta la actualidad [22-26].

La liberación de histamina, a partir de la degranulación de mastocitos y basófilos debido a un mecanismo no inmunológico parece que constituye el mecanismo patogénico más frecuentemente implicado en estas reacciones. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo, se piensa que puede inducirse por acción directa e inespecífica de los fármacos sobre estas células o a través de los componentes del complemento (activado inespecíficamente) o por alteración en el metabolismo del ácido araquidónico. Otras reacciones no inmunológicas se producen por acumulación de bradiquinina (inhibidores del enzima convertidor de angiotensina). Los fármacos más frecuentes implicados en este tipo de reacciones de hipersensibilidad no alérgicas son los AINE, y en los últimos años los agentes quimioterápicos y los biológicos han surgido de forma importante. Otros fármacos inductores son: contrastes radiológicos, anestésicos locales, opiáceos, protamina y vancomicina [26, 29].

### Reacciones de hipersensibilidad alérgicas

Las reacciones de hipersensibilidad a fármacos con base inmunológica, son las reacciones alérgicas a fármacos (RAF) o alergia a fármacos (AF) [22, 23, 26]. Constituyen el 6% - 10% de todas las RAM, pero incluyen muchas de las reacciones adversas a fármacos graves, e incluso el 10% de ellas pueden ser mortales [27, 12].

### *1.3 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALÉRGICAS O ALÉRGICAS A FÁRMACOS (RAF)*

#### **DEFINICIÓN DE REACCIÓN ALÉRGICA A FÁRMACOS (RAF)**

La reacción alérgica a un fármaco es una reacción inmunológicamente mediada que se caracteriza por ser específica del fármaco inductor, estar mediada por anticuerpos o linfocitos, remitir al suspenderlo y ser recurrente si el paciente se vuelve a reexponer al fármaco [31]. El organismo se sensibiliza tras una exposición previa a ese fármaco y puede existir hipersensibilidad a otras sustancias de estructura química similar [16]. En una

posterior exposición, se desencadenará una reacción alérgica con la producción de anticuerpos, activación celular y liberación de mediadores celulares preformados y *de novo*, con la consiguiente aparición de signos y síntomas propios de las enfermedades alérgicas.

Habitualmente son impredecibles y generalmente independientes de la dosis, siguiendo las características de las RAM de tipo B. Pero, pueden existir factores de riesgo determinantes de las RAF, que pueden depender del fármaco o del paciente [32].

## CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS A FÁRMACOS

La clasificación de las RAF resulta compleja porque por una parte existe un solapamiento en la cronología de las manifestaciones clínicas y por otro lado el mecanismo patogénico puede ser heterogéneo. Sin embargo, en la práctica clínica diaria resulta esencial la clasificación de las RAF para poder establecer los métodos de diagnóstico apropiados [33] y las indicaciones terapéuticas más convenientes. De este modo, se podrán establecer las correctas alternativas terapéuticas en futuras administraciones de fármacos, con el fin de limitar el riesgo de que se repita la misma RAF e incluso una más grave.

Existen varias formas de clasificar las reacciones alérgicas:

### Clasificación basada en el tiempo de inicio de la sintomatología clínica

Aunque se basa en la cronología con la que aparecen los síntomas clínicos, indirectamente también hace referencia al mecanismo responsable de la reacción.

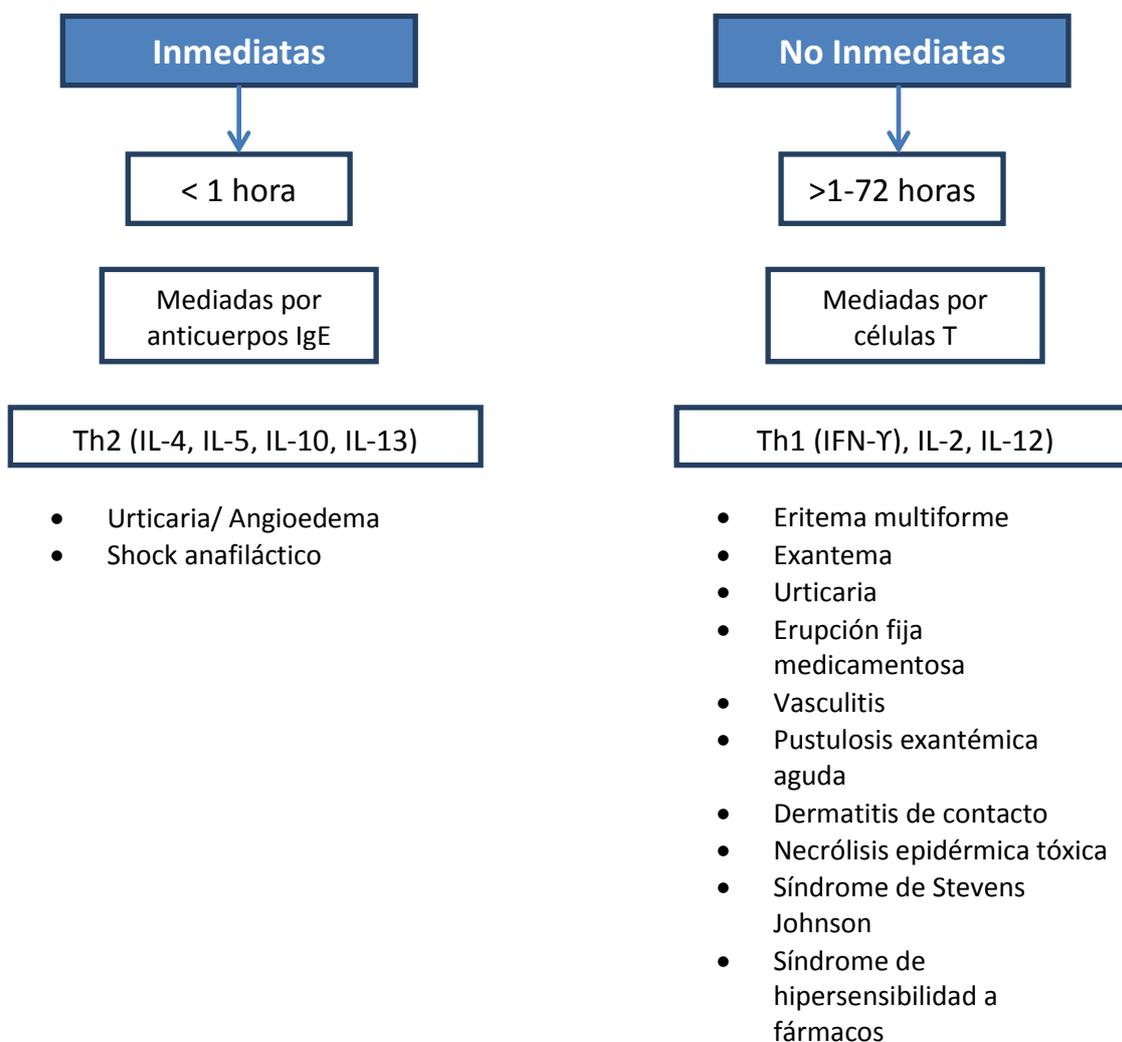
- **Clasificación de Levine**

En 1966, Levine, clasificó las RAF dependiendo del tiempo de aparición de los síntomas clínicos tras la administración del fármaco en: inmediatas, aceleradas y tardías [34].

Las reacciones inmediatas ocurren en menos de 1 hora tras la toma del fármaco y pueden ser mediadas por anticuerpos IgE. Con esta cronología también se manifiestan las reacciones de hipersensibilidad a fármacos no mediadas inmunológicamente. Las reacciones aceleradas aparecen entre 6 - 48 horas y las tardías son aquellas que aparecen a partir de las 48 horas tras la administración del fármaco. En la patogenia de las reacciones tardías, se ha demostrado que están implicados los linfocitos T como células efectoras. Las reacciones aceleradas son más difíciles de diferenciar, debido al solapamiento existente con

los otros dos tipos de reacciones. Si bien en un principio se definió a las reacciones aceleradas como mediadas por anticuerpos IgE, las evidencias actuales apuntan a que la mayoría son reacciones mediadas por células T [35].

Por ello, resulta más útil diferenciar las reacciones de hipersensibilidad a fármacos como inmediatas y no inmediatas (Figura 1), incluyéndose en estas últimas las reacciones aceleradas y tardías. Esta evidencia práctica ha sido recogida por las diferentes Academias y Sociedades de Alergia e Inmunología Clínica, así como en el Consenso Internacional de Alergia a fármacos, dando lugar a una nueva clasificación de las RAF dependiendo del tiempo de aparición de inicio de los síntomas clínicos tras la toma del fármaco [22-26].



**Figura 1.** Clasificación de las reacciones alérgicas a fármacos basada en el tiempo de inicio de la sintomatología clínica. Tomada del Tratado de Alergias. Capítulo 66. J.M. Cortada Macías y cols.

- **Clasificación de la World Allergy Organization (WAO)**

La WAO clasifica las RAF en: inmediatas y retardadas (no inmediatas) [22].

**Inmediatas:** Clásicamente se manifiestan antes de haber transcurrido una hora desde la administración del fármaco y pueden estar inducidas por un mecanismo mediado por IgE, correspondiendo con las reacciones de tipo I de la clasificación de Gell y Coombs. Este periodo de latencia de una hora identifica a la mayoría de las RAF inmediatas. Pero, en el caso de la vía oral pueden aparecer entre 1 y 6 horas tras la administración del fármaco. La vía intravenosa puede producir síntomas en segundos o unos pocos minutos tras la infusión del fármaco, mientras que esa misma sustancia administrada vía oral puede iniciar el cuadro entre los 3 y 30 minutos en un estómago vacío y entre los 10 y los 60 minutos si el paciente ha ingerido alimentos. La sintomatología clínica es muy amplia desde la afectación aislada de un órgano con síntomas cutáneos (urticaria/angioedema), respiratorios (broncoespasmo, rinitis), digestivos (vómitos, diarrea, dolor abdominal) hasta síntomas sistémicos correspondientes con la anafilaxia. Las RAF inmediatas deben ser diferenciadas de las reacciones inmediatas de hipersensibilidad a fármacos no alérgicas (no mediadas inmunológicamente), cuya cronología y expresión clínica simula las reacciones mediadas por IgE y para cuya nomenclatura actualmente se desestiman los términos intolerancia, idiosincrasia y reacción “anafilactoide” como se ha citado previamente [22-26].

**Retardadas (no inmediatas):** Clínicamente comienzan a partir de 1 hora después de la administración del fármaco, frecuentemente a partir de 24 horas y generalmente aparecen días después del inicio del tratamiento. La mayoría están mediadas por células T (tipo IV). Pero, algunas reacciones pueden iniciarse a partir de 6-8 horas tras la administración del fármaco. Las reacciones tipo II, III y IV, de la clasificación de Gell y Coombs, son consideradas retardadas.

Clasificación basada en el mecanismo inmunológico que las produce

La clasificación de Gell y Coombs [36], diferencia las RAF en función del mecanismo inmunopatogénico que las produce en [12, 16, 37, 38] (Figura 2):

- **Reacciones tipo I:** mediadas por IgE, en las que intervienen mastocitos y/o basófilos. La IgE es específica del fármaco y puede presentar reactividad cruzada con otros fármacos de análoga estructura química. Sus manifestaciones clínicas son la anafilaxia, la urticaria, el angioedema y el broncoespasmo [39 -42].

- **Reacciones tipo II:** *citotóxicas o citolíticas*. Mediadas por anticuerpos, generalmente IgG o IgM, que se unen a los determinantes antigénicos del fármaco presentes en la membrana de células, principalmente sanguíneas, producido citolisis (citotoxicidad mediada por anticuerpos) por activación del complemento o a través de células (leucocitos, natural killer). Las principales manifestaciones clínicas son las citopenias: anemia hemolítica, trombocitopenia, neutropenia/agranulocitosis inducidas por fármacos [43- 51].
- **Reacciones tipo III:** producidas por inmunocomplejos constituidos por fármaco/inmunoglobulinas, generalmente IgG (aunque también pueden ser IgM), que se depositan a nivel de los vasos o de los tejidos diana y producen reclutamiento de células inflamatorias (esencialmente neutrófilos) y activación del complemento. Las manifestaciones clínicas son las vasculitis por hipersensibilidad a fármacos [52] y la enfermedad del suero (excepcionalmente presente en las RAF).
- **Reacciones tipo IV o de hipersensibilidad celular.** Mediadas por linfocitos T. Se pueden subclasificar a su vez en tipos IVa - IVd [53], en función de los distintos patrones de de citocinas y quimiocinas producidos por las células T (patrones caracterizados como Th1/Th2) y de la participación de diferentes células efectoras como los monocitos (IVa), los eosinófilos (IVb), los neutrófilos (IVd) o las células T citotóxicas, tanto CD4+ como CD8+ (IVc).

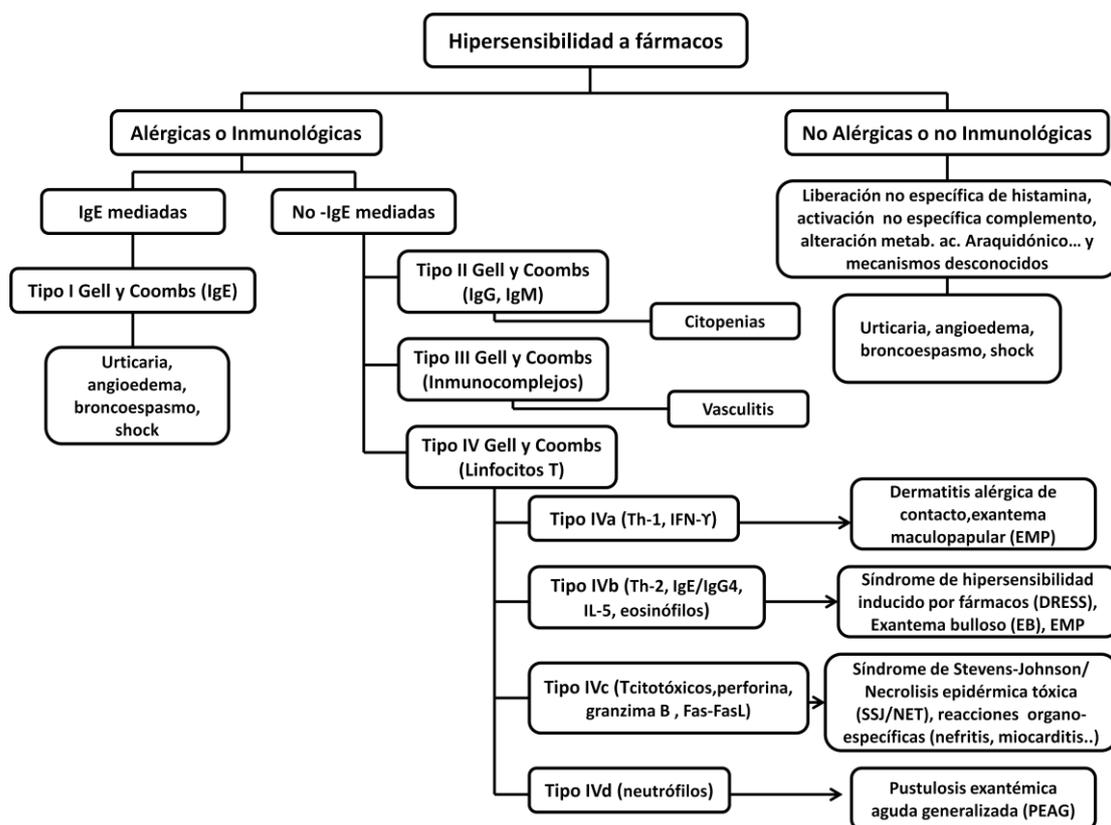
Por tanto, las reacciones de tipo IV, se pueden subclasificar en 4 tipos [54, 55]:

- ✓ *Tipo IVa:* Participan células Th1 con la producción de citocinas IFN-gamma, TNF- $\alpha$ , IL-12. Activación de monocitos/macrófagos y formación de granulomas. Es el mecanismo principal de la dermatitis alérgica de contacto (aunque también puede estar implicado el IVc) pero también puede ser responsables del Exantema Maculopapular (EMP) (también implicado en el IVc y IVb) [56, 57, 58].
- ✓ *Tipo IVb:* Participan células Th2 con la producción de citocinas IL-5, IL-4/IL-13. Inflamación eosinofílica. Destacan el Exantema Maculopapular y el Síndrome de Hipersensibilidad inducido por Fármacos (*Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms: DRESS*) [59, 60, 61], Exantema Bulloso (EB) (también implicado el IVc), EMP (también implicado el IVc y IVa).
- ✓ *Tipo IVc:* Participan linfocitos T citotóxicos, CD4+/CD8+ (CTL) (Perforina/granzima B). Citotoxicidad mediada por células T. Destaca el

Síndrome de Stevens Johnson/ Necrolisis Epidérmica Tóxica (SSJ/NET) [62, 63, 64], EMP (también implicado el IVb y IVa), EB (también implicado el IVb), dermatitis alérgica de contacto (también implicado IVa) y reacciones órgano específicas (nefritis intersticial [65, 66, 67], miocarditis [68, 69], o hepatitis por hipersensibilidad a fármacos [70]).

- ✓ *Tipo IVd*: Participan los linfocitos T (IL-8/CXCL8, GM-CSF). Inflamación neutrofílica. Destaca la Pustulosis Exantemática Aguda Generalizada (PEAG) (también implicado el IVc) [61, 71, 72].

Hay que tener en cuenta que el mecanismo patogénico no está bien establecido en una parte de las reacciones de tipo IV [12], pero resulta definitivo que está mediado por células, como demuestran los estudios clínicos, inmunohistoquímicos y el análisis de linfocitos T específicos obtenidos de sangre periférica y de piel. Algunas entidades de mecanismo desconocido son el exantema fijo medicamentoso [73, 74, 75] y la autoinmunidad inducida por fármacos, esencialmente (por su mayor frecuencia), el lupus inducido por fármacos [76, 77, 78].



**Figura 2.** Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos basada en los mecanismos inmunológicos o no inmunológicos implicados. Tomada de *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 3 (4), 539-551 (2010).

Otro punto a considerar es que el sistema de Gell y Coombs es útil para clasificar las RAF, pero hay que tener en cuenta que fue establecido antes de que se conocieran en detalle las subpoblaciones de células T y sus funciones. Por ello, las investigaciones inmunológicas han evidenciado que los tres tipos de reacciones con implicación de anticuerpos (tipos I, II y III), requieren también de la participación de células T. Además, en cuanto a las RAF de tipo IV, destacar que el mecanismo implicado (en algunas de ellas) es heterogéneo y conlleva la participación de varios subtipos IV, como se ha mencionado previamente.

Las RAF en su mayoría comprenden reacciones de tipo I y IV, mucho más infrecuentemente reacciones de tipo II y III. Ciertos fármacos inducen fundamentalmente reacciones mediadas por células T, como los anticonvulsivantes y el alopurinol; otros provocan fundamentalmente reacciones de tipo I, como los relajantes musculares. Por el

contrario, los beta-lactámicos (BL) pueden producir cualquiera de los cuatro tipos de reacción [39].

El órgano más frecuentemente afectado en las reacciones mediadas por células T es la piel, pero estas reacciones pueden afectar a cualquier órgano o a varios (reacciones cutáneas graves). Por ello, las RAF también se pueden clasificar atendiendo a la afectación de uno o más órganos en RAF con manifestaciones organoespecíficas y RAF con manifestaciones sistémicas respectivamente.

Finalmente y como se ha referenciado previamente, hay que tener en cuenta el hecho de que en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos no mediadas inmunológicamente, la liberación no específica de histamina, la activación no específica del complemento, una alteración en el metabolismo del ácido araquidónico o la acumulación de bradiquinina, pueden mimetizar reacciones de tipo I [29, 30, 55].

### *1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDAS POR FÁRMACOS*

Las reacciones de hipersensibilidad a fármacos representan una parte muy importante de la patología iatrogénica. Su mortalidad, morbilidad y coste son, frecuentemente, infravalorados.

Sin embargo, hay pocos estudios epidemiológicos extensos que puedan considerarse correctos. Por una parte, numerosas reacciones con síntomas y signos sugestivos de patología alérgica, son consideradas como verdaderas reacciones alérgicas, pero sin confirmar dicho mecanismo. En otras ocasiones se realizan las investigaciones sobre poblaciones específicas, enfermos en urgencias, ingresos hospitalarios, pacientes ingresados, y no en población general, con lo que resulta difícil extrapolar los resultados, y éstos deben considerarse únicamente como orientativos [19].

En las reacciones de hipersensibilidad es particularmente complicado obtener un diagnóstico seguro por varios motivos. La historia clínica no es absolutamente fiable, ya que de forma frecuente se toman varios medicamentos simultáneamente, las pruebas cutáneas e *in vitro* no tienen la sensibilidad diagnóstica adecuada y por último las pruebas de exposición oral resultan costosas y lo que es más importante son potencialmente peligrosas, porque comprometen la vida del paciente. Por todo ello, muchos estudios

epidemiológicos se basan únicamente en la historia clínica, sin intentar confirmar la relación entre la exposición y los síntomas o demostrar el mecanismo inmune [19].

En la actualidad, el grupo de interés en Alergia a Fármacos ENDA de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) (<http://www.eaaci.org/sections-a-igs/ig-on-drug-allergy.html>), está dedicado a la investigación de la alergia a los medicamentos en Europa y a la publicación de documentos de consenso y guías, como el proyecto GALENDA que permite la unificación de una base de datos sobre RAM con criterios de procedimientos estandarizados de ENDA y GA2LEN (Global Allergy and Asthma European Network).

## INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados hacen referencia a las RAM en general y son muy pocos los realizados de manera específica en reacciones de hipersensibilidad en sentido estricto [19].

Durante el período 2011-2012, la WAO estima que las RAM afectan a la décima parte de la población mundial [27].

Algunos autores como Karch y Lasagna [79] revisaron diferentes estudios hasta 1975 con pacientes hospitalizados y atendidos ambulatoriamente en todas las especialidades médicas, evaluando la incidencia de RAM. La incidencia comunicada en las distintas series oscilaba entre el 1,5% [80] y el 35% [81]. Estos autores, al igual que Morales Olivas y cols, en su revisión de más 1.500 artículos de revistas españolas, llegan a la conclusión de que sólo es comunicado un pequeño número de RAM [79, 80-82].

Se estima que sólo se comunican entre el 6 y el 10% de las RAM, por diferentes causas [83]. Las causas más frecuentes son la dificultad para reconocer una RAM, la carga de trabajo, la falta de tiempo, el desconocimiento del sistema de farmacovigilancia y evitar posibles conflictos. Parece que el problema principal a la hora de catalogar una manifestación clínica como una RAM es establecer una relación causa-efecto entre el fármaco y la reacción. Esto resulta difícil y, en ocasiones, imposible. Según Karch y cols. [79], se pueden establecer las siguientes categorías de relación causa-efecto entre el fármaco y la reacción: definitiva, probable, posible, condicional y dudosa. El problema deriva que si solamente se tienen en cuenta las RAM basadas en las relaciones definitivas y

probables, se tiende a subestimar la verdadera incidencia, mientras que si se incluyen reacciones posibles se tiende a sobreestimarla [19].

En España, desde 1984, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, a través del Sistema Español de Farmacovigilancia de medicamentos de uso Humano (SEFV-H) de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), tiene como objetivo principal reunir los casos de sospecha de RAM. Las notificaciones pueden ser efectuadas por profesionales sanitarios o por los laboratorios farmacéuticos a través de las “tarjetas amarillas”. Desde 2013, también se puede notificar vía Internet, estando este acceso disponible tanto para profesionales como para los propios ciudadanos [84].

La muerte por reacción alérgica es rara, con un riesgo estimado de 1/10.000 [19]. En relación a los datos de mortalidad publicados por el Centro de Farmacovigilancia de Cataluña [85], sobre un total de 1.997 notificaciones, fueron 16 tarjetas (2,5%). Durante el primer año de funcionamiento del Centro de Farmacovigilancia de la Comunidad de Madrid [86], se recibieron dos notificaciones con desenlace mortal, habiéndose evaluado 285 tarjetas amarillas. Hay que mencionar que los intentos de suicidio y los fallos terapéuticos [87, 88] también pueden estar incluidos en las comunicaciones de reacciones fatales a fármacos. Irey [89] seleccionó 827 casos de reacciones mortales a fármacos. La valoración cuidadosa de los datos determinó que sólo en 220 podía atribuirse con certeza la muerte a la administración de un medicamento. Se estima que en Italia [90], el 1,66% de las RAM comunicadas espontáneamente tienen consecuencias mortales. La mortalidad en niños en el Reino Unido [91] es del 0,37 - 1% de todas las tarjetas amarillas.

En relación a los distintos estudios epidemiológicos, los trataremos por separado según la población sobre la que se han realizado.

### ***Datos sobre población hospitalizada***

La mayoría de los estudios se han realizado en esta población. En el estudio de Bates y cols., enfermeras y farmacéuticos del *Boston Collaborative Drug Surveillance Program*, recogieron información de todas las RAM de 4.031 pacientes hospitalizados durante un periodo de 6 meses. Encontraron una incidencia de RAM del 6,1%, de las cuales 41,7% fueron graves y 1,2% condujeron a la muerte de los pacientes. Clasificaron la mayoría de las reacciones, un 61,7%, como impredecibles, de las cuales un porcentaje podrían corresponder a reacciones de hipersensibilidad [92].

Classen y cols, empleando un sistema automático de detección, en el LDS Hospital, de Salt Lake City, durante un periodo de 18 meses, identificaron 731 reacciones entre 36.653 pacientes hospitalizados, de las cuales sólo un 12,3% habían sido comunicadas por los médicos del hospital. La incidencia (un 1,8%), fue menor que en el estudio anterior. De todas las RAM, un 13,8% fueron graves y se consideraron reacciones de hipersensibilidad un 32,7% [93].

En un meta-análisis de 39 estudios prospectivos realizados en EE.UU. entre 1966 y 1996 llevado a cabo por Lazarou y cols., mostraron que un 15,1% de los pacientes hospitalizados presentaban una RAM. Un 6,7% fueron RAM graves y el 3,2% motivaron un *exitus*, por lo que las RAM implicaban la 4ª - 5ª causa de muerte en pacientes hospitalizados. Estimaron que los ingresos hospitalarios motivados por una RAM oscilaban entre el 3,1% y el 6,2% [94].

En el estudio prospectivo realizado en Singapur por Thong, en un total de 90.910 pacientes, se comunicaron 366 casos etiquetados de “alergia a fármacos”, de los que 210 fueron confirmados como RAF, por un alergólogo. Las manifestaciones cutáneas fueron las más habituales en un 95,7%, y las sistémicas se presentaron en un 30%. Concluyeron que la frecuencia de RAF en pacientes hospitalizados era de 4,2 por cada 1.000 hospitalizados, y la mortalidad atribuible a RAF del 0,09 por 1.000 [95].

Pirmohamed llevó a cabo un estudio prospectivo en dos hospitales del Sistema Nacional de Salud del Reino Unido. Se incluyeron un total de 18.820 pacientes, mayores de 16 años, ingresados durante un período de 6 meses. En este estudio se encontró que un 6,5% de los ingresos estaban relacionados con una RAM, con una mortalidad del 0,15%. La mayor parte de las RAM estudiadas, el 95%, fueron clasificadas como predecibles, y por tanto, no relacionadas con fenómenos de hipersensibilidad [96].

En un trabajo de Einarson, en el que se revisó la bibliografía publicada durante un periodo de 20 años, se obtuvo que la prevalencia de admisiones en el hospital como consecuencia de RAM oscilaba entre 0,2 y el 21,7%, con una media de 5,5% y una mortalidad del 3,7%. Del total de RAM, un 71,5% correspondían a efectos adversos predecibles, 11,3% a reacciones de hipersensibilidad y el 0,4% a reacciones idiosincrásicas [97]. En la actualidad, es difícil establecer cuántas de estas denominadas reacciones de hipersensibilidad e idiosincrásicas, se corresponden con RAF, dada la confusión en la terminología previamente referida.

En el estudio de Moore [98], dirigido al análisis de la frecuencia y el coste que suponen las RAM en pacientes hospitalizados en medicina interna, encuentran que el 3% de los ingresos hospitalarios son debidos a RAM y el 6,6% de los pacientes hospitalizados desarrollan una RAM. Calculan que el 5% - 9% del gasto hospitalario está relacionado con RAM. Hay que considerar que, en esta serie, el 77% de las reacciones fueron RAM tipo A.

Respecto a los estudios de prevalencia en población pediátrica, en el estudio de Martínez-Mir sobre 512 ingresos de niños menores de 2 años, encontraron que un 4,3% podrían haber sido motivadas por RAM. Un 14,3% de los casos presentaron manifestaciones clínicas cutáneas. Sin embargo, no se realizaron estudios para descartar una posible etiología alérgica y la serie incluye manifestaciones órgano específicas (afectación del sistema nervioso central: 40,5%, síntomas digestivos: 16,7%) o características clínicas, que podrían corresponder a efectos secundarios o a otras enfermedades intercurrentes [99].

Kidon y See realizaron un estudio retrospectivo en Singapur que incluyó a 8.437 niños hospitalizados, 222 (2,6%) pacientes describieron una RAM previa. El 98% de los casos habían presentado afectación cutánea. Aunque podrían corresponder a reacciones de hipersensibilidad, no hay datos del estudio alergológico [100].

En el meta-análisis realizado por Impicciatore, se recogieron 17 estudios prospectivos, sobre RAM en varias poblaciones pediátricas (hospitalizados, atendidos ambulatoriamente e ingresos por RAM). En niños hospitalizados, la incidencia media de RAM fue del 9,53%, de las cuales se consideraron graves un 12,29%. Los ingresos hospitalarios motivados por RAM fueron del 2,09% y de ellos el 39,3% fueron RAM graves. En la población atendida en consultas externas, la incidencia de RAM fue del 1,46% [101].

Entre los años 2001 y 2007, Clavenna y cols. realizaron una revisión bibliográfica de los estudios prospectivos publicados sobre RAM en niños. La incidencia de RAM fue de 10,9% en niños hospitalizados y del 1% en los atendidos en consultas ambulatorias. El porcentaje de ingresos por RAM fue del 1,8%. La piel y el aparato gastrointestinal fueron los órganos más frecuentemente afectados y los antibióticos, los fármacos más frecuentemente implicados [102].

### ***Datos sobre población general***

Los datos epidemiológicos sobre hipersensibilidad inducida por fármacos en pacientes no hospitalizados y en la población general son escasos. Hay que mencionar que son los antibióticos BL y los AINE los fármacos más frecuentemente implicados en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos [103]. Etiológicamente, los BL son los principales responsables de las consultas por reacciones alérgicas a fármacos (47% del total). Los AINE, ocupan el primer puesto en frecuencia de reacciones de hipersensibilidad especialmente en adultos [26], ya que en niños la primera causa son los antibióticos BL.

En Alergológica 2005 [104], estudio descriptivo, transversal, observacional, que se realizó sobre 4.991 pacientes atendidos en los Servicios de Alergología de España, 732 (14,67%) acudieron para estudio de alergia a medicamentos. El diagnóstico de hipersensibilidad se confirmó en el 26,6% de los casos y se descartó en el 37,2%. El 75% de los pacientes refería síntomas cutáneos y un 10% anafilaxia. Sin embargo, estos datos no deben considerarse como poblacionales, ya que no se trata de un muestreo representativo.

En un estudio del Comité de Alergia Cutánea de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica, Gaig y cols. realizaron un estudio de tipo observacional transversal, mediante encuesta telefónica, sobre 4.949 individuos elegidos de forma aleatoria sobre listín telefónico, aplicando control de cuotas por zona, número de habitantes, sexo y edad [105]. De estos individuos, el 21,6% manifestaron ser alérgicos. Las tres causas más frecuentes fueron los pólenes (31,5%), los fármacos (29,4%), y los ácaros del polvo doméstico (25,3%).

Gomes lleva a cabo un estudio transversal, durante el año 2002 en población general adulta de Portugal, mediante un cuestionario en 2.500 sujetos, de los cuales responden 2.309. La prevalencia de alergia, comunicada por los propios sujetos, fue del 7,8% (181/2.309). Un 4,5% se consideraban alérgicos a la penicilina u otros BL, 1,9% a aspirina u otros AINE y el 1,5% lo asociaban con otros medicamentos [106].

En un estudio realizado en Australia entre los años 2003-2004 se recogieron los datos proporcionados por médicos de atención primaria, a partir de la información aportada por sus pacientes en relación con las RAM presentadas. El 10,4% de los pacientes (852/8.215) habían sufrido una RAM en los 6 meses previos. Para el 71,9% de los pacientes, la RAM fue reconocida como un efecto secundario, el 12,4% lo referían como “sensibilidad al fármaco” y el 11,0% como alergia. El 83,5% había presentado una única RAM, el 10,7% al menos 2

RAM y el 5,8% sufrieron 3 o más RAM. Los médicos identificaron que un 7,6% de las RAM fueron motivo de ingreso hospitalario [107].

Respecto a los estudios de prevalencia en niños, hay que referir los trabajos de Campos y cols. Se basaron en un estudio de corte transversal que incluyó a escolares entre los 6 y los 14 años, mediante cuestionario que se entregaba en varios centros de estudio, cubriendo población rural y urbana, así como de alto y bajo nivel económico. Consiguieron recuperar entre un 80% y 92% de los cuestionarios. En relación con la “alergia a fármacos”, la prevalencia detectada varió entre el 4,4% y el 9,2% según el centro escolar. La proporción entre varones y mujeres fue de 1:4 [108]. Este trabajo se ha vuelto a repetir en 2004 con idéntica metodología. En relación con la “alergia a fármacos” se obtuvieron prevalencias que oscilaban entre 4,7% y 12,2% en base a los diversos centros [109].

### ***Datos dependiendo del tipo de reacción***

En relación a los diferentes tipos de reacciones de hipersensibilidad a fármacos, sólo existen estudios epidemiológicos sistemáticos y a gran escala en el caso de la anafilaxia de diferentes etiologías y en las reacciones cutáneas graves. Parece claro que los fármacos son una de las principales causas que inducen anafilaxia [110], sin embargo, los datos sobre incidencia de anafilaxia inducida por fármacos son limitados y la mayoría se basan en series de casos en diferentes países.

Una de las series más amplia de anafilaxia es la registrada en Holanda, que incluyó 936 casos declarados a lo largo de 20 años [111]. En este estudio la glafenina, los AINE y los antibióticos fueron los fármacos más frecuentemente implicados. Recientemente también se han publicado otras dos series de casos de anafilaxias declaradas en Francia y Portugal [112, 113]. El estudio de Francia incluyó 333 casos recogidos por la red de Vigilancia de Alergia de Francia. En esta serie, el 81,1% de las anafilaxias fueron ambulatorias y un 18,9% tuvieron lugar durante la anestesia. Fue requerida la hospitalización en un 94,8% de los casos e ingreso en UCI en un 23,7%. Los antibióticos, los agentes utilizados durante la anestesia y los AINE fueron los fármacos más frecuentemente implicados [112].

En Portugal, Ribeiro y cols. realizaron un análisis retrospectivo de los casos declarados al Sistema de Farmacovigilancia Portugués entre los años 2000 y 2011. Encontraron 918 reacciones que cumplían los criterios de anafilaxia y estas representaban un 6% de todas las RAM declaradas. La incidencia estimada fue de 0,79 casos por 100.000 habitantes, cifra que

los autores valoran que está muy por debajo de la real ya que muchas de las reacciones no se declaran a los sistemas de Farmacovigilancia. Un 19% de los episodios requirieron ingreso hospitalario y un 3% fueron mortales. Los antibióticos seguidos de los AINE fueron los medicamentos más frecuentemente implicados [113].

Un reciente estudio publicado en EEUU, incluyó a 716 pacientes atendidos en urgencias y/o hospitalizados por una anafilaxia inducida por fármacos. Un 29% de los pacientes requirió ingreso hospitalario y un 5% de los pacientes atendidos en Urgencias presentó un fallo cardiorrespiratorio (un 23% de los pacientes hospitalizados). Sin embargo, llama la atención que el 82% de los pacientes no fueron evaluados por ningún alergólogo en el año posterior de seguimiento [114].

En relación a las reacciones cutáneas graves, en las últimas décadas se han realizado varios estudios epidemiológicos. Los primeros estudios retrospectivos, sobre casos de SSJ/NET en hospitales, proceden de Francia y Alemania en la década de los 80 [115, 116]. Posteriormente se inició un estudio europeo de casos-control, el estudio SCAR, sobre SSJ/NET [117] al que más tarde se sumaron más países y otras dos patologías cutáneas graves, la PEAG y el DRESS. La mayoría de los datos proceden de este grupo Europeo de Registro de reacciones cutáneas graves, también llamado RegiSCAR, que actualmente incluye a investigadores de varios países de Europa incluyendo a España y también de Israel, Taiwan y Sudáfrica [118].

Se ha estimado la incidencia de SSJ/NET entre 1 - 2 casos por millón de habitantes y año [119]. Sobre la incidencia de la PEAG no existen datos y los estudios que existen son de casos-control y no poblacionales. Sin embargo, parece que esta entidad es más frecuente en determinados países como Francia, lo que podría ser explicado por la mayor utilización de fármacos específicos con un riesgo elevado de producir PEAG, como en el caso del macrólido pristinamicina [120].

En el caso de DRESS tampoco se han realizado estudios epidemiológicos que nos permitan conocer la verdadera incidencia. Los datos existentes sugieren que la incidencia de DRESS relacionada con los anticonvulsivantes puede variar entre 1 de cada 1.000 a 1 de cada 10.000 pacientes expuestos [121].

Teniendo en cuenta los diversos estudios revisados en la bibliografía, podemos concluir que los datos epidemiológicos para las reacciones de hipersensibilidad por

medicamentos son imprecisos. En términos generales afectan al 10 - 20% de los pacientes hospitalizados y hasta un 7% de los pacientes ambulatorios.

Resulta importante que estos datos se interpreten de forma cautelosa, ya que estas reacciones no suelen ser clasificadas de forma adecuada. Es frecuente tanto el infradiagnóstico, ya que no suelen ser comunicadas correctamente; como el sobrediagnóstico, debido a que el término alergia se usa de manera indiscriminada. Asimismo, hay que considerar que muchos de los datos disponibles no se han obtenido de la población general, sino de enfermos ingresados o en urgencias.

Debido a la importancia de los antibióticos BL y de los AINE en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos, como ya se ha citado previamente [103], en este trabajo nos vamos a centrar en dos grupos de reacciones de hipersensibilidad bien conocidas, las reacciones de hipersensibilidad a los antibióticos beta-lactámicos producidas por mecanismos inmunológicos específicos y las reacciones de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos producidas bien por un mecanismo inmunológico o, lo que es más frecuente, reacciones no inmunológicas secundarias a una alteración en el metabolismo del ácido araquidónico.

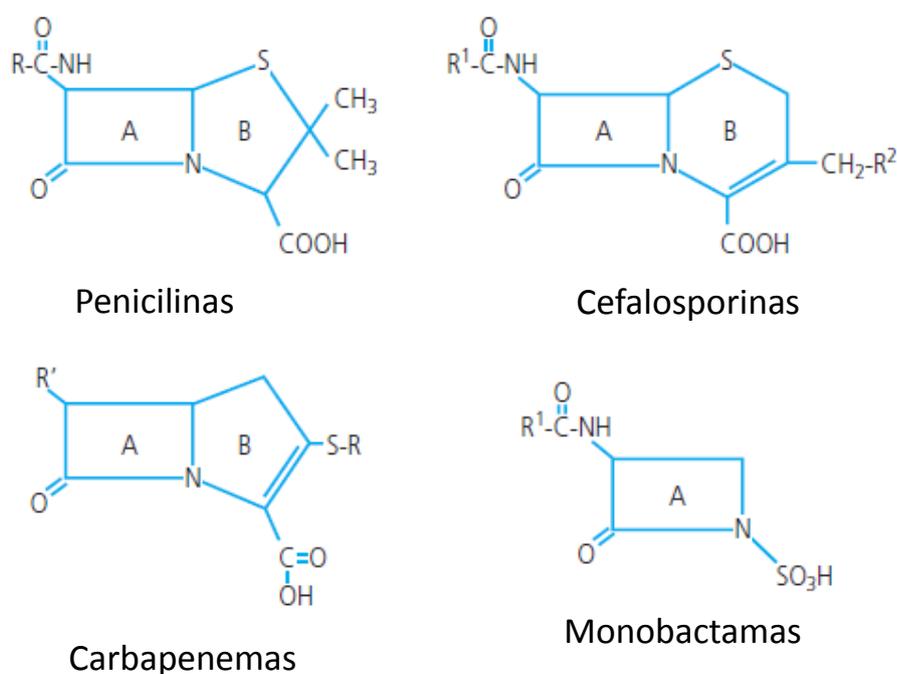
### *1.5 REACCIONES ALÉRGICAS A LOS BETA-LACTÁMICOS*

#### 1.5.1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANTIBIÓTICOS BL

La administración de antibióticos BL es la causa más frecuente de reacciones de hipersensibilidad alérgica mediadas por un mecanismo inmunológico específico [122, 123] como se ha indicado anteriormente. De éstos, las penicilinas son el grupo más involucrado y mejor estudiado debido a que continúan siendo los fármacos de elección para un gran número de enfermedades infecciosas y probablemente los antibióticos prescritos con mayor frecuencia en todo el mundo [124].

La familia de los BL está formada por antibióticos naturales y semisintéticos que inhiben fundamentalmente algún paso de la síntesis de la pared celular bacteriana. Según su estructura química, se clasifican en dos clases mayores: **penicilinas** y **cefalosporinas**, y cuatro menores: **monobactanes**, con estructura monocíclica, **carbapenemos**, **oxacepenemos** (moxalactam) y **clavamatos**.

En la figura 3 se observa la estructura química de los BL. Todos se caracterizan por poseer un anillo común de 4 carbonos denominado anillo beta-lactámico (A) que da nombre al grupo. Las penicilinas poseen, además, un anillo tiazolidínico (B) de 5 carbonos, las cefalosporinas, un anillo de dihidrotiazina y los carbapenémicos, un anillo de cinco carbonos. Los monobactámicos tan sólo poseen un anillo, que es el BL. Todos los BL poseen al menos una cadena lateral que es la responsable de las diferencias dentro de cada grupo. Las cefalosporinas y los carbapenémicos tienen dos cadenas laterales. Resulta importante conocer que grupos diferentes tienen idénticas cadenas laterales, como ocurre por ejemplo entre la amoxicilina y el cefadroxilo, entre ampicilina y cefalexina o entre diferentes cefalosporinas, como por ejemplo entre la cefotaxima y la ceftriaxona.



**Figura 3.** Estructura química de los grupos principales de antibióticos beta-lactámicos. Tomada de Tratado de Alergias. Capítulo 70. M.J. Torres Jaén y cols.

## 1.5.2 INMUNOGENICIDAD Y ALERGENICIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS BL

Los antibióticos BL, al igual que la mayoría de los fármacos, tienen un peso molecular demasiado pequeño para inducir una respuesta inmune por sí mismos. Para hacerlo han de unirse covalentemente a proteínas y formar un complejo hapteno-proteína y adquirir de este modo un completo poder inmunógeno.

Como se ha indicado anteriormente, todas las penicilinas contienen un anillo BL, un anillo tiazolidínico y una cadena lateral unida al anillo BL. Los fármacos pueden ser reactivos o inertes y, en el caso de los BL, su característica principal es que el anillo BL es intrínsecamente reactivo, sin necesidad de un metabolismo previo. Esto ocurre porque en circunstancias fisiológicas, el anillo BL de la bencilpenicilina se abre de manera espontánea, de tal forma que el grupo carbonilo puede unirse covalentemente con grupos amida de proteínas adyacentes, formando el grupo bencil-peniciloil (BPO). El grupo BPO constituye el 95% del producto metabolizado y es conocido como determinante principal o mayoritario de la penicilina. Este determinante se utiliza de manera habitual en la batería de pruebas cutáneas para el diagnóstico de hipersensibilidad a este grupo de antibióticos. Se usa unido a una proteína transportadora [125]. El transportador candidato para formar el grupo peniciloil "*in vivo*" es la albúmina. "*In vitro*" se ha visto que la penicilina reacciona rápidamente con cadenas de poliglicil y polilisina. Los conjugados de peniciloil con polilisina (PPL) son los utilizados habitualmente en las pruebas cutáneas.

Durante la metabolización de la penicilina además del grupo bencil-peniciloil (BPO) se forman otros derivados en pequeña cantidad que pueden ser también reconocidos por la IgE de los pacientes alérgicos. Estos compuestos se denominan determinantes minoritarios o secundarios y constituyen el 5% o menos de los productos de degradación de la penicilina [126]. Dentro de este grupo de determinantes se incluyen distintos derivados como la propia bencilpenicilina, el bencilpeniciloato y bencilpeniloato, y otros como el ácido peniciloico, penicilanil, penicilenato, penamaldato, penaldato o la penicilamina. La inmunología de estos determinantes minoritarios no es tan conocida como la del bencil-peniciloil. Sin embargo, la denominación de "minoritarios" no implica menor importancia inmunológica, porque, en varios estudios se han asociado con las reacciones más graves [127, 128, 129]. Actualmente, en la batería de pruebas cutáneas, se utiliza un determinante minoritario, el peniloato sódico ya que el resto son muy inestables.

Se ha demostrado también la existencia de epítomos inmunogénicos importantes, no sólo en la estructura central, sino también en las cadenas laterales que distinguen a las diferentes penicilinas [130]. En 1967, Atsumi [131] demostró la existencia de diferentes poblaciones de anticuerpos IgG que reconocían distintas partes de la penicilina, tanto de la estructura nuclear como de la cadena lateral. Otros autores también han demostrado la existencia de una respuesta de anticuerpos con distintas especificidades. Así, De Haan [132], mediante la producción de anticuerpos monoclonales identificó 3 epítomos principales en la molécula de penicilina. Uno de los Ac monoclonales mostró una elevada especificidad por la cadena lateral, otro reaccionó con todas las penicilinas nativas (lo que sugiere especificidad para la estructura central binuclear), mientras que el tercero reconoció la estructura de unión entre la penicilina y la proteína, con influencia de la cadena lateral. Es importante tener en cuenta que aunque los anticuerpos IgE reconozcan una parte concreta de la molécula de penicilina, para un reconocimiento óptimo podría ser requerida la molécula completa. Por tanto, los determinantes antigénicos de la penicilina podrían considerarse como un abanico de especificidades que abarcarían la molécula entera con variaciones dependientes de la cadena lateral y del anillo tiazolidina.

La existencia de una respuesta específica de cadena lateral puede tener implicaciones diagnósticas y de tratamiento importantes. Es decir, un paciente que presente una respuesta inmune frente a un determinante de cadena lateral de una penicilina diferente de la bencilpenicilina, podría tolerar la administración de otros derivados con diferente cadena lateral y presentaría una respuesta negativa en las pruebas cutáneas con los determinantes usados de manera general.

En las reacciones no mediadas por IgE, los epítomos antigénicos de las penicilinas que desencadenan dichas reacciones han sido menos estudiados y son peor conocidos. Estas reacciones se manifiestan fundamentalmente como exantemas maculopapulosos y en un porcentaje cercano al 90% son secundarios a la administración de aminopenicilinas. En su mayoría, no es posible demostrar un mecanismo inmunológico, y es frecuente que posteriormente los pacientes toleren estos antibióticos. En determinados casos, estas reacciones no mediadas por IgE estarán producidas por un mecanismo de hipersensibilidad retardada o tipo IV.

Las cefalosporinas tienen una inmunquímica mucho más compleja que la de las penicilinas y los determinantes antigénicos que desencadenan la respuesta inmunológica son menos conocidos. Los grupos amino de proteínas también reaccionan con el anillo BL

de las cefalosporinas para formar conjugados inmunogénicos, pero probablemente los determinantes se forman sólo de manera transitoria antes de degradarse a estructuras simples a diferencia de las penicilinas. Por otra parte, parece que las cefalosporinas pierden la estructura del anillo tras la acción de las beta-lactamasas, lo que podría generar la formación de determinantes hapténicos únicos para las cefalosporinas.

La reactividad cruzada entre cefalosporinas seguirá los mismos principios que en las penicilinas, y si los anticuerpos IgE reconociesen solamente la estructura central sin tener en cuenta la estructura de la cadena lateral, existiría reactividad cruzada entre todas las cefalosporinas. Sin embargo, como la estructura de las cadenas laterales, R1 y R2, es diferente en las distintas cefalosporinas, la reactividad cruzada puede producirse a través de la cadena lateral R1, en cefalosporinas con cadenas laterales iguales (cefalexina, cefaclor y cefaloglicina) o similares (cefaclor y cefadroxil); o bien por el reconocimiento de la estructura R2 (cefalexina y cefradina, o cefalotina y cefotaxima). Así pues, teniendo en cuenta varios trabajos publicados entre los que destacan un estudio [133] realizado con suero de sujetos alérgicos a cefaclor y un trabajo realizado por Romano y cols. [134], la reactividad cruzada entre distintas cefalosporinas parece ser inferior a la encontrada entre penicilinas.

Por otro lado, si la respuesta inmunológica se encuentra dirigida frente a la estructura central binuclear, existirá una importante reactividad cruzada entre las cefalosporinas y las penicilinas. Sin embargo, en las cefalosporinas los anticuerpos dirigidos contra las estructuras de la cadena lateral tienen una mayor importancia inmunológica. Podemos afirmar que la reactividad cruzada *in vivo* entre penicilinas y cefalosporinas con diferente cadena lateral es de aproximadamente un 10% y puede aumentar a más de un 30% cuando las cadenas laterales son idénticas. Los estudios *in vitro* pueden sobrestimar la presencia de reactividad cruzada [135]. La reactividad cruzada con las cefalosporinas de segunda y tercera generación parece ser mucho menor aún.

El aztreonam, BL monobactámico, también es capaz de reaccionar con proteínas y parece que la respuesta inmunológica es específica de cadena lateral. La reactividad cruzada entre el aztreonam y el resto de los antibióticos BL es baja, ya que el aztreonam carece del segundo anillo adyacente al núcleo beta-lactámico. En un trabajo realizado en pacientes con fibrosis quística e hipersensibilidad a BL, que toleraron el aztreonam, 2/19 pacientes presentaron una reacción en una segunda exposición [136].

Los carbapenemos (imipenem, meropenem o ertapenem) son BL de amplio espectro con los que inicialmente se constató una elevada reactividad cruzada con las penicilinas. Así, en un estudio, Saxon y cols. [137] demostraron mediante pruebas cutáneas, reactividad cruzada con las penicilinas en un 50% de pacientes estudiados. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varias series de pacientes alérgicos a penicilinas en los que la reactividad cruzada con carbapenemos fue muy baja [138, 139].

El ácido clavulánico es un inhibidor de la beta-lactamasa, que se ha formulado siempre con otras penicilinas y se ha considerado durante mucho tiempo como poco inmunogénico. Sin embargo, en los últimos años, debido probablemente al gran aumento en la utilización de amoxicilina junto con el clavulánico, se han descrito varias series con pacientes con hipersensibilidad específica a ácido clavulánico [140] y buena tolerancia a otros antibióticos BL [141, 142].

### 1.5.3 TIPOS DE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A BL

Las reacciones de hipersensibilidad a antibióticos BL son variadas y se han descrito los cuatro tipos de reacciones inmunológicas definidas por Gell y Coombs y comentadas previamente:

- Reacciones de hipersensibilidad inmediata o tipo I: se producen por la interacción de los determinantes antigénicos de la penicilina con anticuerpos IgE específicos preformados que se encuentran unidos a los mastocitos y/o basófilos mediante los receptores de alta afinidad de dichas células. La interacción de los determinantes con los anticuerpos IgE específicos dará lugar a la liberación de mediadores desencadenando cuadros de urticaria, edema laríngeo, broncoespasmo llegando incluso a reacciones anafilácticas.
- Reacciones de tipo II o mediadas por anticuerpos citotóxicos: los determinantes de la penicilina pueden unirse a la membrana de las células circulantes a través de IgG o IgM y del complemento, lo que lleva a su destrucción. Este tipo de reacciones desde el punto de vista clínico consisten en cuadros de anemia hemolítica, neutropenia o trombocitopenia.

- Reacciones de tipo III o por inmunocomplejos: estas reacciones se producen por la formación de inmunocomplejos entre IgG e IgM y los determinantes de la penicilina unidos a proteínas, principalmente albúmina. Estos inmunocomplejos circulantes pueden activar el complemento y producir daño tisular. Incluyen afectación cutánea en forma generalmente de exantema, artralgias, adenopatías, fiebre y afectación renal. En este tipo de reacciones se incluiría la enfermedad del suero.
- Reacciones de hipersensibilidad celular o tipo IV: el mecanismo propuesto para este tipo de reacciones, es una respuesta mediada por células T y en las biopsias cutáneas se ha demostrado la presencia de un infiltrado inflamatorio con linfocitos T CD4 y CD8 (48, 49, 50). Un ejemplo de este tipo de reacciones es la dermatitis de contacto en respuesta a las penicilinas.

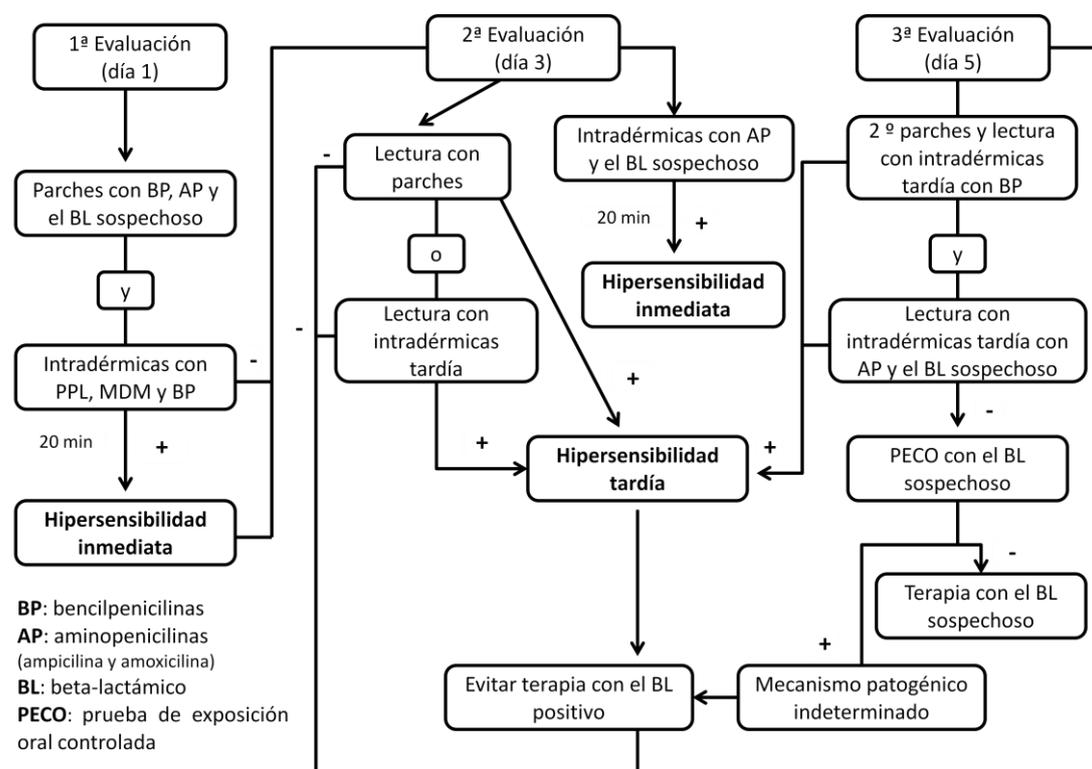
Dado que los mecanismos que desencadenan la mayoría de las reacciones alérgicas a los penicilinas están mediados por IgE o por células T, desde un punto de vista más práctico se ha propuesto otra terminología que clasifica las reacciones en inmediatas y no inmediatas, incluyendo estas últimas a las reacciones aceleradas y tardías, como ya ocurría en la clasificación de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos en general.

### 1.5.4 DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS BL

La realización de un diagnóstico correcto nos permite detectar aquellos sujetos que realmente presenten un estado de hipersensibilidad a este grupo de antibióticos. El grupo ENDA ha propuesto varios algoritmos diagnósticos para la evaluación de las reacciones inmediatas [143] y no inmediatas a los antibióticos BL [144] (Figura 4).

La evaluación diagnóstica de estos pacientes se basa en una descripción detallada de los síntomas, que se puede obtener de los propios pacientes, de familiares en el caso de los niños, o de informes clínicos. Existen datos primordiales que siempre se deben intentar recoger: el tiempo transcurrido entre la toma del fármaco y la reacción y el tipo de síntomas. Lo primero es fundamental para clasificar las reacciones en inmediatas o no inmediatas y lo segundo para definir el tipo de reacción. El tiempo transcurrido desde que ocurrió la reacción hasta el estudio alergológico es un punto importante de la anamnesis, ya que la sensibilidad de los métodos diagnósticos en las reacciones inmediatas disminuye

con el tiempo, no así en las reacciones no inmediatas, en las cuales la positividad persiste en la mayoría de los pacientes. Además, se debe preguntar la edad, sexo, historia de atopia, presencia de alergia a otros fármacos, historia familiar de alergia, fármacos que esté tomando el paciente, última tolerancia a los BL, dosis y vía por la que el fármaco indujo la reacción, cuánto tiempo llevaba tomándolo antes del comienzo de la reacción, el tratamiento recibido para la reacción y si había presentado episodios similares previos [145].



**Figura 4.** Algoritmo diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad no inmediatas a BL. Tomado de Tomada de *Allergy*, 2004; **59**: 1153-1160.

Sin embargo, aunque la historia clínica continúa siendo una herramienta útil en el diagnóstico de alergia a estos antibióticos, debe apoyarse en otras técnicas diagnósticas. Entre las técnicas para el diagnóstico disponemos de métodos “*in vivo*” (pruebas cutáneas y de exposición controlada) y de otros métodos “*in vitro*” (determinación de IgE específica, test de degranulación de basófilos, test de liberación de histamina, la producción de sulfidoleucotrienos antígeno específica o el test de estimulación alérgica celular).

#### 1.5.4.1 MÉTODOS "IN VIVO"

##### **PRUEBAS CUTÁNEAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA A BL**

Las pruebas cutáneas constituyen la técnica básica para el diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE a antibióticos BL. Las reacciones inmediatas, a pesar de no ser las más frecuentes, constituyen el porcentaje más alto de estudio en los servicios de Alergología [104].

En las reacciones mediadas por IgE, la sensibilidad y especificidad de las pruebas cutáneas, es variable y existen pocos trabajos que aborden específicamente este tema. El porcentaje de respuestas positivas puede variar no sólo en diferentes poblaciones sino también a lo largo de los años. Estudios realizados en nuestro país, han descrito una disminución de la sensibilidad de las pruebas cutáneas a lo largo del tiempo con cifras que caen del 77,7% en estudios iniciales hasta el 22% en otros más recientes [146, 147].

Parece claro que la frecuencia más elevada de pruebas cutáneas positivas se encuentra en pacientes con antecedentes personales muy sugestivos de reacciones inmediatas, como ocurre en los casos de urticaria y anafilaxia y también cuando ha transcurrido un pequeño intervalo de tiempo entre la reacción clínica y la realización de las pruebas cutáneas [148, 149]. Sin embargo, en aquellos sujetos sin antecedentes de reacción el porcentaje de positividad se reduce entre un 2 - 7% [149, 150].

Por otro lado, y como ha sido mencionado anteriormente, la frecuencia de positividad de las pruebas cutáneas es inversamente proporcional al tiempo transcurrido desde la reacción clínica. En ausencia prolongada de estímulo antigénico, el porcentaje de individuos cuyas pruebas cutáneas se negativizan es variable. En un estudio llevado a cabo por Finke [151], el porcentaje de resultados positivos era del 73% cuando las pruebas eran realizadas en los tres primeros meses y descendía a un 25% cuando la evaluación se realizaba de 5 a 10 años después.

Una prueba positiva es sugerente de que el paciente va a presentar una reacción con la administración del antibiótico. Sin embargo, se han realizado pocos estudios de pruebas de exposición con el fármaco en sujetos con pruebas positivas, por el riesgo que esto conlleva. En estos escasos estudios [148, 149, 152], las pruebas cutáneas positivas fueron predictivas de sensibilización clínica entre un 50% a un 70% de los pacientes con antecedentes de

reacción con penicilinas. También se ha demostrado una alta especificidad de las pruebas cutáneas, apareciendo una reacción clínica entre un 0,7% a un 7% de los casos en los cuáles las pruebas cutáneas fueron negativas y se ha administrado el antibiótico [153, 154].

La penicilina G y sus productos de degradación reaccionan con proteínas séricas o tisulares que llevan a la formación de antígenos completos que ya tienen capacidad para inducir una respuesta IgE específica. El determinante mayoritario o principal de la penicilina, bencilpeniciloil (BPO) unido a un transportador no inmunogénico, como la polilisina, da lugar al complejo peniciloilpolilisina (PPL), utilizado de forma habitual como reactivo para las pruebas cutáneas, las cuáles son capaces de detectar entre un 35% a un 70% de sujetos alérgicos a penicilina [155].

Sin embargo, la bencilpenicilina puede formar otros determinantes antigénicos adicionales en pequeñas cantidades, los denominados determinantes antigénicos minoritarios o secundarios (MDM). Estos determinantes minoritarios se han asociado con reacciones inmediatas graves, por lo que la utilización del determinante principal exclusivamente puede dejar sin diagnosticar a los pacientes con estas reacciones graves. Como determinante minoritario actualmente se utiliza el peniciloato sódico ya que otros anteriormente comercializados se ha demostrado que eran muy inestables.

La sensibilidad y el valor predictivo de las pruebas cutáneas, aumenta con la utilización conjunta de los determinantes antigénicos principales y secundarios. Pero, como hemos citado anteriormente, existen epítomos antigénicos distintos para los diferentes BL, por lo que la utilización de otros compuestos como material para pruebas cutáneas, aumenta su sensibilidad diagnóstica. Además, la utilización de otros compuestos ha llevado a demostrar que un número significativo de pacientes, responde de manera específica a un determinado antibiótico, las llamadas reacciones selectivas. Así, Van Dellen y cols. (1970) [156] realizaron un estudio de pruebas cutáneas usando determinantes principales y secundarios de bencilpenicilina, ampicilina y meticilina, y se encontraron tanto pacientes que respondían a todos los reactivos como sujetos que respondían sólo a un tipo específico de penicilina. En el estudio de Solley y cols. (1982) [153], un 17% de los pacientes presentaban reacciones positivas con preparaciones de ampicilina y meticilina pero negativas con los determinantes principales y secundarios de la bencilpenicilina. Otro autor, Silviu Dann (1993) [157], también encontró que un 47,6% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas mostraba una respuesta cutánea selectiva con determinantes específicos de cadena lateral. Ya en

nuestro país, el grupo de Blanca y cols., [146] encuentran un 31% de pacientes con hipersensibilidad selectiva a aminopenicilinas.

El grupo ENDA ha publicado las normas para la realización e interpretación adecuada de las pruebas cutáneas, incluyendo las técnicas, reactivos, concentraciones y criterios de positividad [143]. Cuando las pruebas se realizan correctamente, utilizando los reactivos, las dosis y la técnica adecuada, los riesgos de reacción son escasos y las contraindicaciones de la realización de estas pruebas son las típicas de las pruebas cutáneas con medicamentos. Pero, hay que tener en cuenta, que puede tener lugar una reacción sistémica entre un 0,4 a un 4% de los sujetos [158] la cual puede ser grave e incluso comprometer la vida del paciente. Por ello, las pruebas deben ser realizadas siempre por personal especializado y con acceso a medicación y equipo médico para el manejo de una posible anafilaxia.

#### **PRUEBAS CUTÁNEAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD NO INMEDIATA A BL**

En este grupo se incluirían todas las reacciones que no están mediadas por IgE, y que suceden con un intervalo de tiempo superior a una hora tras la toma del fármaco. Las reacciones aceleradas y tardías descritas anteriormente se incluyen en este tipo de reacciones. Las reacciones más comunes, no suelen ser graves e incluyen normalmente los exantemas maculopapulosos, seguidos de la urticaria [159] y son las aminopenicilinas los BL más frecuentemente implicados en ambos tipos de reacciones, induciendo sobre todo, reacciones específicas de cadena lateral [160, 161, 162]. En muchos casos, no es posible asociarlas con un mecanismo inmunológico. Sin embargo, existen varios estudios que han demostrado que en un determinado número de pacientes, se trataría de reacciones de hipersensibilidad retardada (tipo IV) asociadas a una respuesta celular T con positividad en las pruebas cutáneas con parches o en las pruebas intradérmicas de lectura tardía [134, 160, 161].

Tenemos que tener presente que aunque estas reacciones pueden estar producidas por cuadros virales, pueden aparecer reacciones alérgicas verdaderas durante un tratamiento con una aminopenicilina y que se pueden inducir tras la readministración del fármaco implicado [160, 161].

En pacientes con reacciones no inmediatas por fármacos, la evaluación clínica resulta mucho más compleja por diversos motivos. El intervalo de tiempo prolongado entre la toma del fármaco y la reacción hace que se pierda y se olvide mucha información, y por ello no quede registrada en los informes clínicos. Otro inconveniente es la gran diversidad de cuadros clínicos, complicando mucho más la anamnesis. Los cuadros cutáneos son, en ocasiones, indistinguibles de cuadros virales e incluso la reacción se puede producir por la coexistencia de fármacos e infección por virus. Es por ello, que en este tipo de reacciones la anamnesis ha de realizarse de una forma cuidadosa, intentando recoger la mayor cantidad de información posible. La evaluación diagnóstica en las reacciones de hipersensibilidad no inmediata incluye la realización de pruebas cutáneas y de exposición, ya que el papel de los métodos diagnósticos *in vitro* es controvertido.

Ya hace años, Levine describió la existencia de pruebas cutáneas intradérmicas tardías positivas, en pacientes con exantema cutáneo [34]. Son numerosos los estudios que describen las pruebas epicutáneas en parche [161, 163] e intradérmicas [164, 163] como método diagnóstico en las reacciones no inmediatas por fármacos. Sin embargo, se ha demostrado, en múltiples artículos que la sensibilidad de las pruebas cutáneas intradérmicas es mayor que la de las pruebas epicutáneas en parche [165, 166, 167], además, las pruebas cutáneas intradérmicas presentan muchas ventajas ya que el paciente puede ir monitorizando su propia respuesta, permiten valorar también la respuesta inmediata y son más fáciles de preparar que las epicutáneas en parche. Las pruebas intraepidérmicas (prick) no resultan útiles en las reacciones no inmediatas y parece que su único valor es descartar la existencia de reacciones inmediatas.

En la bibliografía, la mayoría de los estudios encuentran que los pacientes con pruebas cutáneas tardías positivas en intradermorreacción o epicutáneas en parche, presentan un resultado negativo con los determinantes principales y secundarios de la penicilina [160, 134, 168], mostrando positividad únicamente con aminopenicilinas.

En todas las pruebas positivas es optativa la realización de una biopsia cutánea para confirmar el infiltrado inmunológico. La posibilidad de aparición de alguna reacción sistémica con la realización de las pruebas cutáneas [167, 169] es mucho menor que en el caso de las reacciones inmediatas.

Hay resultados con BL, particularmente con aminopenicilinas, que muestran que la hipersensibilidad tardía puede ser una condición de larga duración y que parece no estar influida por el intervalo de tiempo entre la última reacción adversa y la realización de los

test alérgicos [161, 134, 170]. Esto difiere de las reacciones de hipersensibilidad inmediatas, que tienden a desaparecer con el tiempo si se evita el fármaco responsable [148, 149, 152, 171].

La sensibilidad de las pruebas cutáneas intradérmicas es mayor que la de las epicutáneas en parche como ya se ha mencionado previamente. En cuanto a la especificidad de las pruebas cutáneas, tanto intradérmicas como epicutáneas en parche es muy elevada, con pocas posibilidades de falsos positivos. Además es importante destacar que la sensibilización de las pruebas cutáneas permanece durante muchos años en estos pacientes con reacciones de hipersensibilidad no inmediata [160, 161], y son pocos los estudios en los que se describe un porcentaje mínimo de negativización.

En la revisión de Romano y cols. [144], en la que participa el grupo ENDA, consideran que las pruebas epicutáneas en parche y las pruebas intradérmicas son las herramientas usadas en la evaluación de las reacciones alérgicas no inmediatas a BL, en particular, exantemas pustulares o bullosos, con o sin afectación de órganos. Los test intradérmicos parecen ser más sensibles en el diagnóstico pero menos específicos en relación a las pruebas epicutáneas en parche. En el caso de reacciones positivas, ha de evitarse siempre la administración de BL. Pacientes con síntomas leves, pero estudio alérgico negativo, podrían ser candidatos a los test de provocación.

### **PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA**

Debido a que la sensibilidad de las pruebas cutáneas y los métodos *in vitro* disponibles en la actualidad no son óptimos, se necesitan otros métodos que confirmen el diagnóstico de hipersensibilidad a BL. El único método disponible hoy por hoy es la prueba de exposición controlada bajo un estricto control médico [143, 172].

Ante unas pruebas cutáneas negativas, habitualmente, el estudio debe proseguir mediante la administración del antibiótico implicado en la reacción previa presentada por el paciente. La administración del antibiótico se realizará de forma controlada, con dosis progresivamente crecientes a intervalos habitualmente horarios y bajo supervisión continua del personal médico que realiza el estudio. Así, en caso de producirse una reacción el paciente se encontraría en una unidad con los medios y el personal sanitario necesario para actuar de forma rápida y adecuada.

Aberer y cols. en conjunto con el grupo ENDA [173] definen los principios y fundamentos generales de la prueba de exposición controlada y proponen algoritmos y recomendaciones basadas en evidencias de los datos publicados en la bibliografía. En ocasiones, la prueba de provocación constituye la única herramienta para confirmar la hipersensibilidad a fármacos y establecer un diagnóstico seguro. La búsqueda de una relación causa-efecto resulta esencial y con frecuencia incluye la realización de la prueba de exposición controlada. En cualquier caso, siempre ha de calcularse el riesgo-beneficio de la realización de la prueba teniendo en cuenta todas las contraindicaciones y consideraciones éticas. Según este grupo [173], la realización de la prueba de exposición ha de seguir los criterios establecidos y protocolos perfectamente definidos para los diferentes grupos de fármacos por un lado y los signos clínicos de hipersensibilidad por el otro. Resulta importante tener en cuenta las limitaciones de esta prueba, que puede conducir a resultados falsos positivos o falsos negativos, e incluso una prueba de exposición negativa no garantiza la tolerancia de ese fármaco en el futuro.

### 1.5.4.2 MÉTODOS “IN VITRO”

#### **DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA**

El descubrimiento de la IgE en 1967, junto con el desarrollo de técnicas de radioinmunoanálisis supuso un gran avance en el campo de la Alergología. La detección de IgE específica frente a conjugados de penicilina fue descrita inicialmente (1971) por Wide y Juhlin [174]. Ambos autores emplearon conjugados de penicilina G y V acoplados a albúmina sérica humana (HSA).

En la actualidad, existen múltiples métodos para la cuantificación de anticuerpos IgE específicos a BL, pero los más usados son los inmunoanálisis, como radioinmunoanálisis (RIA), el enzimoimmunoanálisis (ELISA), o el fluoroinmunoanálisis (FEIA), siendo los más validados el RIA, fundamentalmente el *radioallergoabsorbent test* (RAST), y el FEIA mediante el método *Cap-System* (CAP) [175-179]. Todos se basan en la detección de complejos hapteno-molécula transportadora-anticuerpo.

La sensibilidad de esta técnica varía en los diferentes estudios y parece que en los últimos años esta sensibilidad está disminuyendo. Podemos afirmar que la sensibilidad del CAP en el momento actual es inferior a lo que se había pensado previamente, sin alcanzar

en términos generales el 40% [180]. Aunque los estudios existentes [181, 182] que comparan las pruebas cutáneas y los métodos de determinación de IgE específica *in vitro* no son totalmente equivalentes, parecen destacar la inferior sensibilidad de este último método diagnóstico con respecto a las pruebas cutáneas.

Las principales ventajas de la determinación de IgE específica son que el alérgeno una vez fijado a la fase sólida es estable, que los resultados se expresan de forma cuantitativa, permitiendo de este modo que se puedan comparar. Además son técnicas que no suponen ningún tipo de riesgo para el paciente y no se encuentran influenciadas por la medicación u otros factores externos como la existencia de patologías cutáneas graves.

Sin embargo, en la detección de IgE específica frente a medicamentos surgen problemas habituales, por una parte, la naturaleza no proteica del antígeno, existiendo dificultades de fijación a la fase sólida, y por otra, la dificultad para conocer con exactitud las transformaciones a las que se enfrenta el fármaco en el organismo así como la estructura concreta del hapteno-transportador que se fija a la fase sólida.

Otras causas que pueden influir en el bajo porcentaje de positividad, es el bajo nivel de IgE que presentan habitualmente los pacientes, lo que requiere métodos muy sensibles para la detección de IgE específica. Además, la presencia de anticuerpos anti-BPO disminuye de forma rápida tras la reacción, de una forma más rápida que la observada en las pruebas cutáneas [183, 184].

Por otra parte, aparecen resultados falsamente negativos en pacientes con altos niveles de IgG, que pueden unirse al alérgeno de manera competitiva con los anticuerpos IgE. También se pueden encontrar falsos positivos en aquellos pacientes con niveles elevados de IgE total en suero (>500 o 1000 UI/ml), debido a la fijación inespecífica de esa IgE total al alérgeno unido a la fase sólida [155].

Es importante destacar que los estudios existentes que utilizan los determinantes minoritarios de la penicilina [185], penicilinas semisintéticas y cefalosporinas, han demostrado un incremento en la frecuencia de resultados positivos, y una gran heterogeneidad en los Ac IgE específicos. También se han encontrado diferencias en los resultados dependiendo del hapteno utilizado [186].

Con respecto a los pacientes con respuesta selectiva a la amoxicilina (AX) que se encuentra dentro del grupo de aminopenicilinas, aquellos con pruebas cutáneas exclusivamente positivas con AX suelen tener el inmunoanálisis positivo exclusivamente

con AX [146], siendo probablemente, estos métodos los más precisos para la identificación de las reacciones selectivas a la cadena lateral.

## 1.6 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A LOS AINE

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) forman una clase heterogénea de fármacos pertenecientes a diferentes grupos químicos (Tabla 1). Como grupo, estos fármacos tienen diferentes acciones antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas y relacionadas con la inhibición de la función plaquetaria. El principal mecanismo de acción de los AINE es la inhibición de la prostaglandina G/H sintetasa (o ciclooxigenasa, COX) que cataliza la conversión del ácido araquidónico a PG (10 TA).

**Tabla 1.** Clasificación química de algunos AINE.

GRUPOS QUÍMICOS DE AINE	
<b>Ácidos carboxílicos</b>	Acetilados: ácido acetilsalicílico No acetilados: diflunisal, salsalato
<b>Ácidos acéticos</b>	Diclofenaco, indometacina, tolmetin, sulindaco, ketorelaco
<b>Ácidos propiónicos</b>	Ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, fenbufeno, flurbiprofeno, carbrofeno y suprofeno
<b>Ácidos antranílicos</b>	Ácido flufenámico, ácido mefenámico, ácido meclofenámico y ácido nulfímico
<b>Oxicames</b>	Piroxicam, sudoxicam, tenoxicam e isoxicam
<b>Pirazolonas</b>	Metamizol (dipirona), propifenazona y fenilbutazona
<b>No ácidos</b>	Nabumetona

### 1.6.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS A AINE

Son varios los términos que se han usado para definir las reacciones adversas no predecibles producidas por AINE: intolerancia, idiosincrasia, pseudoalergia o alergia [187]. Sin embargo, en la actualidad, teniendo en cuenta las recomendaciones de nomenclatura internacional, el término más apropiado es el de hipersensibilidad [188, 189]. Estas

reacciones de hipersensibilidad se dividen en dos grupos en función del mecanismo implicado: inmunológico o no inmunológico [190].

Las no inmunológicas o no alérgicas son las denominadas anteriormente reacciones de intolerancia o idiosincrasia, son las más frecuentes. En estas reacciones, el mecanismo de actuación de los AINE es por inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX-1). Se producen alteraciones en la biosíntesis de los eicosanoides, en concreto, una sobreproducción de leucotrienos cisteínicos. Es importante mencionar que todos los AINE que tienen capacidad para inhibir la COX-1 son susceptibles de producir síntomas, existiendo reactividad cruzada entre ellos independientemente de su estructura química. Las inmunológicas o alérgicas, se han denominado también reacciones selectivas, son reacciones limitadas a un AINE en particular o a un grupo de AINE con una estructura química similar, mostrando una buena tolerancia a otros AINE con estructura diferente. Son reacciones mediadas por un mecanismo inmunológico, ya sea por anticuerpos IgE específicos (humoral) o por linfocitos T efectores (celular) [191].

Stevenson y cols., en el 2001, proponen una clasificación de las reacciones de hipersensibilidad a AINE, como intento de unificación de todas las existentes hasta ese momento [192]). Dicha clasificación ha servido de base a la propuesta recientemente por la EAACI, que clasifica las reacciones de hipersensibilidad a AINE de la siguiente manera [193]:

1. **Enfermedad respiratoria exacerbada por AINE (EREA):** Se caracteriza por la aparición de sintomatología respiratoria (asma y/o rinitis) producida por AINE en pacientes con patología respiratoria de base (rinitis, pólipos nasales y/o asma bronquial). Cabe destacar que presenta un patrón de reactividad cruzada a múltiples AINE con estructura química diferente.
2. **Urticaria/angioedema exacerbada por AINE o Enfermedad cutánea exacerbada por AINE (ECEA):** Son pacientes con urticaria crónica idiopática que desarrollan habones e incluso angioedema tras la exposición a AINE. Al igual que EREA presenta reactividad cruzada entre diferentes AINE que no se relacionan estructuralmente.
3. **Urticaria/angioedema inducida por AINE:** Se trata de reacciones de tipo cutáneo (urticaria y/o angioedema) inducidas por AINE que no se asocian a urticaria crónica como enfermedad concomitante subyacente. En ocasiones las reacciones pueden ser muy graves, llegando incluso a la anafilaxia. Al igual que los dos tipos

anteriores presenta un patrón de reactividad cruzada a múltiples AINE no relacionados en su estructura química.

4. **Urticaria/angioedema o anafilaxia selectivas por AINE:** Son aquellas reacciones producidas por un fármaco específico o AINE con una estructura química muy similar, presentando buena tolerancia a AINE con estructura química diferente. Los síntomas pueden ser solamente cutáneos hasta la anafilaxia.
5. **Reacciones retardadas selectivas por AINE:** reacciones en las que el intervalo de aparición de los síntomas es superior a 24 horas. Son producidas por un fármaco específico o por diferentes AINE con una estructura química muy similar, pero presentan buena tolerancia a AINE con estructura química diferente.

## 1.6.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE

Los AINE son considerados actualmente el grupo de fármacos más frecuentemente implicado en reacciones de hipersensibilidad a medicamentos [194, 195]. En cifras generales, se considera que la hipersensibilidad a AINE afecta al 0,5 - 1,9% de la población general [196, 106]. Existe mucha controversia en lo referente a la prevalencia de la hipersensibilidad a los AINE en los pacientes asmáticos. Si nos centramos en aquellos estudios que incluyen pacientes evaluados exclusivamente mediante la historia clínica, las cifras de prevalencia oscilan entre el 4 y el 11% [197, 198]; sin embargo, si el diagnóstico se basa en la prueba de exposición oral controlada, la prevalencia aumenta hasta el 21% [199]. En aquellos pacientes con asma bronquial y poliposis nasal, la prevalencia de hipersensibilidad a AINE puede alcanzar hasta el 25,6% [200].

Las reacciones mejor estudiadas en las que se han centrado la mayoría de los estudios, son las que afectan a la vía respiratoria, aunque las más frecuentes son las de tipo cutáneo [201], resultando afectada entre un 0,07% - 0,3% de la población general [193, 202]. El porcentaje de hipersensibilidad a AINE en pacientes con urticaria crónica de base puede alcanzar hasta el 30% [203, 204]. Por el contrario, la prevalencia de urticaria aguda inducida por AINE en sujetos sin enfermedad cutánea de base es desconocida, aunque hay un estudio [205] en que se incluyeron a 261 pacientes adultos sanos, de los que 94, un 36%, desencadenaron algún tipo de reacción adversa cutánea a algún AINE.

Teniendo en cuenta las reacciones de hipersensibilidad selectiva a un AINE específico, la prevalencia varía entre un 0,1% y 3,6% de los sujetos que toman AINE intermitente o de forma crónica por un dolor agudo [194, 206, 207]. Revisando la bibliografía, los datos disponibles hacen referencia exclusivamente a las reacciones inmediatas o anafilácticas. En este sentido, se refleja que los AINE son el principal [208, 209] o el segundo grupo farmacológico [210] responsable de dichas reacciones. Las reacciones de tipo sistémico pueden ser inducidas por todos los AINE [205, 207, 211, 212]. El grupo de las pirazolonas son las que con mayor frecuencia, desencadenan reacciones selectivas inmediatas a AINE [199, 111, 213]. Los inhibidores de la COX-2 también pueden inducir reacciones de hipersensibilidad, aunque la prevalencia es mucho más baja, se estima alrededor de un 0,008% [214]. En el caso de las reacciones selectivas no inmediatas, la prevalencia es desconocida y reacciones graves como el eritema multiforme, la necrolisis epidérmica tóxica, el síndrome de Stevens Johnson y el síndrome de DRESS inducidas por AINE son muy raras [215].

### 1.6.3 PATOGENIA DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE

Se han implicado tanto mecanismos inmunológicos como no inmunológicos. A continuación definiremos las diferentes patologías asociadas a las reacciones de hipersensibilidad a AINE describiendo el mecanismo implicado en cada caso.

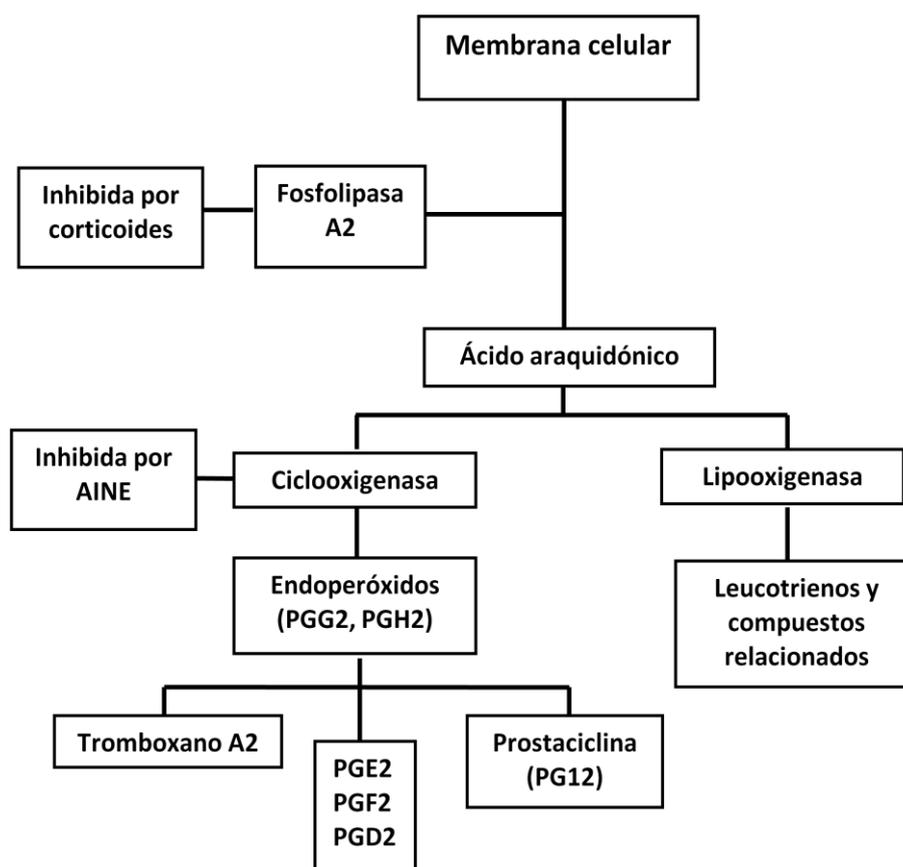
- **Enfermedad respiratoria exacerbada por AINE (EREA)**

La patogénesis de la rinitis y asma inducida por AINE resulta compleja y no del todo conocida. A día de hoy se admite que la enfermedad se caracteriza por una alteración en el metabolismo del ácido araquidónico, y como consecuencia, se produce la síntesis y liberación de una gran cantidad de leucotrienos cisteinílicos o cisteinileucotrienos (CisLT) por eosinófilos y mastocitos en la mucosa de los órganos diana [216]. Paralelamente, se incrementa la densidad de receptores de los leucotrienos cisteinílicos (CisLT-R) en las células inflamatorias de la mucosa [217] y una alteración en el metabolismo de las prostaglandinas (PG) [218, 219, 220, 221].

El ácido araquidónico puede metabolizarse mediante dos vías enzimáticas: en una de ellas interviene la COX y da lugar a la formación de prostaglandinas; y en la otra participa la lipooxigenasa que es responsable de la síntesis de leucotrienos (Figura 5). Existen al menos

dos isoformas de la COX, COX-1 y COX-2, codificadas por distintos genes. La isoforma constitutiva, COX-1, se expresa en muchos tejidos y órganos y está implicada en funciones fisiológicas y de homeostasis, mientras que la forma inducible COX-2 es inducida por numerosos estímulos pro-inflamatorios [222]. Todos los AINE convencionales bloquean, tanto la COX-1, como la COX-2, sin embargo, cada uno de los AINE muestra una marcada selectividad por una u otra isoforma enzimática. El bloqueo de COX, y sobre todo de COX-1, en individuos susceptibles, parece ser el pilar sobre el que se sostiene la patogénesis de las reacciones por AINE en pacientes con EREA. Szczeklik [223] propuso una hipótesis en la cual, la inhibición de la COX-1 por los AINE, en pacientes con enfermedad respiratoria rinitis-asma, induce un descenso de PGE<sub>2</sub> que lleva a la sobreproducción de leucotrienos cisteinílicos.

Los efectos biológicos de estos CisLT reproducen muchos de los aspectos clínicos, anatomopatológicos y patogénicos del asma. Los CisLT derivan del metabolismo del ácido araquidónico, éste se oxida por la 5-lipoxigenasa en los leucocitos activados para formar el leucotrieno inestable LTA<sub>4</sub>. En neutrófilos, LTA<sub>4</sub> es hidrolizado por la LTA<sub>4</sub>-hidrolasa para formar LTB<sub>4</sub>. El LTB<sub>4</sub> es transformado en monocitos, mastocitos, eosinófilos y basófilos por la LTC<sub>4</sub> sintasa en LTC<sub>4</sub>, precursor de CisLT. El LTC<sub>4</sub> es exportado fuera de la célula y convertido en LTD<sub>4</sub> y este se transforma en el metabolito final estable LTE<sub>4</sub>. Los niveles de LTE<sub>4</sub> en orina de pacientes con EREA son entre 3 y 5 veces más altos y pueden llegar a ser hasta 100 veces superiores tras la administración de AAS.



**Figura 5.** Mecanismo de actuación de los AINE mediante inhibición de la COX. Tomada de Tratado de Alergias. Capítulo 73. N.R. Ortega Rodríguez y cols.

Otro elemento clave en la patogénesis del asma inducida por AINE es la PGE2 y su poderoso efecto de retroalimentación negativa sobre la 5-lipooxygenasa. En las células epiteliales e inflamatorias de las vías aéreas, la síntesis de PGE2 se suprime como consecuencia de la inhibición de COX-1 y el efecto de retroalimentación negativo sobre la 5-LO desaparece. Esto se asocia con un incremento en las síntesis y liberación de CisLT, que parece ser el principal desencadenante en la sobreproducción de LT, con la consiguiente reacción en el tracto respiratorio.

Existen varios genes candidatos que podrían estar implicados hacia una predisposición genética para desarrollar EREA, algunos alelos HLA, varios SNP en el receptor 1 de los CisLT, LTC4S, receptores de tromboxanos, el receptor para PGE2, el factor de transcripción T-box o el promotor del factor de necrosis tumoral alfa [224]. Sin embargo, ninguno de ellos, está asociado fuertemente con EREA.

- **Enfermedad cutánea exacerbada por AINE (ECEA)**

El mecanismo implicado en las reacciones cutáneas desencadenadas por AAS y otros AINE, parece estar relacionado también con la inhibición de la COX-1, y del mismo modo que las reacciones respiratorias, por una sobreproducción de CisLT. Dicha teoría se ha visto reforzada al observar que los pacientes con urticaria crónica e intolerancia a AAS, tenían niveles más elevados en orina de LTE4 tras la administración de este fármaco respecto a los paciente con urticaria crónica que lo toleran [225, 226]. Se sugiere que la urticaria crónica asociada a hipersensibilidad a AINE, se podría relacionar con algún proceso autoinmune. Así, Asero observó que más del 90% de los pacientes con urticaria crónica e intolerancia a AINE, muestran pruebas cutáneas positivas con suero y plasma autólogos [227].

- **Urticaria/angioedema inducida por AINE**

En este tipo de reacciones a múltiples AINE, el mecanismo implicado parece ser desconocido. Sin embargo, debido a que son pacientes que reaccionan con diferentes fármacos con un mecanismo común desde el punto de vista farmacológico, la inhibición de la COX-1 podría ser también la responsable de la patogénesis en este tipo de reacciones [228]. Se ha sugerido que la hipersensibilidad a AINE podría preceder al desarrollo de una urticaria crónica [229] en algunos casos, aunque hay pocos datos que puedan apoyar esta hipótesis.

Del mismo modo que en la EREA, se han descrito varios polimorfismos de genes generalmente relacionados con el metabolismo del ácido araquidónico asociados con un mayor riesgo de desarrollar una urticaria aguda con múltiples AINE [230, 231].

- **Reacciones inmediatas selectivas a AINE**

En este tipo de hipersensibilidad, los pacientes presentan urticaria, angioedema y/o anafilaxia inducida por un AINE específico o varios relacionados estructuralmente, con buena tolerancia a otros AINE con estructura química diferente. El patrón clínico de síntomas así como el período de latencia orientan, en muchos casos, hacia un mecanismo mediado por IgE. Aunque se ha demostrado la presencia de IgE específica a pirazolonas mediante pruebas cutáneas y pruebas *in vitro* [201, 232], la detección de IgE específica en otros grupos de AINE es desconocida [212]. Entre los AINE que con mayor frecuencia van a inducir este tipo de reacciones destacan las pirazolonas, diclofenaco, paracetamol,

ibuprofeno y naproxeno. Hay que mencionar, que han sido publicados algunos casos de shock anafiláctico por celecoxib [233, 234].

- **Reacciones retardadas selectivas a AINE**

Pese a que no existe un número suficiente de estudios sistemáticos asociados a reacciones retardadas inducidas por AINE, la mayoría de los casos apuntan a un mecanismo de hipersensibilidad tipo IV [235] con una respuesta mediada por linfocitos T. Los fármacos que con mayor frecuencia se asocian con este tipo de reacciones son las pirazolonas, los ácidos arilacéticos y los ácidos propiónicos [201].

#### 1.6.4 DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE

Los métodos más utilizados en el diagnóstico de hipersensibilidad a AINE son la historia clínica, métodos *in vivo* como las pruebas cutáneas y las pruebas de exposición controlada.

##### **HISTORIA CLÍNICA**

Constituye la primera aproximación diagnóstica y continúa siendo una herramienta muy útil para el diagnóstico de reacciones de hipersensibilidad [236] al igual que en el caso de los antibióticos BL. Deben registrarse todos los síntomas presentados por el paciente y resulta muy importante la obtención de datos como la morfología y localización de las lesiones cutáneas y/o afectación de diferentes órganos, el intervalo de tiempo transcurrido entre la administración del fármaco y la aparición de la reacción, los medicamentos implicados y tolerados posteriormente al episodio, así como la vía de administración y el número de episodios presentados.

Si el paciente ha presentado dos o más episodios sugestivos de hipersensibilidad con más de dos AINE con estructura química diferente, se puede establecer el diagnóstico de idiosincrasia o intolerancia a AINE [236]. Actualmente el término apropiado es el de hipersensibilidad a AINE. En el caso de pacientes que presentan reacciones de tipo respiratorio, suele acompañarse de antecedentes previos de asma o rinosinusitis [237], con lo que se puede establecer el diagnóstico de EREA [238, 239]. Los pacientes con reacciones de tipo cutáneo (urticaria/angioedema), pueden referir antecedentes previos de urticaria

crónica idiopática que empeora tras la administración de los AINE [240], estableciendo entonces el diagnóstico de ECEA.

Cuando los pacientes presentan uno o varios episodios con un único AINE o varios del mismo grupo químico, pero se desconoce la tolerancia al inhibidor potente de la COX-1 diferente al implicado en los episodios previos, el diagnóstico no puede establecerse exclusivamente mediante la historia clínica. Si por el contrario, se conoce el patrón de tolerancia a otros AINE con diferente estructura, se puede establecer el diagnóstico de hipersensibilidad selectiva.

### **PRUEBAS CUTÁNEAS**

En el caso de las reacciones de hipersensibilidad no alérgicas, debido a que el mecanismo implicado no es inmunológico, sino consecuencia de la inhibición de la enzima COX-1 como se ha descrito previamente, las pruebas cutáneas no tendrían utilidad. Sin embargo, en aquellos casos en los que no se puede excluir mediante la historia clínica una reacción selectiva, puede resultar útil la realización de este tipo de pruebas sobre todo en el caso de sospecha de reacción por pirazonas.

En las reacciones agudas, según las recomendaciones, hay que comenzar realizando una prueba con punción o intracutánea; en el caso de que ésta sea negativa, se realizará una prueba intradérmica. Hay que tener presente que durante la realización de las pruebas cutáneas en general y de las pruebas intradérmicas en particular, pueden aparecer reacciones sistémicas. En la inmensa mayoría de los casos, este tipo de reacciones se desencadenan inmediatamente a la realización de la prueba cutánea y se controlan con la administración de tratamiento.

No existe una normativa universalmente aceptada y validada para la realización de las mismas, lo que desencadena la existencia de una amplia variabilidad en la sensibilidad y especificidad para los distintos AINE. Así, la realización de pruebas cutáneas, tanto intracutáneas como de intradermorreacción demuestran su utilidad en el diagnóstico de hipersensibilidad a AINE en pacientes con sospecha de alergia a pirazonas. Esto se ha confirmado mediante diversos estudios que ponen de manifiesto la validez de las pruebas cutáneas en el diagnóstico de hipersensibilidad a pirazonas [232, 241]. Respecto al resto de los AINE, la presencia de pruebas cutáneas positivas se ha demostrado en casos aislados

o en pequeños grupos de pacientes, y no existen extensos estudios que demuestren su validez [242, 212, 243].

Parece que la sensibilidad de las pruebas cutáneas a pirazolonas disminuye con el tiempo [244, 245, 246], por tanto, la realización de las pruebas lo antes posible tras la aparición y posterior resolución de la misma, contribuye a mejorar la sensibilidad.

En las reacciones retardadas, hay que tener en cuenta que las pruebas intradérmicas requieren lecturas posteriores de la respuesta cutánea a las 24, 48 y 72 horas. Las pruebas epicutáneas o del parche con el fármaco implicado, constituyen un buen método de diagnóstico en las reacciones retardadas por su sencillez y seguridad. El mayor inconveniente es que estas pruebas no están suficientemente estandarizadas, presentando una sensibilidad y especificidad variable [247, 248]. Las pruebas epicutáneas son especialmente útiles en el estudio de la dermatitis de contacto, pudiendo encontrarse resultados positivos en los casos de exantemas maculopapulares, en la pustulosis exantemática aguda generalizada y en los exantemas fijos.

### **PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA (PEC)**

Como ya se ha descrito previamente para los antibióticos BL, se consideran el patrón de referencia para el diagnóstico de las reacciones alérgicas a fármacos. Debido a la importancia que tiene la realización de estas pruebas, sus indicaciones han sido bien establecidas por el grupo ENDA [173] y serían: confirmar o excluir el diagnóstico de alergia en aquellos pacientes en los que no existan otras pruebas alergológicas disponibles o concluyentes, y proporcionar una alternativa terapéutica segura en aquellos casos en los que se ha confirmado una reacción alérgica a fármacos. Sin embargo, pese a la existencia de estas indicaciones, la controversia mantenida acerca de la realización de las PEC es muy grande. Algunos autores, se muestran a favor de la realización de la prueba y otros consideran que existe un elevado riesgo de desencadenar reacciones graves de tipo anafiláctico, y por ello, no la recomiendan. Por tanto, lo que sí resulta evidente, es la evaluación detallada y minuciosa de cada paciente antes de la realización de una PEC [193].

En cualquier caso, las pruebas de exposición controlada deben ser realizadas siempre bajo estrictas normas de seguridad, debido al elevado riesgo que pueden desencadenar, como reacciones asmáticas graves e incluso reacciones anafilácticas. Por ello, deben ser realizadas por médicos con una elevada experiencia y en centro hospitalario con todos los

medios y recursos disponibles para una rápida y segura actuación ante cualquier posible complicación que pudiese surgir.

Dependiendo de la vía de administración del AINE podemos hablar de PEC nasal, bronquial y oral. Hay que tener en cuenta que no existe un protocolo aceptado de forma unánime para la realización de las mismas.

### **PRUEBAS *IN VITRO***

Se han propuesto varias pruebas *in vitro* para el diagnóstico de las reacciones agudas a AINE, pero ninguna de ellas con un valor diagnóstico validado a día de hoy. No hay estudios publicados suficientes y los que existen, están realizados en pequeñas series de pacientes, que permitan demostrar la utilidad de estas pruebas para el diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad a AINE. Actualmente, no son pruebas útiles para el diagnóstico de rutina de las reacciones no mediadas por mecanismos inmunológicos específicos y quedan restringidas para las selectivas agudas. Entre ellas se encuentran las siguientes: liberación de sulfidoleutrienos, test de activación de basófilos, determinación de anticuerpos IgE en suero y test de transformación linfocitaria.

### ***1.7 POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A FÁRMACOS***

Las reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos son consideradas procesos multifactoriales que dependen de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales [249]. Factores ambientales como edad, sexo, ingesta de alcohol, alteraciones preexistentes e infecciones virales son determinantes relevantes en el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos. Además de estos factores, la susceptibilidad genética es un probable determinante en la gravedad y en el patrón de las manifestaciones clínicas en estas reacciones [250]. Sin embargo, los factores genéticos subyacentes al riesgo de desarrollar reacciones de hipersensibilidad a fármacos, todavía no se conocen bien. En los últimos años se han identificado numerosos genes relacionados con reacciones de hipersensibilidad a fármacos. Los estudios de polimorfismos en dichos genes han intentado determinar su influencia en el desarrollo de la alergia a fármacos.

Los factores genéticos implicados en mecanismos mediados por IgE, han sido estudiados principalmente en la hipersensibilidad a BL y dichos mecanismos, aparecen relacionados con polimorfismos en genes del antígeno leucocitario humano (*HLA A2* y *HLA DRB3*) [251], en genes de citocinas (*IL4*, *IL13*, *IL4RA*, *IL10*, *TNFA*, *IFNG* e *IL18*) [261, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 273, 289, 269, 270, 271, 274, 284, 288], en el gen del receptor de alta afinidad para IgE (*FcεR1beta*) [252] y en los genes *NOD1* y *NOD2*, sugiriendo su vinculación con los mecanismos que subyacen en el proceso inflamatorio y/o en la atopia [253]. Las reacciones de hipersensibilidad tardías mediadas por células T también han sido asociadas en la bibliografía con variantes de genes *HLA* [251, 254].

Estudios farmacogenéticos relacionados con reacciones de hipersensibilidad a AINE, y en concreto, con hipersensibilidad a la aspirina, ponen de manifiesto la identificación de distintos predictores, como genotipos *HLA* [255, 256], un polimorfismo en el promotor del gen que codifica *FcεR1* [257, 258], variantes en genes que codifican enzimas de la vía del ácido araquidónico [259, 260] y polimorfismos de genes de citocinas (*TGFβ1*, *TNFα*, *IL10* e *IL4*) [314, 315, 330, 318, 332, 333, 319].

En este trabajo, nos centraremos en posibles variantes génicas en determinados genes que codifican citocinas y que podrían estar relacionadas con reacciones de hipersensibilidad a antibióticos beta-lactámicos y a antiinflamatorios no esteroideos.

### 1.7.1 POLIMORFISMOS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A BL

Como se ha comentado previamente, la alergia a fármacos en general, y las reacciones de hipersensibilidad a penicilinas en particular, constituyen una afección multifactorial, cuya gravedad depende de factores genéticos y factores ambientales. Se ha postulado que la interacción entre factores ambientales y genes específicos durante la exposición al medio ambiente en la vida temprana, contribuye al posterior desarrollo de la alergia. En numerosos estudios, algunos loci y genes candidatos han sido asociados de una forma indirecta con reacciones de hipersensibilidad a penicilinas, incluyendo *FcεR1β*, *IL4RA*, *IL4*, *IL5*, *IL13*, *IL10* y *TNFA*. No obstante, los genes candidatos asociados a reacciones alérgicas a penicilinas y el significado de las variaciones genéticas en estos genes continúan siendo procesos en gran parte desconocidos.

En la búsqueda de estos genes candidatos resultan particularmente atractivos los genes que codifican citocinas por su implicación en la respuesta inflamatoria asociada a las reacciones de hipersensibilidad a BL.

El balance Th1/Th2 desempeña un importantísimo papel en los fenómenos de alergia inducidos por BL, en particular, en la prevalencia de respuestas Th2, y por tanto la síntesis de citocinas producidas por células Th2 en reacciones de hipersensibilidad inmediata y en las respuestas Th1, con la síntesis de citocinas secretadas por células Th1 en reacciones de hipersensibilidad tardía. El mayor número de trabajos publicados, se centran en reacciones de hipersensibilidad inmediata y por tanto la búsqueda de genes que codifican citocinas, se dirige a aquellas que participan en la síntesis de IgE, asociado al cambio de isotipo a IgE por las células B.

El cromosoma 5 contiene numerosos genes candidatos que desempeñan un papel potencialmente importante en el proceso inflamatorio, cuyos productos están asociados con reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL, como IL-4, IL-13, IL-3, IL-5 e IL-4R. En particular, se ha propuesto *IL4* como un buen gen candidato por su papel básico en la producción de IgE y en la inducción de la inflamación. Marsh y cols. [261] han sugerido que *IL4* y genes próximos en el cromosoma 5 regulan la producción de IgE mediante la activación de células Th2. Un polimorfismo en la región promotora, -589 C>T del gen *IL4*, ha sido asociado con niveles elevados de IgE total en suero en un estudio llevado a cabo por Rossenwasser y cols. [262]. Otro candidato ideal de susceptibilidad en la enfermedad alérgica y atopia, es el gen que codifica la subunidad alfa del receptor de *IL4* (*IL4RA*), por su papel en la transmisión de señales de IL-4 e IL-13 y por su función clave en la producción de IgE y el desarrollo de las células Th2. Una sustitución de un aminoácido en IL-4R $\alpha$  (glutamina $\rightarrow$ arginina) en la posición 576 de la proteína, se encontró que está asociado con atopia [263].

El grupo de Qiao y cols. [264], llevaron a cabo un estudio para evaluar el posible papel de polimorfismos de *IL4* y de *IL4RA* modulando la respuesta alérgica a penicilinas. Encontraron una asociación del polimorfismo Q576R del gen de *IL4RA* con reacciones alérgicas a penicilinas, en concreto del alelo que codifica Glutamina en posición 576 (Q576) de *IL4RA* y a su vez este alelo se relaciona con la expresión de IgE específica frente a penicilinas. Sin embargo, este grupo no puede confirmar la asociación del polimorfismo -589 C>T de *IL4* con la alergia a penicilinas.

En un estudio dirigido por Huang y cols. [265], también confirmaron la asociación del polimorfismo Gln576Arg del gen de *IL4RA* con la alergia a penicilinas y asociaron otro SNP (Ile75Val A>G) de *IL4RA* que implica un cambio de aminoácido (isoleucina→valina) con síntomas de urticaria. El análisis de haplotipos del gen que codifica IL-4R $\alpha$  (posiciones Q576/I75) mostró asociación con reacciones alérgicas a penicilinas.

Kerdine y cols. [266], han sugerido que la diferenciación a Th1 o Th2 en la respuesta inmune a penicilinas podría ser impulsada por la cinética y los niveles de IL-4 en mayor medida que por los niveles de IFN- $\gamma$ . En un estudio realizado por Brugnolo y cols. [267], creen que las citocinas Th2 desempeñan un papel importante en las reacciones adversas inducidas por BL, incluso en aquellas reacciones en las que las manifestaciones clínicas se producen de forma tardía y el mecanismo mediado por IgE es indemostrable.

Apter y cols. (2008) llevaron a cabo un estudio [268] basado en la hipótesis de que polimorfismos en *IL4* (rs2070874, rs734244, rs2243291, rs12186803, rs10062446, rs2299010 y rs11740584), *IL4R* (rs1805010), *IL10* (rs1800871 y rs1800872) y *LACTB* (rs1126309, rs1566660, rs2652820, rs2729835 y rs34536322), se asocian con alergia a penicilinas. Este grupo ha descrito que la hipersensibilidad inmediata a penicilinas tiene influencia genética relacionada con los polimorfismos en *IL4*. Además, han sugerido que *IL4* contribuye a la alergia a penicilinas independientemente de la contribución de otros factores como los antecedentes familiares de alergia a penicilinas o los antecedentes personales de reacciones a otros fármacos. Este grupo ha incluido el estudio de *IL10* en sus análisis. IL-10 es una citocina producida por células T reguladoras y monocitos que inhibe la producción de citocinas Th1 y Th2 y promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B. Respecto a los polimorfismos en la región promotora de *IL10* e *IL4R*, este grupo ha obtenido resultados contradictorios, sin encontrar ningún tipo de asociación significativa con reacciones alérgicas a penicilinas, frente a otros estudios previamente publicados [269, 270].

Respecto a los estudios citados con anterioridad que analizan principalmente polimorfismos en la región promotora del gen *IL10*, hay que destacar el trabajo llevado a cabo por Guglielmi y cols. [269] y el estudio dirigido por Qiao y cols. [270]. El grupo de Guglielmi y cols. [269], analizó varios SNP que han sido asociados previamente con asma, atopia o niveles elevados de IgE en suero en el contexto de reacciones inmediatas a BL: -589C>T, -34C>T del gen de *IL4*; -1512C>T, -1112C>T, Arg130Gln del gen de *IL13*; Ile75Val, Gln576Arg del gen de *IL4R $\alpha$*  [263] y -819C>T, -592C>T del gen de *IL10*. Encontraron que el

riesgo de desarrollar reacciones inmediatas a antibióticos BL está asociado de forma significativa con polimorfismos en la región promotora del gen *IL10* e *IL4RA* cuando estas reacciones, están vinculadas con atopia en mujeres.

El estudio dirigido por Qiao y cols. [270], apoya el crucial papel que desempeña IL-10 en la alergia a penicilinas y el balance Th1/Th2. Las citocinas producidas por células Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2, inhiben la secreción de citocinas Th2, mientras que las citocinas Th2, IL-4, IL5, IL-10 e IL-13 inhiben la secreción de citocinas Th1. Sin embargo, IL-10 tiene una función inhibitoria tanto a citocinas producidas por Th1 como por Th2. IL-10 dirige la reacción alérgica con el ajuste del balance Th1/Th2. Qiao y cols. realizaron un estudio de asociación entre niveles de IL-10 en suero, dos SNP en su región promotora (-1082A>G, -819C>T) y anticuerpos específicos en pacientes con alergia a penicilinas. Los resultados analizados, mostraron que los pacientes con IgE o IgG específica positiva tienen bajos niveles de IL-10, observándose una correlación inversa entre IL-10 e IgE en pacientes con alergia a penicilinas. Estos mismos resultados ya fueron informados por Makela y cols. [271], lo que aumenta el peso de los mismos. Qiao y cols. en este estudio [270] encontraron que el SNP en posición -1082 A>G en la región promotora de *IL10* está asociado con la producción de IgE específica en pacientes con alergia a penicilinas, mientras que el polimorfismo -819 C>T estaría asociado con IgG específica en la alergia a penicilinas.

En todos los trabajos revisados [269, 270, 271, 272] se sugiere la importancia de IL-10 en la prevención, diagnóstico e inmunoterapia de la alergia a penicilinas y otras enfermedades atópicas.

Otro estudio dirigido por Gueant-Rodríguez y cols. [273] evidenció que combinaciones de polimorfismos en genes de *IL13* (R130Q y -1055/-1111C>T) y de *IL4RA* (I50V, S478P y Q551R) influyen en los niveles de IgE en general y muestran una asociación con reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL. El elevado nivel de IgE detectado en los pacientes de esta población italiana, sugiere que se debería investigar más a fondo la influencia de la atopia en las reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL.

El grupo anterior dirigido por Gueant-Rodríguez, también ha llevado a cabo un estudio [274] acerca de la asociación del polimorfismo -308 G>A del gen de *TNFA* con la alergia a BL mediada por IgE. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citocina pleiotrópica que interviene en numerosos aspectos inmunológicos. Se trata de una molécula que ejerce un claro efecto proinflamatorio. Los resultados evidencian que el genotipo GG de *TNFA* en posición -308 tiene un mayor riesgo de asociación con reacciones alérgicas inmediatas a BL,

pero no identifican ninguna asociación con el nivel de IgE total. Además demostraron que el alelo A de *TNFA* -308 se asocia con una producción de IgE específica frente a BL.

Hay que tener en cuenta, que los estudios mencionados y revisados hasta el momento se centran en aquellos polimorfismos de citocinas sintetizadas por células Th2 y su asociación con reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL mediadas por IgE. En relación a una respuesta Th1 y la búsqueda de citocinas dirigidas hacia este tipo de respuesta, el IFN- $\gamma$  tiene un papel central regulador en este proceso. El IFN- $\gamma$ , es producido por linfocitos T activados y células NK, suprime directamente la síntesis de IgE e inhibe el proceso de desarrollo de células Th2. El IFN- $\gamma$  ejerce varios efectos biológicos a través de su unión en la superficie de las células al receptor 1 (IFNR1) en combinación con su vía de transmisión de señales y al IFN- $\gamma$  receptor 2 (IFNR2) [275, 276]. La unión de IFN- $\gamma$  al receptor activa una vía de transmisión de señales intracelular, la cual conduce la expresión de varios genes, incluyendo el factor 1 regulador de IFN- $\gamma$  (IRF-1).

Se ha sugerido una cierta predisposición entre los genes *IFNG*, *IFNR1*, *IFNR2* e *IRF1* y algunas entidades como el asma y la atopia [276, 277, 278, 279, 280]. Otros autores han informado de una fuerte asociación entre polimorfismos del gen del *IFNG* y del *IFNR1* y enfermedades inflamatorias como la susceptibilidad y severidad de la artritis reumatoide [281], sin embargo, Constantin y cols. [282] no lograron confirmar esta asociación y con la susceptibilidad al lupus eritematoso sistémico [283]. Parece que el *IFNG* y sus genes asociados deben ser responsables de una predisposición inherente a reacciones de hipersensibilidad a penicilinas.

Es importante mencionar un estudio [284] en el que se determinaron los niveles de IFN- $\gamma$  en el suero de pacientes chinos con alergia a penicilinas y se analizaron dos polimorfismos: una repetición CA en el primer intrón del gen *IFNG* y un SNP en el codón 14 del gen del *IFNR1* que codifica el cambio Val/Met. Encontraron que la frecuencia del alelo que codifica Met14Val en pacientes alérgicos a penicilinas es significativamente más baja que en controles, lo que apoya la teoría de que este alelo tiene un papel protector en la población no alérgica a penicilinas.

Otra citocina importante es IL-18, producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Esta citocina, a través de la activación de ciertas células T favorece la liberación de abundante IFN- $\gamma$  y participa en la inmunidad celular mediante la activación de células NK. La combinación de IL-18 e IL-12 inhiben la producción de IgE e IgG1 dependiente de IL-4 y promueven la producción de IgG2. Kruse y cols. [285] asociaron varios SNP en la región

promotora (-137G>C) y en el exón 2 (113T>G y 127C>T) del gen que codifica IL-18 con rinitis alérgica. Por otra parte, IL-18 desempeña un importante papel en asma y dermatitis atópica [286, 287]. El papel de los polimorfismos en el gen que codifica esta citocina en las reacciones alérgicas a penicilina, sigue siendo en gran parte desconocido. En el estudio llevado a cabo por Ming y cols. [288], investigaron si el gen que codifica para esta citocina sería un gen candidato en su posible asociación a reacciones de hipersensibilidad a penicilinas. Concluyeron que polimorfismos en la región promotora -607A>C y -137G>C de *IL18* mostraban una asociación con la susceptibilidad de alergia a penicilinas. En concreto el alelo A y el genotipo AA del polimorfismo -607 de *IL18* se observaron con más frecuencia en pacientes con reacciones alérgicas a penicilinas que en controles. Para el polimorfismo -137G>C, el alelo C es un elevado factor de riesgo en reacciones de hipersensibilidad a penicilina. Además niveles elevados de IL-18 en suero se han asociado con alto riesgo de reacciones alérgicas a penicilinas. Estos resultados sugieren el importante papel de IL-18 en las reacciones de hipersensibilidad a penicilinas en la población china.

Uno de los últimos estudios publicados que abordan este tema, realizado por Cornejo-García y cols. [289], destaca porque evaluaron marcadores biológicos y genéticos de atopia como factores de riesgo de reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL en población española. Se han analizado los polimorfismos de genes de *TNFA*, *IL13*, *IL4RA*, *IL4* y *LACTB*. Los datos obtenidos mostraron que marcadores de atopia, IgE total, IgE específica frente a ácaros y polimorfismos (I50V y Q551R) de *IL4RA*, fueron predictores de reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL. La influencia de la sensibilización a alérgenos ambientales frecuentes en un área geográfica determinada abre nuevas ideas en los mecanismos de hipersensibilidad a BL y podría contribuir a explicar la elevada prevalencia de alergia a BL en el sur de Europa.

Recientemente, se ha publicado un estudio [253] en el que se ha analizado la asociación de los genes de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos tipo 1 y 2 (*NOD1* y *NOD2*) con reacciones alérgicas a BL. Parece que polimorfismos en *NOD1* y *NOD2* podrían influir en la alergia a BL mediante su vinculación con vías que participan en la inflamación y/o atopia a través de mecanismos que necesitan ser aclarados.

## 1.7.2 POLIMORFISMOS Y REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE

El ácido acetil salicílico (AAS), es uno de los AINE que con mayor frecuencia causan reacciones de hipersensibilidad, y el más estudiado. La patogenia de las reacciones de hipersensibilidad no inmunológicas al AAS, implica la inhibición de la ciclooxigenasa por la aspirina u otros AINE, dando como resultado un aumento en la producción de leucotrienos (LTs), potentes mediadores inflamatorios sintetizados a partir del ácido araquidónico a través de una vía secuencial. Se reconoce claramente que la síntesis de LTs está asociada con el desarrollo y la progresión de AIA (asma inducida por aspirina o en la terminología actual EREA). La excreción urinaria de  $LTE_4$  está elevada en pacientes con hipersensibilidad a aspirina [290, 291]. Además, los fármacos que inhiben la síntesis de LTs, tienen una eficacia clínica en el asma [292, 293]. A diferencia del AIA, la información y el conocimiento del mecanismo patogénico de AIU (urticaria inducida por aspirina o en la terminología actual ECEA) resulta limitado. Aunque no hay claras evidencias de la participación de LTs en AIU y/o angioedema, se ha propuesto que los LTs deben participar en la patogénesis de urticaria y/o angioedema inducida por aspirina en un mecanismo similar al de AIA.

En los últimos años, se ha estado investigando posibles mecanismos genéticos moleculares de EREA y ECEA (AIA y AIU). Para ello, se han realizado varios estudios de asociación de casos y controles para identificar marcadores genéticos relacionados con alelos HLA [255, 256], genes que codifican enzimas clave de la vía del ácido araquidónico [259, 260] y genes que codifican citocinas y su posible asociación con EREA Y ECEA (AIA y AIU).

### **MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A EREA (AIA)**

En cuanto a polimorfismos relacionados con el antígeno leucocitario humano (*HLA*), se identificó una asociación entre el alelo \*0301 del gen *HLA-DPB1* y AIA, que fue descrita por primera vez en una población polaca [294], y los resultados fueron confirmados posteriormente en una población coreana [295]. La frecuencia de este alelo \*0301 fue significativamente elevada en pacientes con AIA comparado con sujetos normales, sugiriendo que el reconocimiento por parte del sistema inmune de un antígeno desconocido es parte de la patogénesis del AIA. En la población coreana [295] los pacientes con el alelo \*0301 del gen *HLA-DPB1* presentaban bajos niveles de FEV<sub>1</sub>, eran predominantemente mujeres y mostraban elevada prevalencia de rinosinusitis y pólipos

nasales respecto a los que carecen de este alelo. Estos son los síntomas clínicos típicos de AIA. Este grupo postula que el alelo \*0301 del gen *HLA-DPB1* es un fuerte marcador genético para la identificación del fenotipo AIA.

Otros polimorfismos muy estudiados y descritos en la bibliografía son los relacionados con genes de leucotrienos. Se ha insistido mucho en la actividad del gen de la enzima leucotrieno C4 sintasa (*LTC4S*), enzima clave en la síntesis de leucotrienos cisteinílicos (Cys-LT). Dos polimorfismos en el promotor de *LTC4S* han sido identificados (-1072G>A y -444A>C) y en el caso de -444A>C *LTC4S* se encontró una asociación con el fenotipo AIA en una población polaca [296]. Parece que los pacientes con el alelo C presentaban un mayor riesgo de desarrollar AIA. La conversión de adenina por citosina en la región promotora de este gen incrementa su velocidad de transcripción. Por el contrario, la asociación de este polimorfismo -444A>C *LTC4S* con el fenotipo AIA, no ha sido encontrado en otras poblaciones, incluyendo la japonesa, americana y coreana [297, 298, 299]. En lo referente al polimorfismo -1072G>A *LTC4S*, no ha sido asociado a ningún fenotipo de asma y no tiene ningún papel relevante en la expresión génica en una población británica según un estudio realizado por Sayers y cols. [300].

Algunos estudios han sugerido la posible participación del gen araquidónico 5-lipoxigenasa (*ALOX<sub>5</sub>*). El grupo de Drazen fue el primero en identificar un polimorfismo en la región promotora que consiste en un número variable de repeticiones en tándem GC y se localiza en la zona de unión de un factor de transcripción Sp1 [301]. Sujetos con el genotipo normal (5 repeticiones), tienen una mayor capacidad de producir Cys-LT comparados con aquellos con el genotipo mutante (3, 4 o 6 repeticiones). Además, en una población coreana se detectó una asociación significativa entre este polimorfismo de la región promotora de *ALOX<sub>5</sub>* y la gravedad de la hiperactividad de las vías respiratorias [302]. Destaca un estudio realizado por el grupo de Kim, en el que se examinaron 10 SNP en genes codificantes de enzimas claves del metabolismo del ácido araquidónico en una población coreana [224], araquidónico 5-lipoxigenasa (-1708G>A, 21C>T, 270G>A, 1728G>A *ALOX<sub>5</sub>*), proteína activadora-*ALOX<sub>5</sub>* (218A>G *ALOX<sub>5</sub>AP*), ciclooxigenasa 2 (-162C>G, 10T>G, 228G>A *COX-2*), leucotrieno C4 sintasa (-444A>C *LTC4S*) y el receptor 1 cisteinil leucotrieno (927T>C *CYSLTR1*). No se detectó asociación entre los polimorfismos de los genes de *ALOX<sub>5</sub>AP*, *COX-2* y *CYSLTR1* y el fenotipo AIA. Se sugiere, sin embargo, una posible participación del haplotipo [G-C-G-A] del gen *ALOX<sub>5</sub>* (-1708G>A, 21C>T, 270G>A, 1728G>A) en el desarrollo de AIA, porque la frecuencia de este haplotipo fue significativamente más elevada en el

grupo de asmáticos intolerantes a la aspirina que en pacientes asmáticos tolerantes a la aspirina (ATA) [299].

Los Cys-LT ejercen sus acciones biológicas por la unión a dos tipos de receptores: CYSLTR1 y CYSLTR2. Algunos estudios [303, 304] encontraron asociaciones genéticas entre estos dos genes y AIA. Tres SNP (-634C>T, -475A>C,-336A>G) en la región localizada en sentido 5' del gen *CYSLTR1* fueron asociados significativamente con el fenotipo AIA, especialmente en varones. Además estos polimorfismos fueron asociados con un incremento de la actividad promotora, sugiriendo que modulan la expresión de CYSLTR1 para incrementar la susceptibilidad a AIA. Estos resultados sugieren que *CYSLTR1* y *ALOX<sub>5</sub>*, pero no *LTC4S*, podrían ser marcadores de susceptibilidad a AIA, basándose sobre todo en población coreana. Aunque se necesita realizar más estudios básicos para encontrar los genes clave relacionados con leucotrienos e implicados en la patogénesis de AIA.

En un estudio de casos y controles en una población japonesa [305], se encontró un SNP del gen del receptor PGE2 subtipo 2 (*EP2*) asociado con riesgo de AIA. Este SNP podría actuar reduciendo PGE2, como mecanismo de control de la inflamación.

TBXA2R es el receptor de un potente broncoconstrictor, el tromboxano A2 (TBXA2). En un estudio realizado en población coreana [306], se identificó un polimorfismo 795T>C en el gen del *TBXA2R*, que podría aumentar la respuesta broncoconstrictora tras la administración oral de aspirina, contribuyendo al desarrollo de AIA.

Otro posible gen candidato en esta búsqueda, es el que codifica la cadena beta del receptor de alta afinidad para IgE (*FcεR1β*) en el que se han estudiado dos polimorfismos (-109T>C y E237G). El grupo de Kim y cols. [224], no encontró asociación entre estos polimorfismos y el fenotipo de AIA. Sin embargo, se identificó una asociación significativa entre el polimorfismo -109T>C y los niveles de IgE específica a la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) [307]. El número de sujetos de alelo T en posición -109 de *FcεR1β* en homocigosis y niveles de IgE específica a SEB fue significativamente superior en el grupo AIA, sugiriendo que dicho alelo incrementaría la expresión de *FcεR1β* en células mastocitarias. Esto podría promover la liberación de mediadores proinflamatorios en la vía respiratoria asmática y así incrementar la susceptibilidad a AIA.

El *TBX<sub>21</sub>* codifica T-bet, un factor de transcripción expresado en células T, que influye en el desarrollo de linfocitos T naive y está implicado en la patogénesis del asma. En un estudio realizado en población japonesa [308], identificaron un SNP -1993T>C en la región

promotora del gen *TBX21*, y encontraron una asociación de dicho polimorfismo con un aumento del riesgo de AIA, debido a un incremento de la actividad transcripcional.

En cuanto a los polimorfismos relacionados con genes que codifican citocinas, la búsqueda de marcadores genéticos y su posible asociación con AIA, se ha centrado principalmente en *TGFβ1*, *IL10*, *TNFA* e *IL4*. Debemos recordar que el asma inducida por aspirina es un síndrome clínico caracterizado por rinitis eosinofílica, poliposis nasal (en la mayoría de los casos), hipersensibilidad a la aspirina y asma. Estudios recientes [309, 310] han examinado el papel del factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) en rinosinusitis crónica y han demostrado un incremento de transcripción de TGF-β1 en pólipos nasales de pacientes con rinitis crónica. En un estudio previo [311] se demostró que el grado de inflamación eosinofílica del pólipo nasal está relacionado con el nivel de TGF-β1. Varios polimorfismos en el gen de *TGFβ1* han sido asociados con el fenotipo asmático [312, 313], sin embargo, no hay muchos datos publicados de polimorfismos de *TGFβ1* en AIA. El grupo de Kim y cols., fue el primero que investigó el efecto del polimorfismo -509C>T del gen *TGFβ1* en AIA y analizó el posible papel de dicho polimorfismo en la asociación entre AIA y rinosinusitis en una población coreana [314]. Concluyeron que el polimorfismo -509C>T en la región promotora del gen de *TGFβ1* no se asocia con el fenotipo de AIA. Sin embargo, este polimorfismo debe contribuir al desarrollo de AIA con rinosinusitis. Se piensa que el papel de TGF-β1 en la rinosinusitis crónica es debido a que se localiza y es compartimentalizado dentro de la mucosa nasal de pacientes AIA con rinosinusitis.

Posteriormente otro estudio dirigido por esta misma autora Kim SH. (2009), analizó una asociación genética de polimorfismos en la región promotora (-1082A>G, -819T>C y -592A>C) de *IL10* e investigó una interacción gen-gen entre polimorfismos de genes que codifican IL-10 y TGF-β1 en pacientes coreanos con AIA y rinosinusitis [315]. La función reguladora del factor de crecimiento transformante (TGF-β1) debe estar interrelacionada con IL-10 [316], sugiriendo que IL-10 es necesaria para facilitar la producción de TGF-β como factor secundario. La interacción gen-gen entre polimorfismos de *TGFβ1* e *IL10* ha sido implicada en alergia y en asma [317]. Los resultados de este grupo [315], han indicado que alteraciones en la producción de IL-10 causadas por el polimorfismo -1082A>G, han contribuido al desarrollo de AIA con rinosinusitis, y que este efecto estaría fortalecido por la interacción génica entre los polimorfismos -1082A>G de *IL10* y -509C>T de *TGFβ1*.

Otro gen candidato con el que se ha especulado, es el que codifica TNF-α, ya que es una citocina proinflamatoria y se piensa que podría incrementar sus niveles en las vías

respiratorias de pacientes asmáticos. De nuevo el grupo dirigido por Kim SH, (2006), examinó la interacción génica entre *TNFA* y el alelo \*0301 de *HLA* BPB1, por su cercana localización en el cromosoma 6, como un fuerte marcador genético de AIA [318]. Concluyeron que el polimorfismo -1031T>C (o -863C>A o -857C>A) en la región promotora de *TNFA*, podría incrementar significativamente la susceptibilidad a AIA por la interacción génica con el alelo \*0301 de *HLA* DPB1.

En el 2010, Kim y cols., realizaron un estudio [319] en el que examinaron la influencia de varios SNP en el gen de *IL4* en asmáticos con hipersensibilidad a la aspirina. La aspirina regula la expresión de IL-4 por alteración de la disponibilidad de factores de transcripción, como elementos reguladores clave en la región promotora del gen de *IL4*, dando lugar a la hipersensibilidad a la aspirina.

### **MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS A ECEA (AIU)**

Se ha demostrado una asociación entre genotipos *HLA* y AIU usando técnicas de alta resolución y mediante el estudio de Kim y Park [224], se ha confirmado una asociación positiva entre alelos \*1302 de *HLA* DRB1 y \*0609 de *HLA* DQB1 en pacientes con AIU. En otros trabajos [320] se obtienen los mismos resultados, al concluir que las frecuencias alélicas de *HLA* DRB1 y *HLA* DQB1 en pacientes con AIU fueron significativamente más elevadas que en controles sanos, sugiriendo que los alelos\*1302 de *HLA* DRB1 y \*0609 de *HLA* DQB1 son un fuerte determinante genético del fenotipo AIU.

Como se ha citado previamente, no hay evidencias claras de la participación de Cys-LT en AIU, y se ha propuesto que los Cys-LT participen en la patogénesis de urticaria y angioedema inducida por aspirina, por un mecanismo similar al de AIA. Mastalerz y cols. [321], demostraron la sobreproducción de Cys-LT en asociación con un polimorfismo en el gen *LTC4S* en pacientes con urticaria crónica con hipersensibilidad a la aspirina. Encontraron que la frecuencia de sujetos con el alelo C del polimorfismo -444A>C de *LTC4* fue significativamente más elevada en pacientes con AIU. Sin embargo, esta asociación no fue encontrada en otras poblaciones como la española [322] o la coreana [323]. Son muchos los estudios, principalmente en poblaciones asiáticas [323] que investigan polimorfismos de genes candidatos que codifican enzimas involucradas en la síntesis de leucotrienos, y su posible asociación con AIU, al igual que para AIA.

Debido a que los síntomas clínicos de las reacciones de hipersensibilidad inducidas por AINE en general, y aspirina en particular dependen de la liberación de histamina y sus mediadores, en los últimos años se ha puesto de manifiesto una asociación entre polimorfismos de enzimas del metabolismo de la histamina y reacciones de hipersensibilidad inducidas por aspirina como el fenotipo AIU. Destaca un trabajo de Choi y cols. [258], en el que se analizaron 11 SNP de la cadena  $\beta$  del receptor I de alta afinidad para IgE (*FcεRIβ*), histamina N-metil transferasa (*HNMT*), receptor tipo 1 de histamina (*HRH1*), receptor tipo 2 de histamina (*HRH2*), y sus haplotipos en pacientes con AIU. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas o haplotípicas de los SNP de *FcεRIβ*, *HNMT*, *HRH1* ni *HRH2* entre pacientes con AIU, sujetos con urticaria crónica tolerantes a la aspirina y sujetos control. Estos resultados sugieren que polimorfismos de *FcεRIβ* y de genes relacionados con histamina no contribuyen al desarrollo de AIAU (urticaria aguda inducida por aspirina) en población coreana. El grupo de Bae y cols. identificó dos polimorfismos (-344C>T, -95T>C) del gen de *FcεRIα* en pacientes con urticaria crónica inducida por aspirina [324]. De los dos polimorfismos, los pacientes con AICU (urticaria crónica inducida por aspirina) tienen elevadas frecuencias del alelo -344T de *FcεRIα* respecto al grupo ATCU (tolerantes a la aspirina) y al grupo control. Este grupo sugiere que el polimorfismo -344C>T *FcεRIα* contribuye al desarrollo de AICU por incremento de la actividad del promotor.

Como se ha descrito previamente el mecanismo de la urticaria crónica inducido por aspirina no es del todo conocido, lo que sí parece claro es que las células mastocitarias cutáneas desempeñan un papel central en este proceso. La aspirina y otros AINE tienen la capacidad de activar estas células, pero el mecanismo por el que esto ocurre es confuso. La homeostasis de las células mastocitarias es controlada por anticuerpos IgE y citocinas como IL-3, IL-4, IL-10 y el TGFβ1. Por ello, en los últimos años la búsqueda de genes candidatos, también se ha centrado en aquellos que codifican citocinas y su posible asociación con el fenotipo de urticaria y/o angioedema inducido por aspirina. La expresión de TGFβ1 puede verse influida por polimorfismos en el gen que codifica TGFβ1, algunos de ellos ya han sido asociados con asma [325, 326, 327], con rinosinusitis y AIA [314] y otras enfermedades como cáncer [328] y aterosclerosis [329]. Sin embargo, no hay tantos datos publicados de la posible asociación entre polimorfismos en *TGFβ1* y el fenotipo de AICU. Citaremos un estudio de Park y cols. [330] que evaluó la posible asociación entre polimorfismos en la región promotora de *TGFβ1* y el fenotipo de AICU, comparado con el fenotipo de ATCU en una población coreana. Los resultados indicaron que el polimorfismo -509T>C *TGFβ1* puede

afectar a la actividad de TGF- $\beta$ 1, incrementando la capacidad de liberación de las células mastocitarias y permitiendo el desarrollo del fenotipo AICU.

Algunos estudios de asociación, evidencian que la IL-10 podría estar relacionada con lesiones cutáneas y que el genotipo TT -819T>C del gen que codifica dicha citocina está asociado con bajos niveles de IL-10 [331]. El haplotipo de *IL10* (-1082A, -819T y -592A), ha sido identificado como un factor de riesgo en asma atópica [332]. Los niveles bajos de IL-10, están implicados en fenotipos inhibidores de la ciclooxigenasa-1 como AIU. Salhi y cols. [331], confirmaron que -819 CT/TT de *IL10* está asociado con baja producción de IL-10 y que el genotipo -819TT debe facilitar la degranulación de las células mastocitarias y posterior liberación de histamina, agravando el fenotipo de AIU. Posteriormente, Palikhe y cols. [333] investigaron varios SNP de *IL10* en pacientes con urticaria inducida por aspirina. Este grupo identificó una asociación entre el alelo T -819T>C del gen *IL10* y AIU, sugiriendo que este alelo modula el riesgo y contribuye al desarrollo del fenotipo AIU, incluyendo urticaria crónica y aguda y apoyando los resultados obtenidos en estudios previos [331, 332].

Recientemente, un estudio aislado realizado por el grupo de Kim en población coreana [334], investigó la contribución de IL-18 en la patogénesis de AIU. Esta citocina puede amplificar la inflamación aguda al promover la activación de las células mastocitarias, la migración de neutrófilos y la producción de otras citocinas. Encontraron una asociación significativa entre urticaria aguda inducida por aspirina y el polimorfismo -607A>C en la región promotora de *IL18*. Pacientes con AIAU mostraron elevadas frecuencias del haplotipo C (-607A>C) G (-137G>C) del gen de *IL18*, que contribuye al desarrollo de la inflamación aguda cutánea sensible a la aspirina, conduciendo a la presentación clínica de AIAU.

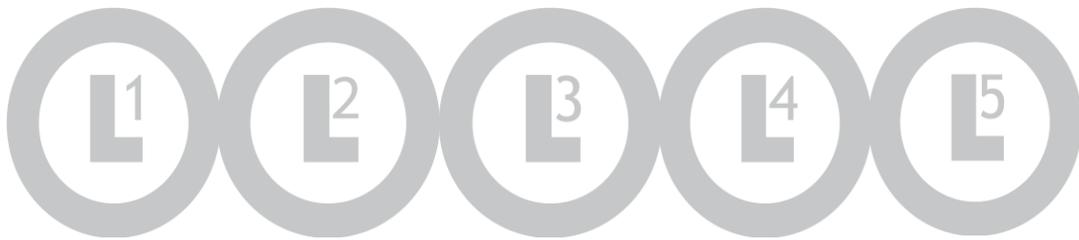




UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# HIPÓTESIS DE TRABAJO

---





## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Las reacciones de hipersensibilidad inducidas por fármacos son consideradas procesos multifactoriales de herencia compleja que dependen de la interacción entre factores genéticos y ambientales. La susceptibilidad genética es un probable determinante en la gravedad y en el patrón de las manifestaciones clínicas en estas reacciones. Por ello, en los últimos años se han identificado numerosos genes relacionados con reacciones de hipersensibilidad a fármacos. Los estudios de polimorfismos en dichos genes han intentado determinar su influencia en el desarrollo de las reacciones alérgicas y no alérgicas a fármacos.

Los factores genéticos implicados en mecanismos inmunológicos o alérgicos, han sido estudiados principalmente en beta-lactámicos y aquellos relacionados con mecanismos no inmunológicos o no alérgicos se han centrado en antiinflamatorios no esteroideos.

Nuestra principal hipótesis de trabajo es que la presencia de ciertas variantes génicas, principalmente en determinados genes que codifican citocinas podría estar relacionada con la hipersensibilidad a antibióticos BL y a AINE.

La hipótesis secundaria se basa en que la influencia de los factores genéticos en el desarrollo de la hipersensibilidad a beta-lactámicos y a antiinflamatorios no esteroideos puede presentar un carácter diferencial que podría estar relacionado con los distintos mecanismos implicados en cada caso.



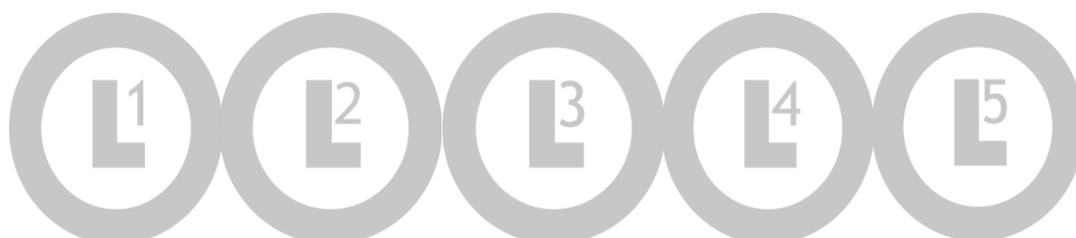


UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# OBJETIVOS

---





### **3. OBJETIVOS**

- 1) Caracterizar 22 polimorfismos de 13 genes que codifican distintas citocinas (IL-1A, IL-1B, IL-1R, IL-RA, IL-2, IL-4, IL-4RA, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-G, TGF-B1, TNF-A) en una muestra de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a beta-lactámicos y a antiinflamatorios no esteroideos, así como en una muestra control representativa de la población para cada grupo.
- 2) Analizar dichos polimorfismos individualmente con la finalidad de evaluar las posibles asociaciones de los mismos con las reacciones de hipersensibilidad a ambos grupos de fármacos.
- 3) Determinar la presencia de posibles interacciones génicas, así como de haplotipos y diplotipos en el caso de polimorfismos localizados en el mismo gen o cromosoma, con el fin de identificar variantes génicas que pudieran influir en el patrón de las manifestaciones clínicas de las reacciones de hipersensibilidad a BL y AINE.
- 4) Identificación de posibles marcadores génicos que fueran capaces de permitir la caracterización de los pacientes analizados, lo que podría, en un futuro, predecir el riesgo de desarrollar hipersensibilidad a este grupo de fármacos e incluso mejorar el manejo clínico de dichos pacientes.
- 5) Relacionar las asociaciones génicas con los posibles mecanismos diferenciales que subyacen en las reacciones de hipersensibilidad a ambos tipos de fármacos; reacciones mediadas por mecanismos específicos inmunológicos o alérgicos en el caso de los BL y reacciones no inmunológicas o no alérgicas secundarias a una alteración en el metabolismo del ácido araquidónico que son las más frecuentes en el grupo de los AINE.



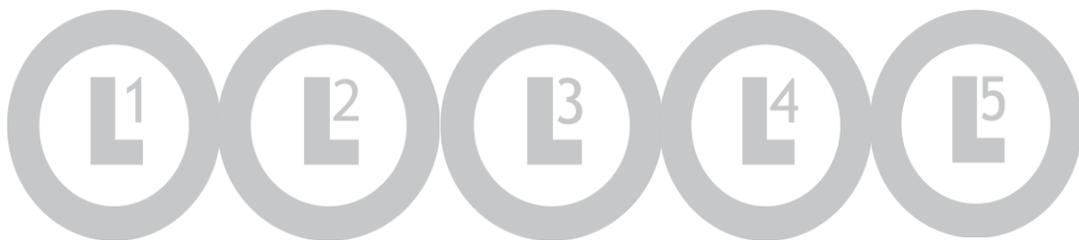


VNIVERSIDAD  
B SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# MATERIA Y MÉTODOS

---





## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GÉNICA

En este estudio se han incluido un total de 443 individuos no relacionados que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Todos los individuos fueron examinados por un Facultativo Especialista del Servicio de Inmunoalergia, valorando en cada uno de ellos una serie de variables que se incluyeron en el estudio y que se irán describiendo a continuación.

#### **DATOS DE FILIACIÓN**

Se recogieron los datos de filiación de todos individuos, dichos datos solamente se emplearon en la identificación inicial del paciente, ya que durante todo el estudio y el análisis, se respetó el anonimato del paciente. Se han registrado otros datos como la edad, el sexo, la fecha de nacimiento, así como la fecha de asistencia a consulta.

#### **DATOS CLÍNICOS Y ANÁLITICOS**

##### *PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE ALERGIA A BETA-LACTÁMICOS*

El estudio diagnóstico se realizó de forma secuencial en dos fases (Figura 6), que se completó en los pacientes que fueron presentando un resultado negativo en las distintas pruebas. La positividad de cualquiera de las pruebas, se consideró diagnóstica de hipersensibilidad [147, 39].

## 1. ESTUDIO INICIAL O FASE I

El estudio comenzó con la realización de pruebas cutáneas mediante intraepidermorreacción (*prick*); si el resultado fue negativo, se continuó con la intradermorreacción. En ambos casos se utilizaron los mismos reactivos. Las pruebas con parches se realizaron cuando se sospechó un mecanismo de hipersensibilidad retardada y en todos los casos en los que se obtuvo un resultado positivo tardío se llevó a cabo una intradermorreacción con los mismos preparados, con lectura inmediata, a las 6 y a las 48 horas. Finalmente, en los pacientes que presentaron un resultado negativo en las pruebas cutáneas, se realizó la prueba de exposición controlada.

### ➤ REACTIVOS EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS INTRAEPIDÉRMICAS E INTRADÉRMICAS

A todos los sujetos incluidos en el estudio, se les realizaron pruebas cutáneas con los siguientes reactivos:

- **Bencilpeniciloil polilisina o PPL.** ( $5 \times 10^{-5}$  M). DAP® penicilina, Diater Laboratorios, Madrid, España.
- **DM.** Mezcla que contiene bencilpeniloato sódico (0,5 mg/ml). DAP® penicilina, Diater Laboratorios, Madrid, España.
- **Bencilpenicilina** (10.000 UI/ml) preparada, en el momento de la realización de las pruebas cutáneas, a partir de Nuvapen®, CEPA, Madrid, España.
- **Amoxicilina** a una concentración de 20 mg/ml obtenida a partir de Clamoxyl® 1 g en solución inyectable, Beecham, Toledo, España.
- **Amoxicilina-clavulánico** (20 mg/ml). **Amoxicilina-clavulánico** (5% en agua). Amoxicilina-clavulánico EFG, (Sandoz Farmacéutica S.A, España).
- **Cefuroxima** 750 mg (2 mg/ml). Cefuroxima EFG, (Laboratorio Reig Jofré, Barcelona, España).
- **Meropenem 1 g EFG** (1 mg/ml) (FREXENIUS KABI ESPAÑA, S.A.U, España).

Para los pacientes con reacciones a cefalosporinas distintas de la cefuroxima, se utilizó el antibiótico implicado en cada caso [143], a una concentración de 2 mg/ml. Para otros antibióticos BL distintos, las concentraciones utilizadas en estos casos fueron las referidas en la bibliografía especializada o si no se disponía de este dato, se realizaron utilizando cinco pacientes no alérgicos como control, en los que debían de ser negativas.

Como control positivo se utilizó **fosfato de histamina** (ALK-Abelló, Madrid, España) a las siguientes concentraciones:

- 10 mg/ml en la intraepidermorreacción
- 0,1 mg/ml en la intradermorreacción

Como control negativo se usó **solución salina fisiológica 0,9%** (Braun, Barcelona, España).

### ➤ PRUEBAS CUTÁNEAS INTRAEPIDÉRMICAS

Inicialmente las pruebas cutáneas se realizaron mediante la técnica de intraepidermorreacción. Todos los reactivos se colocaron simultáneamente en la cara volar del antebrazo con una separación mínima entre ellos de 3 cm [335]. Para llevar a cabo las distintas intraepidermorreacciones se utilizaron lancetas de tipo Morrow-Brown (Allergy pricker, Dome/Hollister-Stier, Miles Ltd, UK), empleando una lanceta para cada prueba.

Las lecturas de las pruebas intraepidérmicas se realizaron a los 15 minutos. Se consideró positiva la prueba que daba lugar a una pápula mayor o igual a 3 mm, con el control de salino negativo. La positividad producida por uno o más de los antígenos fue considerada diagnóstica, finalizándose el estudio en este punto. En caso de negatividad, se procedió a la realización de pruebas intradérmicas.

### ➤ PRUEBAS CUTÁNEAS INTRADÉRMICAS

Como ya se ha indicado, las pruebas cutáneas intradérmicas se realizaron en todos los pacientes que mostraron un resultado negativo en las pruebas intraepidérmicas.

Para ello, se emplearon los distintos antígenos mediante la inyección de un volumen de 0,02 ml de cada uno de los reactivos en la superficie volar del antebrazo, con una separación entre ellos de 5 cm. La lectura se realizó a los 20 minutos. El tamaño de cada

reacción se midió con una regla milimetrada. Se registraron los diámetros mayores y su ortogonal de la pápula, y del eritema alrededor de la misma. El diámetro considerado es el resultante de la media de los dos medidos. La intradermorreacción fue definida como positiva si se producía un aumento de la pápula inicial >3 mm con eritema circundante o si tenía pseudópodos (siempre con eritema) [143, 335].

La positividad con cualquiera de los determinantes fue considerada, al igual que en las intraepidérmicas, diagnóstica de hipersensibilidad a antibióticos BL.

### ➤ PRUEBAS CUTÁNEAS EN PARCHE

En las reacciones que sugerían un mecanismo de hipersensibilidad retardada o de tipo IV; además de las pruebas cutáneas intradérmicas con lectura tardía (6 horas y 48 horas), se realizaron pruebas epicutáneas con parches cerrados y lectura a las 48-96 horas [144].

Los reactivos, concentraciones y vehículos utilizados fueron los siguientes:

- **Bencilpeniciloil polilisina o PPL.** ( $5 \times 10^{-5}$  M). DAP® penicilina, Diater Laboratorios, Madrid, España.
- **DM.** Mezcla que contiene bencilpeniloato sódico (0,5 mg/ml). DAP® penicilina, Diater Laboratorios, Madrid, España.
- **Bencilpenicilina** (1% en vaselina) preparada a partir de Nuvapen® (CEPA, Madrid, España).
- **Amoxicilina** (5 % en agua). Clamoxyl®, (Beecham, Toledo, España) en agua.
- **Amoxicilina-clavulánico** (5% en agua). Amoxicilina-clavulánico EFG, (Sandoz Farmacéutica S.A, España).
- **Cefuroxima** (5% en agua). Cefuroxima EFG, (Laboratorio Reig Jofré, Barcelona, España).

Para otros antibióticos BL las concentraciones utilizadas fueron las referidas en la bibliografía especializada o si no se disponía de este dato, fueron realizadas a

concentraciones del 1% y 5% en agua, utilizando además 5 controles, en los que debían de ser negativas.

Los parches se retiraron a las 48 horas realizándose en este momento la primera lectura que se repitió a las 96 horas. Como criterio de positividad se consideró una prueba de 2+ (eritema, edema).

### ➤ PRUEBAS DE EXPOSICIÓN CONTROLADA

Se realizaron en aquellos sujetos que tuvieron un resultado negativo en las pruebas cutáneas. Se llevó a cabo mediante el método de simple ciego controlado con placebo [173]. En la mayoría de los casos se emplearon los siguientes fármacos y pautas:

- **Fenoximetilpenicilina o penicilina V:** 64,5-125-250-500 mg. (Penilevel<sup>®</sup>, ERN S.A, Barcelona, España).
- **Amoxicilina:** 64,5-125-250-500 mg. (Clamoxyl<sup>®</sup>, Beecham, Toledo, España).
- **Amoxicilina-clavulánico:** 64,5-125-250-500 mg. (Britapen<sup>®</sup>, Beecham, Toledo, España).

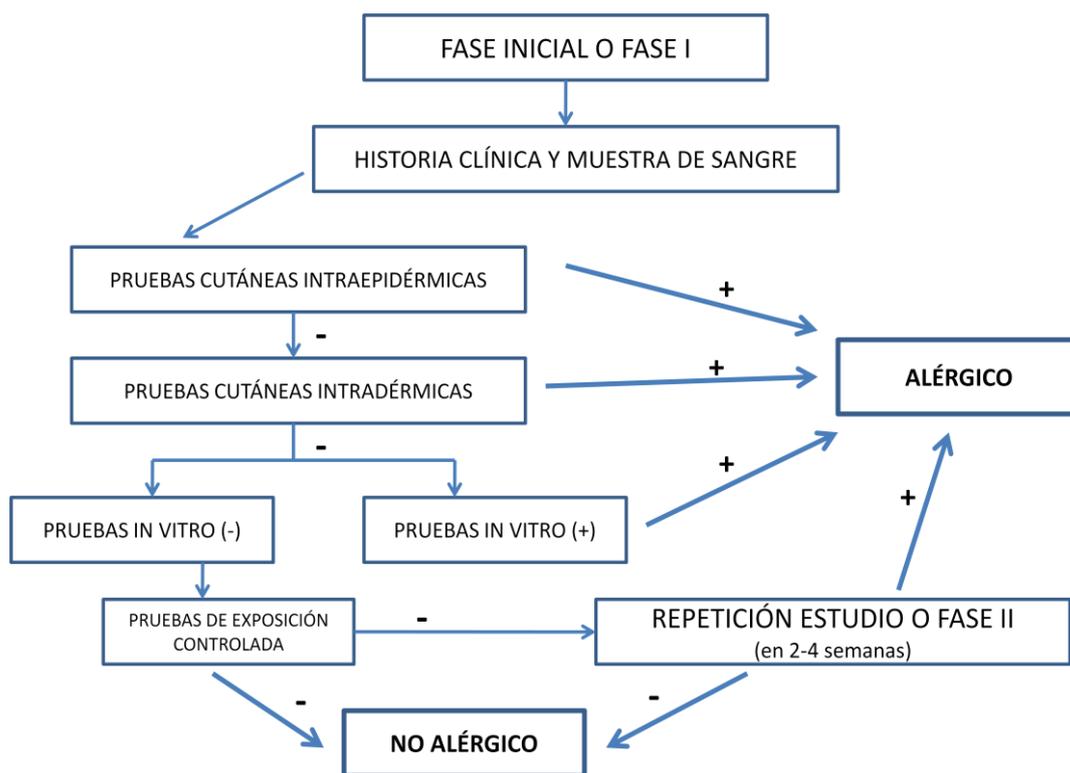
La prueba de exposición se realizó con intervalos de 45 minutos hasta llegar a la dosis terapéutica. Se empleó el fármaco que el paciente describía como causante de la reacción adversa. Si el paciente no recordaba el preparado exacto se utilizó penicilina V. En el caso de antibióticos diferentes a los citados, se administró el fármaco implicado en la reacción, con pauta general de 1/8-1/4-1/2-1 de la dosis completa.

Todas las pruebas de exposición se realizaron con una cuidadosa monitorización de los pacientes y en todos los casos se obtuvo consentimiento informado previo.

## 2. REPETICIÓN DEL ESTUDIO O FASE II

En todos aquellos pacientes cuyas pruebas cutáneas resultaron negativas y que toleraron la administración del antibiótico BL, se repitió de nuevo el estudio a las tres semanas del estudio inicial. En esta fase II, se realizaron las pruebas cutáneas utilizando los mismos determinantes que en la fase I (PPL, DM, penicilina G, amoxicilina, ampicilina y cefazolina, y el antibiótico implicado en caso de un BL diferente). De la misma forma que en

el estudio inicial, las pruebas se realizaron inicialmente en intraepidormreacción y, en caso de negatividad, se procedió a la inyección intradérmica de los distintos reactivos. Los criterios de positividad fueron los mismos que en la fase inicial. A todos los pacientes que presentaron pruebas cutáneas negativas se les realizó una prueba de exposición controlada con el antibiótico sospechoso de producir la reacción. Se administraron dosis crecientes del antibiótico, con intervalos de 45 minutos hasta alcanzar la dosis terapéutica.



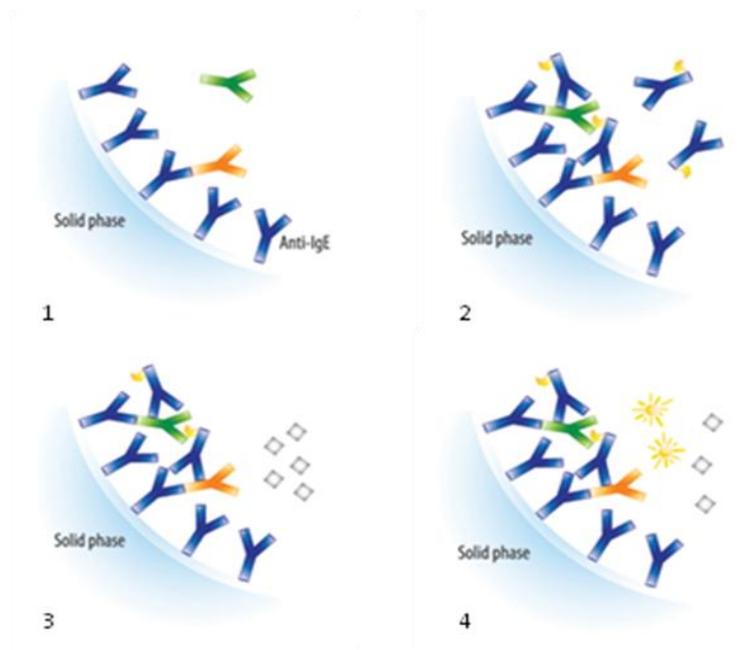
**Figura 6.** Algoritmo diagnóstico de reacciones alérgicas a beta-lactámicos. Tomada de *Allergy*, 2003; **58**: 961-972.

### 3. DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL

A todos los individuos del estudio se les realizó una extracción de suero en un tubo sin anticoagulante, mediante punción de sangre venosa realizada según el procedimiento estándar.

Los niveles de IgE total se determinaron utilizando el método comercial Pharmacia CAP System RAST FEIA desarrollado por Kabi Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suecia y desde

el 2011 adquirida por Thermo Fisher Scientific. Se trata de un FEIA (fluoroenzimoinmunoensayo), en el cual un antisuero monoclonal de conejo/ratón anti-IgE humana unido a betagalactosidasa se une de manera covalente a un soporte sólido de celulosa denominado InmunoCAP<sup>®</sup>. A continuación, se añade el suero del paciente con lo que se producirá la reacción entre su IgE y la anti-IgE marcada con el enzima. Posteriormente se realiza un lavado y se añade el sustrato 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido, formándose así un producto fluorescente. Tras la incubación se añade una solución para detener la reacción, y posteriormente se mide la fluorescencia del eluido, la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de IgE en el suero. Para evaluar los resultados de las pruebas, las unidades de respuesta se transforman en concentraciones utilizando una curva patrón o los valores de referencia del laboratorio.

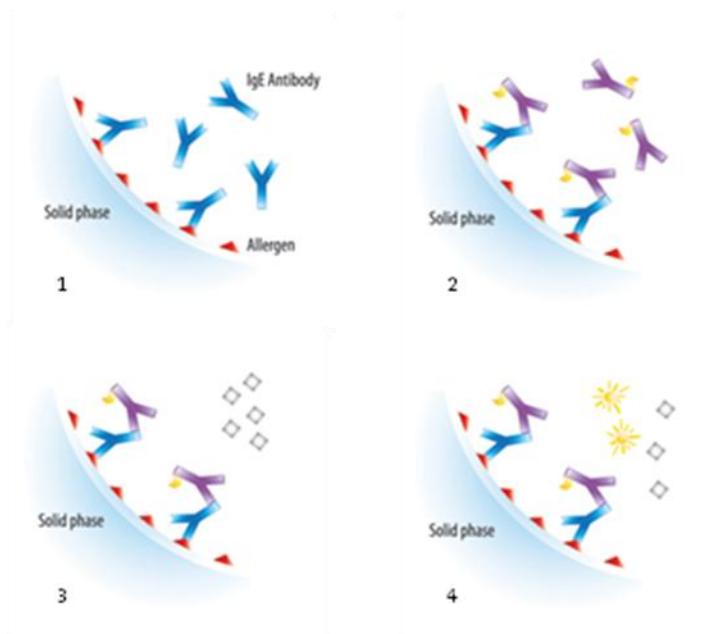


**Figura 7.** Determinación de IgE total. InmunoCAP 250 (Thermo Fisher Scientific).

#### **4. DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA**

La determinación de IgE específica para penicilina V, bencilpenicilina, amoxicilina y ampicilina fue realizada mediante el método comercial CAP System RAST FEIA (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El método consiste en un FEIA, en el cual el alérgeno que se investiga se encuentra fijado a un soporte sólido de celulosa denominado InmunoCAP<sup>®</sup>, que se incuba con el suero del paciente. Tras la incubación y el lavado posterior se añade un antisuero de conejo anti-IgE humana unida a betagalactosidasa para formar un complejo alérgeno-IgE-anti-IgE-enzima. Tras la incubación y posterior lavado, el complejo se incuba con el sustrato 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido, formándose así un compuesto fluorescente. La reacción se detiene con carbonato sódico, y la fluorescencia es leída en un aparato FluoroCount 96. La cantidad de fluorescencia será proporcional a la cantidad de IgE específica en el suero. El resultado de la prueba se expresa en clases o unidades arbitrarias determinadas por comparación con la fluorescencia de unos estándares conocidos que se analizan en paralelo. Se consideró positiva una clase mayor o igual que 2. Sin embargo, en ningún caso, la positividad excluyó la realización de pruebas cutáneas.



**Figura 8.** Determinación de IgE específica. InmunoCAP 250 (Thermo Fisher Scientific).

### *PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A AINE*

Antes de iniciar las exposiciones con el fármaco, hay que sospechar si el paciente va a presentar una hipersensibilidad selectiva o una reacción de hipersensibilidad no

inmunológica, para lo cual es importante dilucidar si existen uno o varios AINE implicados. Para ello, es importante realizar una historia clínica lo más precisa posible (Figura 9).

### 1.- En caso de presentar reacción aguda

La actitud dependerá del cuadro clínico presentado por el paciente.

#### ➤ *Pacientes que presentan sintomatología respiratoria*

En primer lugar estaría indicada la realización de una prueba de exposición controlada nasal (PEN) o prueba de exposición controlada bronquial (PEB) con acetilsalicilato de lisina (ASL) y si el paciente presenta síntomas se diagnosticaría de enfermedad respiratoria exacerbada por AINE (EREA).

El primer paso en el estudio diagnóstico de pacientes con síntomas respiratorios fue la realización de la historia clínica. Cuando ésta es sugestiva de EREA, no se recomienda realizar de forma sistemática PECO (prueba de exposición oral controlada) con inhibidores potentes de la COX-1 ya que dicha prueba presenta una alta probabilidad de producir una reacción respiratoria grave. En estos supuestos se debe decidir según riesgos/beneficios la necesidad de comprobar tolerancia a dichos fármacos. En situaciones excepcionales, como pudiera ser la realización de una desensibilización en pacientes que presenten una EREA puede estar justificado realizarla.

No obstante aunque se realice el diagnóstico de EREA, se debe comprobar la tolerancia a AINE alternativos, mediante una prueba de exposición oral controlada con inhibidores preferentes y/o selectivos de la COX-2, e inhibidores débiles de la COX-1.

#### ➤ *Pacientes que presentan sintomatología cutánea*

Ante un paciente con urticaria/angioedema crónico subyacente y una historia de aparición de habones con o sin angioedema tras la administración de uno o varios AINE lo más probable es que presente una enfermedad cutánea exacerbada a estos fármacos (ECEA). En este caso sería recomendable iniciar las PECO con AINE alternativos: inhibidores preferentes y/o selectivos de la COX-2, y continuar con inhibidores débiles de la COX-1. Si el paciente, durante el estudio, presenta una PECO positiva con un AINE diferente a los AINE referidos en la historia clínica estableceríamos el diagnóstico de certeza de ECEA.

Ante un paciente con urticaria/angioedema sin patología crónica de base podemos encontrar diferentes posibilidades:

- Si el paciente ha presentado reacciones de urticaria y/o angioedema o anafilaxia con más de dos AINE de diferente grupo farmacológico, es muy probable que presente una urticaria/angioedema inducida por AINE [336, 201]. El estudio se centra en la realización de las PECO con fármacos alternativos: inhibidores selectivos de la COX-2 y se continúa con los inhibidores débiles de la COX-1. Si el paciente, durante el estudio, presenta una PECO positiva con un AINE, diferente a los AINE referidos en la historia clínica, estableceríamos el diagnóstico de certeza de urticaria/angioedema inducida por AINE.
- Si el paciente ha presentado urticaria y/o angioedema o anafilaxia tras la toma de uno o dos AINE diferentes, se comienza realizando la PECO con un inhibidor potente de la COX-1: AAS si no es uno de los implicados e indometacina si el AAS es uno de los AINE implicados. Si el paciente presenta síntomas durante la PECO, obtenemos el diagnóstico de urticaria/angioedema inducida por AINE, por lo que continuaremos el estudio con PECO con inhibidores débiles de la COX-1 e inhibidores selectivos de la COX-2.

En el caso de que el paciente tolere la dosis total del inhibidor potente la COX-1 (AAS o indometacina), se continúa el estudio mediante PECO con el/los fármacos implicados en la reacción. En el caso que los tolere se descarta urticaria/angioedema o anafilaxia inducida por un único AINE. Si el paciente presenta una reacción, se realiza el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad selectiva. En este caso es conveniente evitar todos los fármacos que presentan una estructura química similar al implicado en la reacción.

Ante la sospecha de una alergia o hipersensibilidad selectiva y sobre todo, cuando el fármaco implicado pertenezca al grupo de las pirazolonas, se puede realizar una prueba cutánea (primero intraepidérmicas y si son negativas, intradermorreacción) para descartar o confirmar un mecanismo IgE mediado. Si resulta positivo, el estudio se puede concluir en este punto con el diagnóstico de alergia o hipersensibilidad selectiva, sin necesidad de administrar la pirazolona implicada.

**2.- En caso de presentar reacción no sugestiva**

Cuando un paciente acude a una consulta de alergia por haber presentado una supuesta reacción tras la toma de un AINE, puede suceder que la historia clínica que nos refiera sea no sugestiva de hipersensibilidad, por lo que si no existen contraindicaciones se realiza una PECO con el fármaco implicado y si lo tolera, se considera al paciente no alérgico. Si no lo tolera, debemos conocer la tolerancia a otros AINE de grupo químico diferente. Para ello debemos realizar PECO con un inhibidor potente de la COX-1: AAS (si no es uno de los implicados) o indometacina (si el AAS es uno de los AINE implicados). Si la respuesta es positiva, se diagnostica como urticaria/angioedema inducida por AINE y si lo tolera, el diagnóstico será de urticaria/angioedema o anafilaxia inducida por un único AINE o reacciones de hipersensibilidad tardía inducida por AINE dependiendo del intervalo de tiempo entre la administración del fármaco y la aparición de los síntomas.



En el caso de que la lectura de las pruebas epicutáneas en parche sea negativa se valorará la intensidad de la reacción. Si es grave se realiza PECO con un inhibidor potente de la COX-1: AAS (si no es uno de los implicados) o indometacina (si el AAS es uno de los AINE implicados). Si la respuesta es positiva, se diagnostica como urticaria/angioedema inducida por AINE y si lo tolera, como hipersensibilidad tardía al fármaco implicado en la reacción. Si la reacción es leve se realiza PECO con el fármaco implicado y si lo tolera, se considera al paciente no alérgico. Si no lo tolera, debemos conocer la tolerancia a otros AINE de grupo químico diferente. Para ello debemos realizar PECO con un inhibidor potente de la COX-1: AAS (si no es uno de los implicados) o indometacina (si el AAS es uno de los AINE implicados). Si la respuesta es positiva, se diagnostica como urticaria/angioedema inducida por AINE y si lo tolera, como hipersensibilidad tardía inducida por AINE y la recomendación es evitar el AINE implicado y el grupo químicamente relacionado.

## **POBLACIÓN ESTUDIADA**

### *CONTROLES*

Se incluyeron un total de 260 individuos, 156 en el estudio de AINE y 104 para el estudio de BL, que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial de Salamanca, otorgando su consentimiento informado. Se incluyeron dos grupos distintos de controles ya que los criterios de inclusión para cada grupo fueron distintos en función de las variables diferenciales que se pretendían analizar.

En el caso de los controles del estudio de AINE, al analizar las variables acompañantes a la hipersensibilidad a AINE se seleccionaron controles en los que se constató la ausencia de dichas variables por lo que debían cumplir los siguientes criterios:

- Edad superior a 18 años.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de asma.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de poliposis nasosinusal.
- Ausencia de síntomas y antecedentes sugerentes de hipersensibilidad a AINE.
- Ausencia de síntomas y antecedentes de alergia.

- Pruebas cutáneas negativas con una batería de aeroalérgenos comunes de nuestro entorno.

Las pruebas intraepidérmicas (*prick*) se realizaron siguiendo las recomendaciones del Subcomité para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la EAACI (*The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) [337] con una batería estandarizada de aeroalérgenos comunes en nuestro entorno que incluía: *Dermatophagoides pteronissynuss*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tirophagus putrescentiae*, *Euroglyphus maynei*, *Acarus siro*, *Glycyphagus domesticus*, mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, *Parietaria judaica*, *Chenopodium album*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago ovata*, *Olea europaea*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*, epitelios de perro, gato, hámster, caballo y conejo y cucaracha (ALK-Abelló, Madrid, España). Se empleó una solución de histamina 10 mg/ml como control positivo y una solución salina como control negativo. Antes de realizar la prueba, se retiraron los antihistamínicos que el paciente pudiera estar tomando, según las indicaciones de la EAACI [337].

La prueba consiste en realizar una punción en la epidermis utilizando una lanceta con una punta de 1 milímetro, atravesando, de modo perpendicular, una gota del extracto alérgico que se quiere estudiar, además de una gota de las soluciones de control positivo y negativo. Se consideró un resultado positivo si se producía una pápula igual o superior a 3 mm de diámetro, una vez descontado el diámetro del control negativo si se había producido pápula en él. El diagnóstico de atopia se estableció ante la presencia de una prueba positiva frente al menos un alérgeno tras la realización de las pruebas cutáneas. Se consideró que el paciente presentaba alergia frente a un determinado alérgeno si existía una prueba positiva y unas manifestaciones clínicas concordantes.

Respecto a los controles del estudio de BL, los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Edad superior a 18 años.
- Tolerancia a antibióticos beta-lactámicos mediante prueba de exposición controlada.

Los 104 controles en el estudio de alergia a BL fueron estudiados por reacción adversa a un antibiótico BL con resultado negativo en el estudio y tolerancia comprobada de este tipo de antibióticos. Además, 27 de los controles BL presentaban pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes frente a 77 con pruebas cutáneas negativas.

### *PACIENTES*

Participaron en el estudio 183 pacientes, que acudieron al Servicio de Inmunoalergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, de los cuales 98 fueron diagnosticados por los facultativos especialistas del Servicio de Alergia, según los criterios indicados previamente, de hipersensibilidad a antibióticos BL; los 85 restantes, fueron diagnosticados de hipersensibilidad a AINE.

En relación a los pacientes alérgicos a BL, los 98 pacientes presentaban antecedentes de reacción inmediata con un antibiótico beta-lactámico e hipersensibilidad inmediata demostrada mediante el estudio alergológico.

Respecto a los pacientes con hipersensibilidad a AINE, los 85 pacientes presentaban EREA (enfermedad respiratoria exacerbada por AINE).

A los 183 pacientes también se les realizaron las pruebas cutáneas intraepidérmicas (*prick*) con una batería estandarizada de aeroalérgenos comunes en nuestro entorno, así como la determinación de IgE total utilizando un FEIA (fluoroenzimoinmunoensayo, ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific Inc).

## *4.2 ANÁLISIS MOLECULAR*

### *EXTRACCIÓN DE ADN*

A todos los individuos del estudio se les realizó una extracción de sangre periférica mediante venopunción, que fue recogida en un tubo con anticoagulante EDTA, que se mantuvo almacenado a -20°C hasta el momento de proceder a la extracción de ADN.

Durante el estudio se siguió un protocolo de extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre total, MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche Applied Science, Mannheim,

Alemania). Se trata de un sistema automatizado con el que se consigue un ADN de buena calidad y a una concentración homogénea.

MagnaPure Compact (Roche Applied Science, Manheim, Alemania) (Figura 10) es un sistema automatizado que facilita la extracción de ácidos nucleicos a partir de una amplia diversidad de muestras (sangre total, suero, plasma, células en cultivo). Permite la extracción de muestras de ADN genómico adecuadas para su uso en reacciones de PCR.



**Figura 10.** MagNA Pure Compact Instrument.

El equipo es un instrumento con un brazo de ocho cabezales para la inserción de las pipetas, que permite procesar ocho muestras simultáneamente. El cabezal posee un sensor para la detección de coágulos en la muestra. Los cartuchos que contienen los reactivos se insertan en una gradilla específica que se introduce en el instrumento.

La extracción del ADN se lleva a cabo utilizando un sistema de partículas magnéticas que consta básicamente de un cartucho con una serie de pocillos en los que se encuentran los reactivos de extracción. Es necesario introducir un *rack* de puntas de pipeta estériles con filtro, cuya función es aspirar la muestra y transferirla por los distintos pocillos que contienen los reactivos.

El proceso de extracción (Figura 11), consiste en la adición a la muestra de un tampón de lisis que contiene proteinasa K para lisar proteínas, Tritón X-100 (detergente que facilita la disrupción de las membranas celulares) e inhibidores de desoxirribonucleasas y ribonucleasas. Tras una incubación a temperatura elevada (50°C), se añade una solución con partículas magnéticas e Isopropanol, que consigue el aislamiento de las moléculas de ácidos nucleicos asociadas a las partículas. Tras una serie de pasos de lavado, en los que se incorpora una solución tampón de lavado y etanol a diferentes pH (inicialmente pH 6,6 y después pH 4), se consigue la separación del ADN de la partícula magnética por calor y elución final con Tris-EDTA en el tubo de elución.



**Figura 11.** Procedimiento de extracción de ADN.

En cada una de las extracciones se realizaron los siguientes pasos, según el protocolo establecido:

- Las muestras de sangre que habían sido almacenadas a -20°C, se descongelaron gradualmente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Una vez descongeladas, los tubos de muestras se colocaron en un agitador de rodillos unos 5-10 minutos para su correcta homogenización.
- Una vez encendido el instrumento, se seleccionó el protocolo "DNA blood\_1000", para 1 mL de muestra de sangre total y elución en un volumen final de 200 µL. Se

introdujeron los cartuchos de reactivos en el carrusel tras la lectura del código de barras de los mismos. Las puntas desechables también fueron colocadas en el equipo.

- Se dispensó 1 mL de muestra en un criotubo que se colocó en la parte posterior del *rack* de muestras, debidamente identificado y ordenado según el número de laboratorio. Dicha identificación fue introducida en el ordenador del instrumento. Se pudieron introducir hasta 8 muestras correspondientes a 8 pacientes.
- Los tubos de elución se colocaron en la parte delantera del *rack* de muestras, identificando cada tubo con el número de laboratorio de la muestra y leyendo el código de barras para su correcta identificación en el ordenador del instrumento. Se introdujeron tantos tubos de elución como criotubos que contienen la muestra.
- Una vez identificados todos los componentes, se introdujeron en el aparato y se procedió a la extracción automática, de aproximadamente treinta y cinco minutos de duración.
- Finalizado este tiempo, se recogieron los tubos de elución con el ADN correspondiente a cada paciente, se desecharon los cartuchos de reactivos y el *rack* de puntas de pipeta desechables. Se limpió el instrumento por dentro y se descontaminó mediante luz UV, a fin de dejarlo listo para la siguiente extracción.

### **EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ADN**

La cantidad y calidad de muestra de ADN extraído son dos parámetros fundamentales en el análisis genético de polimorfismos, por lo que una vez extraídas las muestras, se evaluó su rendimiento mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Se siguió el siguiente protocolo de cuantificación de ADN para evaluar el rendimiento de la extracción:

- Se tomaron 2  $\mu\text{L}$  del ADN extraído con el sistema Magnapure y se añadieron 98  $\mu\text{L}$  de agua destilada, a fin de realizar una dilución al 1/50 en volumen final de 100  $\mu\text{L}$ .
- Una vez preparadas las diluciones de todas las muestras se agitaron en *vortex*, y se realizó un “toque” de *spin*.

- Se encendió el espectrofotómetro BioPhotometer y se introdujo el factor de dilución con el que se iba a trabajar. A continuación, se hizo un blanco con agua destilada. Las cubetas son de plástico y entre medición y medición se lavaron con agua destilada.
- Se cargaron los 100  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN diluida y se realizó una medición. Se anotó la absorbancia a 260 nm y Ratio 260/280. Para calcular la concentración de ADN, se utilizó la concentración calculada por el fotómetro a partir de la dilución empleada. Se repitió la medición por triplicado y se registró en un cuaderno.

### ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

En este estudio, han sido analizados 22 polimorfismos de 13 genes de citocinas en 443 individuos, lo que supone un total de 9746 polimorfismos genotipados. En la tabla 2, se muestran las citocinas y los polimorfismos estudiados.

### AMPLIFICACIÓN DE LOS SNP

En el análisis del genotipo se utilizó un sistema conocido como “*Cytokine genotyping*”, desarrollado por el Departamento de Inmunología de la Universidad de Heidelberg (Alemania), distribuido por Invitrogen™ (Deerbrook, Trail, USA) y certificado por la Comunidad Europea de acuerdo a los requerimientos de la Directiva para el Diagnóstico In Vitro 98/79/EC.

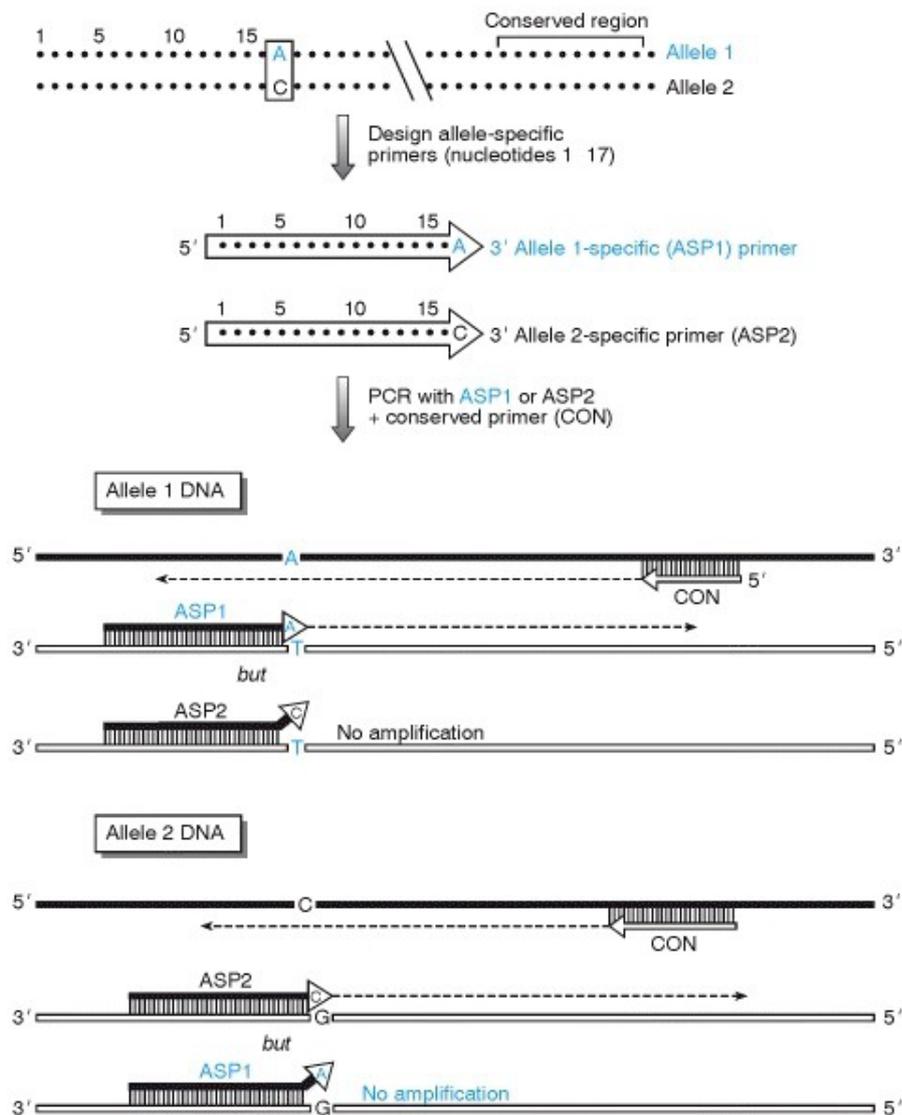
Se trata de, un sistema basado en la reacción en cadena de la polimerasa mediante cebadores específicos de secuencia SSP-PCR (*sequence specific primers polymerase chain reaction*) que permite un análisis rápido de mutaciones conocidas (Figura 12). Este sistema, que también se denomina ARMS (*amplification-refractory mutation system*), es un método empleado para detectar cualquier mutación que implique el cambio de en una única base. Este sistema se basa en el uso de una PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia, que sólo permite amplificar el DNA cuando la muestra incluye el alelo diana. Estos oligonucleótidos específicos de alelo tienen el nucleótido del extremo 3' complementario a una de las variantes del sitio polimórfico que se pretende analizar. Este cebador sólo podrá ser extendido eficientemente cuando su extremo 3' empareje perfectamente con el ADN

molde de la muestra [338]. Para genotipar cada polimorfismo, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR independientes, usando en cada una un cebador específico de alelo diferente y compartiendo un cebador diseñado para unirse a una región invariable. Se diseñaron, por tanto, dos reacciones de PCR que compartían un mismo cebador común pero se diferenciaban en los cebadores específicos para cada alelo: un cebador amplificará sólo el alelo normal, el otro cebador amplificará sólo el alelo mutado, por tanto, la obtención de amplificación pone de manifiesto la presencia en la muestra de la variante detectada por el cebador específico de alelo utilizado.

**Tabla 2.** Citocinas y polimorfismos analizados en el estudio.

<b>CITOCINA</b>	<b>Identificación NCBI</b>	<b>NOMBRE (Heidelberg kit)</b>
<b>IL-1A</b>	rs1800587	<i>IL-1A -889 C&gt;T</i>
<b>IL-1B</b>	rs 16944 rs 1143634	<i>IL-1B -511 C&gt;T</i> <i>IL-1B 3954 C&gt;T (IL-1B 3962)</i>
<b>IL-1R</b>	rs 2234650	<i>IL-1R pst1C&gt;T (IL-1R pst1 1970)</i>
<b>IL-1RA</b>	rs 315952	<i>IL-1RA mspa1 T&gt;C (IL-1RA mspa1 11100)</i>
<b>IL-2</b>	rs 2069762 rs 2069763	<i>IL-2 -714 T&gt;G (IL-2 -330)</i> <i>IL-2 114 G&gt;T (IL-2 166)</i>
<b>IL-4</b>	rs 22432484 rs 2243250 rs 2070874	<i>IL-4 -1098 T&gt;G</i> <i>IL-4 -589 C&gt;T (IL-4 -590)</i> <i>IL-4 -33 C&gt;T</i>
<b>IL-4RA</b>	rs 1801275	<i>IL-4RA Gln221Arg A&gt;G (IL-4RA 1902)</i>
<b>IL-6</b>	rs 1800795 rs 1800797	<i>IL-6 -174 G&gt;C</i> <i>IL-6 -597 G&gt;A (IL-6 nt565)</i>
<b>IL-10</b>	rs 1800872 rs 1800871 rs 1800896	<i>IL-10-592 C&gt;A</i> <i>IL-10 -819 C&gt;T</i> <i>IL-10 -1082 A&gt;G</i>
<b>IL-12B</b>	rs 3212227	<i>IL-12B pos 1188 A&gt;C (IL-12B -1188)</i>
<b>IFN-G</b>	rs 2430561	<i>IFN-G 874 A&gt;T</i>
<b>TGFB1</b>	rs 1982073 rs 1800471	<i>TGFB1 869 T&gt;C (TGFB1 codón 10)</i> <i>TGFB1 915 G&gt;C (TGFB1 codón 25)</i>
<b>TNF-A</b>	rs 361525 rs 1800629	<i>TNF-A -238 G&gt;A</i> <i>TNF-A -308 G&gt;A</i>

Los 22 polimorfismos se determinan en 48 pocillos, correspondientes a la mitad de la placa. Cada uno de los pocillos contiene una pareja de oligonucleótidos específicos de uno de los alelos, además de un control positivo de amplificación: cebadores que permiten la amplificación de un fragmento de 89 pb del gen de la  $\beta$ -globina en los pocillos de los polimorfismos de *IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10*; y de un fragmento de 440 pb del gen de la proteína C reactiva humana en los pocillos de los polimorfismos de *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL4RA*, *IL12*, *IFNG*, *TGFB1* y *TNFA*.



**Figura 12.** SSP-PCR (Tomado de Human Molecular Genetics 2, Tom Strachan y Andrew P. Reader).

Cada placa incluye la mezcla específica de oligonucleótidos liofilizados, como ya se ha indicado; en una placa de PCR, que contiene 96 pocillos, pueden genotiparse simultáneamente dos individuos. Además, el sistema también incluye el tampón de reacción con los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) necesarios para llevar a cabo la reacción, pero no incluye la DNA polimerasa. Sin embargo, se ha utilizado la recomendada por el fabricante, la FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se trata de una polimerasa termoestable, modificada a partir de la polimerasa recombinante de *Thermus aquaticus*, que se caracteriza por permanecer inactiva a temperaturas inferiores a 75°C y activarse tras un paso de incubación de 4 minutos a 95°C [339]. Esto supone una notable mejora en el rendimiento de la PCR, ya que minimiza la aparición de productos de amplificación inespecíficos, además de disminuir la dimerización de oligonucleótidos.

### **PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN**

El primer paso es la descongelación de las muestras de ADN y dos viales de tampón de reacción necesarios; la descongelación se llevó a cabo en gradillas de frío, de manera que el cambio de temperatura tiene lugar de forma gradual.

Una vez que las muestras y los viales de tampón de reacción fueron descongelados, el siguiente paso consistió en la preparación de una mezcla de reacción, cuyos componentes se detallan en la tabla 3.

La cantidad de ADN utilizada en cada paciente dependió del rendimiento obtenido en la extracción. Se ajustó la cantidad de ADN por paciente de manera que se añadiesen aproximadamente 7,5 µg totales de ADN para las 48 reacciones, equivalente a 75 µL de ADN, a una concentración entre 75-125 ng/µL de ADN. El resto de volumen (hasta los 381 µL), se completó con agua destilada, para un volumen final de 525 µL.

**Tabla 3.** Elementos de la mezcla de reacción.

<b>TAMPÓN DE REACCIÓN</b>	<b>FastStart Taq DNA polymerase</b>	<b>Agua destilada</b>	<b>ADN</b>	<b>Volumen final</b>
140 µl	4 µl	306 µl	75 µl	525 µl

Como tampón de reacción se utilizó el Buffer GL Plus (Invitrogen, actualmente Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, USA). Los componentes de la mezcla de reacción fueron añadidos en el siguiente orden: agua destilada estéril y libre de desoxirribonucleasas, tampón de reacción, muestra de ADN y polimerasa (la polimerasa se mantuvo a -20°C hasta el momento de ser añadida a la mezcla de reacción). Todos los componentes se añadieron en un tubo *Eppendorf* estéril en gradilla fría perfectamente identificado con el número de ADN asignado en el laboratorio. A continuación, se mezclaron utilizando un agitador tipo “vórtex” seguido de un “toque” de centrifuga (*spin*). Una vez preparada la mezcla, se sacó la placa de PCR del congelador y se colocó en una gradilla fría para dispensar 10 µL de la mezcla de reacción en cada pocillo. Como se ha mencionado previamente, en cada placa se pueden genotipar simultáneamente 2 pacientes, 48 pocillos para cada uno. Por tanto, se preparaban a la vez, en cada PCR, 2 mezclas de reacción independientes correspondientes a dos pacientes diferentes. Al terminar de rellenar la placa, ésta se tapaba y por último, la placa se introducía en un termociclador TProfessional 96 Thermocycler, Whatman Biometra®, (Goettingen, Alemania).

El rendimiento de la técnica resultó ser muy bajo con el programa de PCR recomendado por el fabricante. Tras realizar una serie de pruebas de ajuste, se modificaron las condiciones a un programa cuyas características se citan en la tabla 4, y que ha sido utilizado en todos los individuos del estudio.

**Tabla 4.** Programa de PCR utilizado en el estudio.

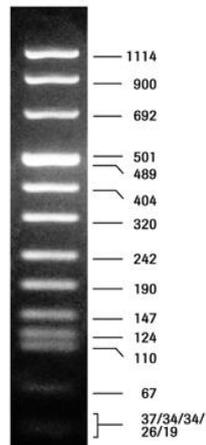
<b>ACTIVACIÓN DE LA POLIMERASA</b>	<b>4 min</b>	<b>94°C</b>	
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>30 seg</b>	<b>94°C</b>	<b>10X</b>
<b>1ª ELONGACIÓN</b>	<b>60 seg</b>	<b>65°C</b>	<b>10X</b>
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>30 seg</b>	<b>94°C</b>	<b>20X</b>
<b>2ª ELONGACIÓN</b>	<b>50 seg</b>	<b>65°C</b>	<b>20X</b>
<b>ELONGACIÓN FINAL</b>	<b>60 seg</b>	<b>72°C</b>	
<b>CONSERVACIÓN</b>		<b>8°C</b>	

## VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 2%. Para su preparación se utilizó agarosa NuSieve® 3:1 Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, EEUU) y tampón TAE (Tris-Acético-EDTA) al 0,5X, preparado a partir de una solución madre TAE Buffer 10X (Promega, Madison, USA), compuesto por 400 mM de Tris-acetato y 10 mM de EDTA a pH 8,2-8,4. Durante el estudio se sustituyó el TAE por TBE (Tris-Bórico-EDTA) al 0,5X, debido a que resulta más adecuado para la separación electroforética de fragmentos pequeños de ADN (100 – 500 pb) y tiene mayor capacidad de discriminación en gel de agarosa al 2%. La preparación del TBE fue al igual que en el caso de TAE a partir de una solución madre TBE Buffer 10X (Promega, Madison, USA), compuesta por 890 mM de Tris-bórico, 890 mM de ácido bórico y 20 mM de EDTA.

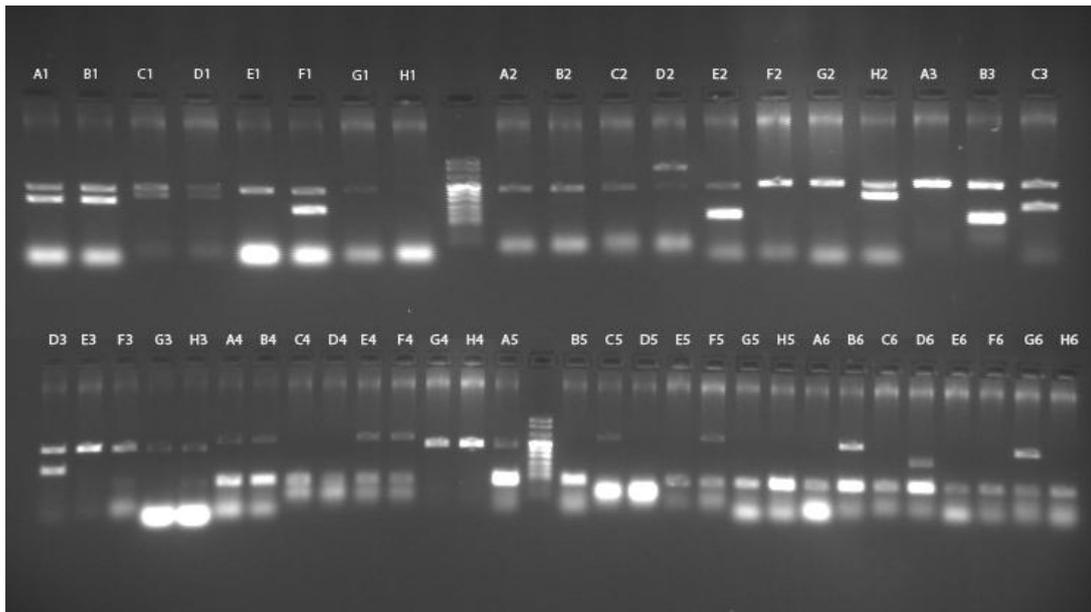
La preparación del gel se hizo pesando la agarosa, según el volumen del TAE o TBE 0,5X que se iba a emplear y teniendo en cuenta que los geles de agarosa son al 2%. A continuación, se disolvió la agarosa en el TAE o TBE en un horno microondas hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez enfriada la agarosa a una temperatura de 50-60°C, se vertió en la cubeta de electroforesis y se añadió GelRed (INtRON BIOTECHNOLOGY, Houston, Texas, USA), concretamente 6 µl de GelRed por cada 300 µl de buffer. El GelRed sustituye al bromuro de etidio y actúa intercalándose entre las hebras de ADN y emitiendo fluorescencia al ser iluminado con luz ultravioleta, lo que permite poner de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos en el gel de agarosa. Además, muestra una gran ventaja frente al bromuro de etidio y es que el GelRed no es tóxico ni mutagénico; por tanto, su manipulación resulta segura. Una vez solidificada la disolución (aproximadamente entre 40 minutos y una hora, variable en función de la temperatura ambiente), el siguiente paso fue situar la bandeja con el gel en una cubeta con de electroforesis rellena con buffer TAE /TBE al 0,5X y finalmente cargar en cada uno de los pocillos del gel una de las amplificaciones/pocillo de la placa de PCR (10 µL). No hubo necesidad de añadir tampón de carga, ya que el tampón de reacción Buffer GL Plus ya contiene glicerol, que proporciona a las muestras la densidad necesaria para que se depositen en el fondo del pocillo en lugar de diluirse en el tampón de electroforesis.

Como referencia, en todos los geles se utilizó como marcador de peso molecular el *DNA Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Manheim, Alemania), que tiene un patrón de bandas que oscila en un rango de tamaños de 1114 pb a 67 pb (Figura 13).



**Figura 13.** Patrón de bandas del Marker VIII en un gel de agarosa al 2%.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando como tampón TAE 0,5X o bien, como hemos señalado, TBE 0,5X a 180 Voltios durante 20-25 minutos. Transcurrido ese tiempo, el gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta, para ser analizado con el sistema fotográfico VisiDoc-It™ Imaging System (Uplant, CA, USA). En la figura 14, se observa el resultado de la amplificación de los 22 polimorfismos a través de bandas en un gel de electroforesis correspondientes a un paciente.



**Figura 14.** Visualización con luz UV de un gel de electroforesis.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de resultados se ha realizado utilizando para ello una plantilla (Figura 15) que asocia la posición de la reacción de PCR con el alelo del polimorfismo que se va a determinar.

Como mejora del sistema se modificó el tamaño de la banda producto para el polimorfismo del *IFNG*, que pasó a ser de 180 pb (Tabla 5). El resto de polimorfismos mantuvieron el mismo tamaño de la banda producto como puede observarse en la tabla 5.

	1	2	3	4	5	6
A	IL-1R T/1970 288	g-IFN T/874 277	TNFa A/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//G565 426	IL10 A/-1082//A/-592 530
	IL-1R C/1970 288	g-IFN A/874 277	TNFa G/-308//G/-238 110	IL4 T/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//G565 427	IL10 A/-1082//C/-592 530
C	IL-1b C/+3962 336	IL-12 A/-1188 802	TGFb1 T/10 195	IL2 T/-330//T/166 569	IL4 C/-590//C/-33 610	IL10 A/-1082//T/-819 305
	IL-1b T/+3962 336	IL-12 C/-1188 802	TGFb1 C/10 195	IL2 G/-330//T/166 569	IL4 C/-590//T/-33 610	IL10 A/-1082//C/-819 305
E	IL-1b T/-511 215	IL-4Ra A/1902 143	TGFb1 T/10-C/25 80	IL2 G/-330//G/166 564	IL4 T/-590//C/-33 610	IL10 G/-1082//C/-592 530
	IL-1b C/-511 215	IL-4Ra G/1902 143	TGFb1 T/10-G/25 80	IL2 T/-330//G/166 562	IL4 T/-590//T/-33 610	IL10 G/-1082//C/-819 305
G	IL-1a C/-889 220	IL-1RA C/11100 297	TGFb1 C/10-C/25 80	TNFa A/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//C/-590 557	IL6 C/-174//A/565 428
	IL-1a T/-889 220	IL-1RA T/11100 297	TGFb1 C/10-G/25 80	TNFa G/-308//A/-238 110	IL4 G/-1098//T/-590 557	IL6 G/-174//A/565 428
		Control 440pb				
		Control 89				

**Figura 15.** Plantilla de interpretación de resultados: cada casilla se corresponde con cada uno de los pocillos de la placa de PCR. En ella se señala el alelo que amplifica, así como el tamaño en pares de bases de la banda producto. En las casillas sombreadas, el tamaño de la banda control es de 440 pb y en las casillas en blanco, la banda control es de 89 pb.

**Tabla 5.** Tabla que muestra el tamaño de la banda producto y la banda control para cada uno de los 22 polimorfismos estudiados y el nuevo tamaño de la banda producto correspondiente al polimorfismo del *IFNG*.

Citocinas	Especificidad alélica	Número de posición	Banda producto (pb)	Banda control (pb)
IL-1A	T en pos -889	1	220	440
	C en pos -889	2	220	440
IL-1B	C en pos -511	3	215	440
	T en pos -511	4	215	440
	T en pos +3962	5	336	440
	C en pos +3962	6	336	440
IL-1R	C en pos pst1 1970	7	288	440
	T en pos pst1 1970	8	288	440
IL-1RA	T en pos mspa1 11100	9	297	440
	C en pos mspa1 11100	10	297	440
IL-4RA	G en pos +1902	11	143	440
	A en pos +1902	12	143	440
IL-12	C en pos -1188	13	802	440
	A en pos -1188	14	802	440
IFN-G	A en pos UTR 5644	15	180	440
	T en pos UTR 5644	16	180	440

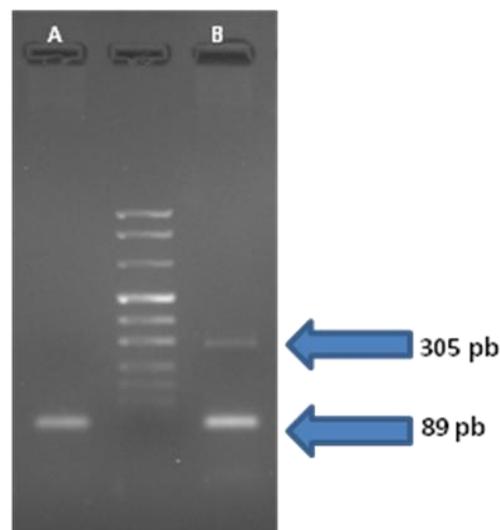
Citocinas	Especificidad alélica	Número de posición	Banda producto (pb)	Banda control (pb)
<b>TGFB1</b>	C en Codón 10; G en Codón 25	17	80	440
	C en Codón 10; C en Codón 25	18	80	440
	T en Codón 10; G en Codón 25	19	80	440
	T en Codón 10; C en Codón 25	20	80	440
	C en Codón 10	21	195	440
	T en Codón 10	22	195	440
<b>TNF-A</b>	G en pos -308; G en pos -238	23	110	440
	A en pos -308; G en pos -238	24	110	440
	G en pos -308; A en pos -238	25	110	440
	A en pos -308; A en pos -238	26	110	440
<b>IL-2</b>	T en pos -330; G en pos +166	27	562	89
	G en pos -330; G en pos +166	28	564	89
	G en pos -330; T en pos +166	29	569	89
	T en pos -330; T en pos +166	30	569	89
<b>IL-4</b>	T en pos -1098; T en pos -590	31	557	89
	T en pos -1098; C en pos -590	32	557	89
	G en pos -1098; T en pos -590	33	557	89
	G en pos -1098; C en pos -590	34	557	89
	T en pos -590; T en pos -33	35	610	89
	T en pos -590; C en pos -33	36	610	89
	C en pos -590; T en pos -33	37	610	89
	C en pos -590; C en pos -33	38	610	89
<b>IL-6</b>	G en pos -174; G en pos nt565	39	427	89
	C en pos -174; G en pos nt565	40	426	89
	G en pos -174; A en pos nt565	41	428	89
	C en pos -174; A en pos nt565	42	428	89
<b>IL-10</b>	G en pos -1082; C en pos -819	43	305	89
	G en pos -1082; C en pos -592	44	530	89
	A en pos -1082; C en pos -819	45	305	89
	A en pos -1082; T en pos -819	46	305	89
	A en pos -1082; C en pos -592	47	530	89
	A en pos -1082; A en pos -592	48	530	89

Una vez realizada la electroforesis y la fotografía correspondiente, ésta se analizó utilizando el programa Adobe Photoshop CS4. En todos los casos se aplicaron los mismos filtros de visualización para obtener una lectura homogénea en todos los pacientes sin introducir ninguna modificación. A partir de aquí, se fue examinando con detalle cada carrera del gel, indicando su determinación como positiva, negativa o no concluyente, en función de los siguientes criterios:

- Presencia de banda control de 89 pb en las carreras de los polimorfismos de *IL2*, *IL4*, *IL6* e *IL10* y de banda control de 440 pb en las carreras de los polimorfismos de *IL1A*, *IL1B*, *IL1R*, *IL1RA*, *IL4RA*, *IL12*, *IFNG*, *TGFB* y *TNFA*. Se tuvo en cuenta que las bandas control podrían aparecer más tenues si la amplificación del polimorfismo era muy patente debido a un fenómeno de competición por sustrato, ya que los oligonucleótidos de amplificación del control se encuentran a menor cantidad que los de los polimorfismos problema, para favorecer la reacción específica de alelo.
- Evaluación de la presencia o ausencia de la banda esperada, en función de su tamaño.
- Evaluación de la presencia de otras bandas de tamaño diferente al esperado.

La amplificación se consideró negativa (Figura 16A) cuando en la carrera de electroforesis se observó la banda control correspondiente, pero no la banda problema de tamaño concreto, independientemente de la presencia o no de otra banda de diferente tamaño.

Se consideró una amplificación positiva cuando podía observarse en la carrera de electroforesis la banda problema del tamaño correspondiente, además de la banda control (Figura 16B).



**Figura 16.** El carril A muestra el resultado de una amplificación negativa, ya que se observa una banda control de 89pb, pero no se observa la banda problema, que debería tener 305pb. En el carril B, se considera la amplificación positiva; aparece tanto la banda control de 89 pb como la banda problema de 305 pb.

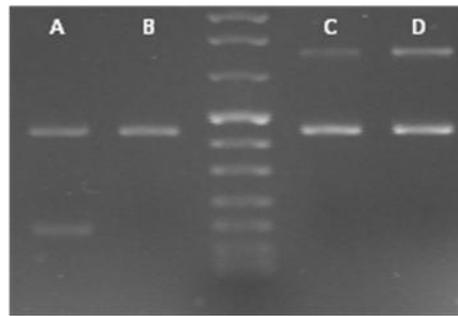
Así, en aquellas reacciones en las que no se observaba la banda control y la banda problema era muy tenue o no se apreciaba, se consideraron no concluyentes (Figura 17).



**Figura 17.** En los carriles A, B y C no se observan ni las bandas control ni las bandas problema; se interpreta que ha ocurrido un fallo de amplificación de esos polimorfismos en concreto y se determina que el resultado es no concluyente.

Una vez interpretado el gel, y anotados los resultados en la plantilla, el siguiente paso fue la determinación del genotipo de los polimorfismos a partir de la misma plantilla. Los resultados correspondientes al genotipado de los diferentes polimorfismos se transcribieron a una base de datos disociada realizada con el paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois).

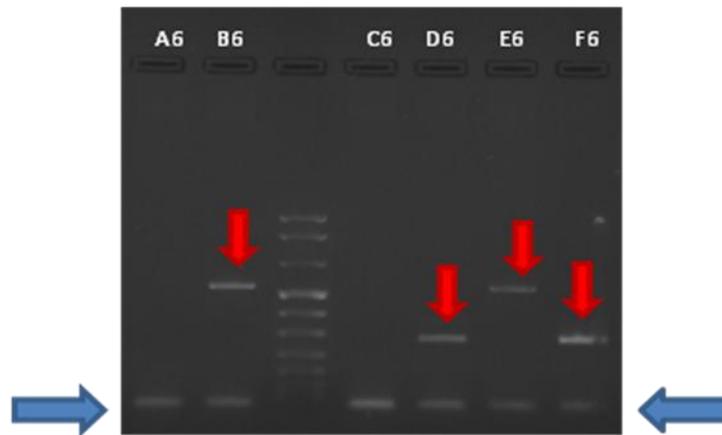
El análisis de un genotipo concreto en un locus, se llevó a cabo examinando todas las reacciones relativas a dicho locus, comprobando que fuesen concordantes y que en ninguna de ellas se hubiese obtenido un resultado no concluyente (Figura 18).



**Figura 18.** En esta figura se muestra en los carriles A y B las reacciones de amplificación del polimorfismo 874 A>T de *IFNG*. El pocillo A representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo T y el pocillo B la mezcla específica del alelo A. En ambos casos, se observa la presencia de la banda control de 440 pb, pero la banda específica de amplificación, de 180 pb sólo se observa en el carril A, por lo que debe interpretarse que el genotipo de este paciente para este polimorfismo es homocigoto mutado TT. En los carriles C y D se muestran las reacciones de amplificación correspondientes al polimorfismo -1188 A>C de *IL12*. El pocillo C representa la mezcla de oligonucleótidos específica del alelo A y el pocillo D la mezcla específica del alelo C. En ambos pocillos, se observa la banda control de 440 pb, además de la banda problema de 802 pb, por lo que debe interpretarse que este individuo es heterocigoto AC para este polimorfismo.

## INTERPRETACIÓN DE HAPLOTIPOS Y DIPLOTIPOS

El sistema de genotipado de citocinas utilizado en este estudio, además de polimorfismos, permite identificar haplotipos y diplotipos, debido a que algunos pocillos contienen oligonucleótidos específicos para dos polimorfismos del mismo gen con distinta posición. Para la correcta interpretación de un diplotipo concreto, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la amplificación de todos los pocillos relativos a ese gen (se muestra un ejemplo en la figura 19).



**Figura 19.** En esta figura se muestra el resultado de la amplificación de los tres polimorfismos estudiados en el gen de *IL10*. En el carril A6 hay oligonucleótidos específicos para el alelo A en posición -1082 y el alelo A en posición -592; el carril B6 para el alelo A -1082 y C -592; en el carril C6 para el alelo A -1082 y T -819; en el carril D6 para el alelo A -1082 y C -819; en el carril E6 para el alelo G -1082 y C -592; en el carril F6 para el alelo G -1082 y C-819. En todos los pocillos se observa la banda control de 89 pb (flechas azules), por lo que el genotipado se considera correcto. Además, se observan bandas problema (flechas rojas) en los carriles B6 (530 pb), D6 (305 pb), E6 (530 pb) y F6 (305 pb). La presencia de estas bandas se interpretó según la tabla 6.

**Tabla 6.** En esta tabla se muestra el resultado del genotipado del diplotipo del paciente, que en este caso es *IL10* -1082,-819,-592 ACC/GCC. Es decir, el individuo es heterocigoto AG para el polimorfismo -1082 A>G y homocigoto CC para los restantes polimorfismos, -819 C>T y -592 C>A.

POCILLO DE LA PLACA	pos -1082	pos -819	pos -592
B 6	A		C
D 6	A	C	
E 6	G		C
F 6	G	C	

Este cuidadoso y minucioso análisis se realizó para todos los haplotipos y diplotipos estudiados para cada uno de los pacientes, pudiendo llevar a cabo el genotipado de los mismos. En la tabla 7, se detallan todos los haplotipos analizados.

**Tabla 7.** Haplotipos analizados en el estudio.

<b>CITOCINAS</b>	<b>Alelos específicos/ posición 1</b>	<b>Alelos específicos/ posición 2</b>	<b>Alelos específicos/ posición 3</b>
<b>IL-1B</b>	<b>T/-511 C/-511</b>	<b>C/3962 T/3962</b>	
<b>IL-2</b>	<b>T/-330 G/-330</b>	<b>T/166 G/166</b>	
<b>IL-4</b>	<b>T/-1098 G-1098</b>	<b>C/-590 T/-590</b>	<b>C/-33 T/-33</b>
<b>IL-6</b>	<b>C/-174 G/-174</b>	<b>G/565 A/565</b>	
<b>IL-10</b>	<b>A/-1082 G/-1082</b>	<b>T/-819 C/-819</b>	<b>A/-592 C/-592</b>
<b>TGFB1</b>	<b>T/10 C/10</b>	<b>C/25 G/25</b>	
<b>TNF-A</b>	<b>A/-308 G/-308</b>	<b>G/-238 A/-238</b>	

## CONTROL DE CALIDAD

Se han seguido todas las recomendaciones de la *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN) [340] en cada uno de los procedimientos analíticos que se han realizado.

El primer punto de control del estudio se basa es la fase preanalítica, que resulta crítica en todo proceso de laboratorio. La recepción de muestras en el Servicio de Inmunoalergia se llevó a cabo mediante la identificación con un código de barras de una hoja de recogida de datos clínicos igual al código de barras que identificaba el tubo de la muestra. En el momento que la muestra llegaba al laboratorio, tanto el tubo de la muestra como su correspondiente hoja de datos fueron nuevamente identificados con un número de laboratorio y, en lo relativo a la información del paciente, todos sus datos se anotaron en una base de datos general perteneciente al Servicio de Inmunoalergia. La base de datos es confidencial y su acceso es restringido. La hoja con los datos clínicos del paciente fue archivada y guardada en una carpeta.

Una vez identificados los tubos con las muestras de sangre, el siguiente paso fue el alicuotado en criotubos de 1 ml; generalmente se obtuvieron 3 criotubos de 1 ml por cada tubo de muestra. Los criotubos se identificaron con el número de laboratorio correspondiente, en el lateral y en la tapa para mayor seguridad. A continuación, los

criotubos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. En relación al número asignado en el laboratorio, se utilizó una nomenclatura alfanúmerica, que evita posibles errores con respecto a la nomenclatura numérica de 9 dígitos [340].

La extracción de ADN se realizó en un laboratorio exclusivo para ese uso, minimizando el riesgo de contaminación de las muestras. El material empleado fue estéril y durante todo el proceso se utilizaron puntas con filtro. El proceso de extracción automático minimiza el riesgo de transferencias de tubo a tubo, además de incluir un sistema de código de barras, que permite la identificación constante de las muestras durante todo el proceso, debido a que el software del equipo obliga a hacer varias revisiones de identificación de las mismas en varios puntos. Por tanto, el riesgo de posibles confusiones en la identificación de las muestras es prácticamente nulo.

Una vez extraídas las muestras, se evaluó su rendimiento mediante espectrofotometría. Si la concentración de DNA obtenida fue inferior a  $20\text{ ng}/\mu\text{l}$ , se repitió la extracción. Se han utilizado pipetas automáticas destinadas únicamente a la cuantificación de DNA y el uso de puntas estériles con filtro durante todo el proceso.

A continuación, las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en cajas identificadas con la serie correspondiente al número de laboratorio asignado para cada muestra. Para evitar ciclos de congelación y descongelación de las muestras se planificó con antelación el día de trabajo, anotando las muestras a descongelar. Por tanto, ese día se descongelaron únicamente las muestras con las que se iba a trabajar, intentando tenerlas el mínimo tiempo a temperatura ambiente, para evitar alterar la calidad de las mismas. Además, todas las muestras se mantuvieron en frío hasta su correcta descongelación, evitando así cambios bruscos de temperatura.

El siguiente paso fue la realización de la PCR; para ello se utilizó una campana de flujo laminar localizada en un laboratorio de postPCR distinto a aquel en el que se llevaron a cabo las extracciones de las muestras de ADN genómico, evitando así cualquier tipo de contaminación. Periódicamente, se realizaron esterilizaciones con luz UV. Durante todo el proceso de PCR, se emplearon pipetas automáticas destinadas únicamente para este fin, así como el uso de puntas con filtro y por supuesto se incluyeron controles de contaminación en todos los ensayos. Hay que tener en cuenta que todos los reactivos utilizados en este estudio fueron elaborados de forma comercial, evitando así los posibles errores de su preparación en el laboratorio.

Finalmente, como se ha citado previamente la interpretación de resultados se realizó en una plantilla para cada uno de los pacientes y controles que participaron en el estudio. Después de la primera interpretación se realizó una segunda de comprobación tanto para el grupo de beta-lactámicos (BL) como para el de antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Se comprobaron ambos resultados hasta corroborar la ausencia de discrepancia en las distintas lecturas. Una vez genotipados todos los individuos, los resultados fueron incorporados en una base de datos de un programa estadístico que también incluía otras variables de tipo clínico.

### *4.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO*

En este estudio, se han analizado 22 polimorfismos de 13 genes de citocinas en individuos con unas características clínicas muy bien definidas para ambos grupos, pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antibióticos beta-lactámicos (BL) y a antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

En este análisis bioinformático se llevó a cabo una descripción de todos los genes que participan en el estudio. Para ello, se realizó una búsqueda utilizando la plataforma GeneCard® (<http://www.genecards.org/>) (Figura 20), que es una base de datos de genes humanos que proporciona información genómica, proteómica, transcriptómica, genética y funcional. Ha sido desarrollada y mantenida por el *Crown Human Genome Center* y por el *Weizmann Institute of Science*.

The screenshot shows the GeneCards website interface. At the top, there is a navigation bar with links for Home, GeneCards Guide, Suite, Terms and Conditions, About Us, User Feedback, and Mirror sites. Below this is a search bar with a dropdown menu for 'keyword(s)' and a 'Search' button. The main content area is titled 'Explore GeneCards' and features a section for 'View Sample Gene' with the gene **TNFRSF10B** (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b). A grid of buttons allows users to explore different data sections for this gene, including Aliases, Drugs, Genome view, Pathways, Publications, Databases, Expression, Interactions, Paralogs, Summaries, Disorders, External search, IP/ Patents, Products, Transcripts, Domains, Function, Orthologs, Proteins, and Variants. Below this, there is a 'View Random Gene' section showing **ANPEP** (ananyl (membrane) aminopeptidase) with a category of 'Protein-coding' and a GIFTs Group of 'High'. The right sidebar contains 'News and Views' with links to 'Our Trendy Genes', 'New in V3.11', 'In our pipeline', 'Collaborations', 'Commentary', and 'Versions'.

Figura 20. Página de inicio de GeneCard.

Al llevar a cabo la búsqueda de un gen concreto (Figura 21), la página aporta mucha información acerca de ese gen, la proteína codificada por el gen, su expresión, las funciones y rutas metabólicas en las que participa, y una serie de enlaces directos a otras bases de datos. Además, la página permite determinar la localización cromosómica de ese gen concreto y la hebra en la que se encuentra codificado. Este último dato resulta de gran interés para determinar la posición del polimorfismo, ya que en la mayoría de los casos las bases de datos proporcionan la secuencia de la hebra molde (sentido 5' → 3').

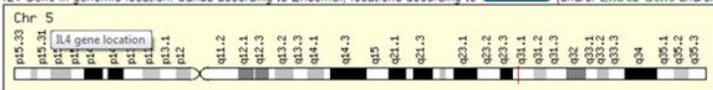
<p>Jump to Section...</p> <p><b>Summaries for IL4 gene</b></p> <p>(According to <a href="#">Entrez Gene</a>, <a href="#">Tocris Bioscience</a>, <a href="#">Wikipedia's Gene Wiki</a>, <a href="#">PharmGKB</a>, <a href="#">UniProtKB/Swiss-Prot</a>, and/or <a href="#">UniProtKB/TrEMBL</a>) <a href="#">About This Section</a></p>	<p><b>Entrez Gene summary for IL4 Gene:</b></p> <p>The protein encoded by this gene is a pleiotropic cytokine produced by activated T cells. This cytokine is a ligand for interleukin 4 receptor. The interleukin 4 receptor also binds to IL13, which may contribute to many overlapping functions of this cytokine and IL13. STAT6, a signal transducer and activator of transcription, has been shown to play a central role in mediating the immune regulatory signal of this cytokine. This gene, IL3, IL5, IL13, and CSF2 form a cytokine gene cluster on chromosome 5q, with this gene particularly close to IL13. This gene, IL13 and IL5 are found to be regulated coordinately by several long-range regulatory elements in an over 120 kilobase range on the chromosome. Two alternatively spliced transcript variants of this gene encoding distinct isoforms have been reported. (provided by RefSeq, Jul 2008)</p> <p><b>GeneCards Summary for IL4 Gene:</b></p> <p>IL4 (interleukin 4) is a protein-coding gene. Diseases associated with IL4 include <a href="#">vernal conjunctivitis</a>, and <a href="#">transient acantholytic dermatosis</a>, and among its <a href="#">related super-pathways</a> are <a href="#">MIF Mediated Glucocorticoid Regulation and Allograft rejection</a>. GO annotations related to this gene include <a href="#">growth factor activity</a> and <a href="#">interleukin-4 receptor binding</a>.</p> <p><b>UniProtKB/Swiss-Prot: IL4_HUMAN_P05112</b></p> <p><b>Function:</b> Participates in at least several B-cell activation processes as well as of other cell types. It is a costimulator of DNA-synthesis. It induces the expression of class II MHC molecules on resting B-cells. It enhances both secretion and cell surface expression of IgE and IgG1. It also regulates the expression of the low affinity Fc receptor for IgE (CD23) on both lymphocytes and monocytes</p> <p><b>Gene Wiki entry for IL4 (Interleukin 4) Gene</b></p>
<p><b>Genomic Views for IL4 gene</b></p> <p>(According to <a href="#">GeneLoc</a> and/or <a href="#">HGNC</a>, and/or <a href="#">Entrez Gene (NCBI build37)</a>, and/or <a href="#">mRBase</a>, Genomic Views according to <a href="#">UCSC (hg19)</a> and <a href="#">Ensembl (release 73)</a>, <a href="#">Regulatory elements</a> and <a href="#">Epigenetics data</a> according to <a href="#">QIAGEN</a>, <a href="#">SABiosciences</a>, and/or <a href="#">SwitchGear Genomics</a>)</p>	<p><b>Genomic Location:</b></p> <p>Genomic View: <a href="#">UCSC Golden Path with GeneCards custom track</a></p> <p>Entrez Gene cytogenetic band: <a href="#">5q31.1</a> Ensembl cytogenetic band: <a href="#">5q31.1</a> HGNC cytogenetic band: <a href="#">5q23-q31</a></p> <p>IL4 Gene in genomic location: bands according to <a href="#">Ensembl</a>, locations according to <a href="#">GeneLoc</a> (and/or <a href="#">Entrez Gene</a> and/or <a href="#">Ensembl</a> if different)</p>  <p><a href="#">GeneLoc information about chromosome 5</a> <a href="#">GeneLoc Exon Structure</a></p> <p>GeneLoc location for GC05P132009: <a href="#">view genomic region</a> (about GC identifiers)</p> <p>Start: 132,009,373 bp from pter End: 132,018,368 bp from pter Size: 8,996 bases Orientation: plus strand</p>

Figura 21. En la figura se muestra el resultado de la búsqueda de *IL4*. Sólo aparece una pequeña parte de toda la información que proporciona la página.

Esta búsqueda se ha llevado a cabo para cada uno de los 13 genes implicados en el estudio, por tanto a través de esta plataforma bioinformática, se ha obtenido una detallada descripción de cada uno de ellos.

## ESTUDIO ESTADÍSTICO DE ASOCIACIÓN ENTRE PACIENTES Y CONTROLES

### ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para realizar el análisis descriptivo de la población estudiada se ha utilizado el programa estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois). Se han calculado las medidas de tendencia central media o mediana (según las características de la variable) en el caso de las variables cuantitativas, previo análisis de la distribución de la población para comprobar la normalidad y, en el caso de las variables cualitativas, se calculó el porcentaje para los diversos grupos establecidos.

## ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

Se realizó un análisis estadístico comparando las diferentes distribuciones alélicas y genotípicas de los distintos polimorfismos entre pacientes y controles con el fin de establecer una posible asociación. Para el análisis de las variables cualitativas se empleó la prueba de  $X^2$  (chi-cuadrado), y las pruebas exactas de Fisher y Montecarlo para  $10^6$  interacciones. Se estableció un nivel de significación a partir de  $p < 0,05$ . En todos los casos se expresó la Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95%. Para el análisis combinado de variables cualitativas y cuantitativas se aplicó la ANOVA previa comparación de la homogeneidad de Varianzas o la pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis según la normalidad de la distribución de la muestra. Mediante la corrección de Bonferroni se tuvieron en cuenta los posibles sesgos en el análisis de comparaciones múltiples. A partir de este punto, en todos aquellos casos en los que se encontró una asociación significativa, se llevó a cabo una regresión logística binaria utilizando el programa estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois), en base a la edad y el sexo, con el objetivo de establecer la posible influencia de estas dos variables en la significación obtenida. Es decir, determinar que peso tiene la edad y el sexo en todas aquellas diferencias significativas encontradas en el análisis estadístico. Se estimó el riesgo de las diferencias significativas mediante el cálculo de la OR, con un intervalo de confianza al 95%. Otro parámetro que se ha calculado es el poder estadístico de la asociación encontrada mediante el uso de una plataforma en línea <http://statpages.org/proppowr.html> (Statistical Methods for Rates and Proportions por Joseph L. Fleiss (Segunda Edición., 1981, John Wiley & Sons, NY, capítulo 3). Inicialmente se realizó un primer cálculo del poder estadístico para establecer el tamaño óptimo de la población a estudio y, posteriormente, se realizó un segundo análisis del poder estadístico sobre cada una de las asociaciones obtenidas. Para finalizar, se calculó un último parámetro en aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas, la probabilidad de encontrar un resultado falso positivo (FPRP), utilizando el método descrito por Wacholder y cols. [341].

## COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

Con la finalidad de poder establecer las posibles asociaciones en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los distintos grupos de pacientes, se realizó la comparación de las frecuencias genotípicas mediante un test de contingencia tipo  $X^2$  (chi-

cuadrado). También se tuvo en cuenta el análisis del equilibrio de Hardy-Weimberg mediante una prueba  $\chi^2$ . Para realizar este análisis comparativo entre las frecuencias alélicas y genotípicas se utilizó la plataforma estadística en línea SHEsis [342] (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>).

### ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS Y DIPLOTIPOS

Un haplotipo (del griego: ἁπλοῦς, haploûs, "único, simple"), es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede estar compuesto por varios polimorfismos localizados en el mismo locus, o en distintos loci del mismo cromosoma.

En un segundo significado, un haplotipo es un conjunto de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en un cromosoma particular que están estadísticamente asociados, el conjunto de los genes contenidos en uno solo de los cromosomas de un par, mientras que un diplotipo es la pareja de los dos haplotipos o dotaciones haploides de un individuo diploide determinado.

Como ya se ha visto previamente, en este estudio se ha realizado además del análisis de polimorfismos simples, el análisis de haplotipos y diplotipos para determinados genes, concretamente *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TGFB* y *TNFA*. Para determinar la posible asociación de los haplotipos y diplotipos de estos genes con las variables clínicas de los pacientes, se han utilizado dos programas estadísticos ya mencionados hasta el momento.

En primer lugar, la plataforma estadística en línea SHEsis [342] (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>), que permite comparar las frecuencias haplotípicas y su distribución entre controles y pacientes.

En segundo lugar, el programa estadístico SPSS 18.0 (IBM, Chicago, Illinois) permitió determinar la posible influencia que puede tener un diplotipo en las diferentes patologías a estudio.



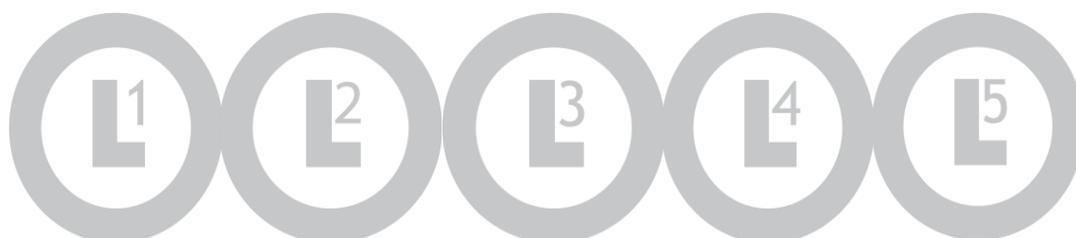


VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# RESVLTADOS

---





## 5. RESULTADOS

En este estudio se incluyeron un total de 443 individuos, 260 controles y 183 pacientes con hipersensibilidad a BL o a AINE. Los criterios de selección de ambos grupos se describen en el apartado 4.1 (población estudiada) de la sección de Material y Métodos. A lo largo del estudio, se han caracterizado variables tanto fenotípicas como genotípicas, 103 en la población con hipersensibilidad a BL y 160 en la población con hipersensibilidad a AINE, lo que supone el manejo y análisis de un total de 59.366 datos.

### DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN CONTROL

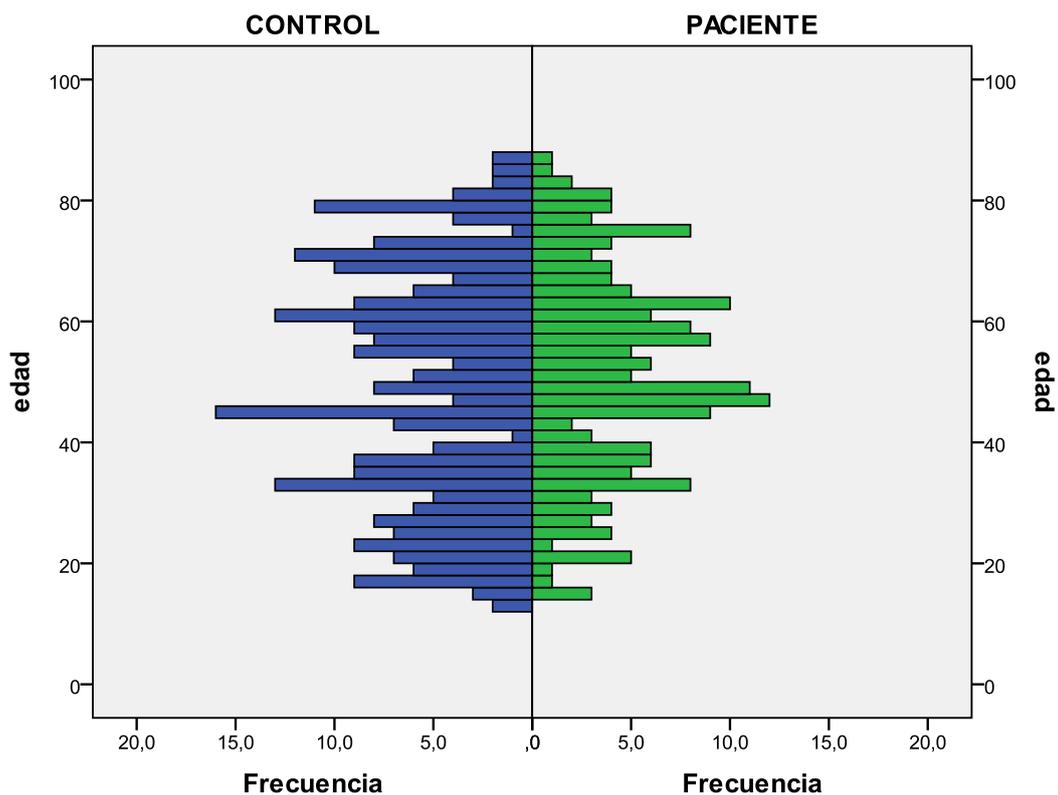
Se incluyeron un total de 260 individuos en el grupo control, 104 individuos control en el grupo de hipersensibilidad a los BL y 156 en el grupo de hipersensibilidad a los AINE. El tamaño muestral se calculó a través del poder estadístico. La selección de la población control en ambos grupos se basó en una rigurosa evaluación clínica por parte de los facultativos del Servicio de Inmunoalergia del Hospital Universitario de Salamanca descrita en el apartado 4.1 (población estudiada) de la sección de Material y Métodos.

La mediana de edad de la población global fue de 48 años (RI: 32) (Figura 22), siendo para el grupo control de BL de 43 años (RI: 33) y de 50 años (RI: 33) para el grupo control de AINE. La distribución por sexos fue de un 36% para el sexo masculino frente a un 64% para el sexo femenino (Figura 23); este ligero predominio del sexo femenino también se observa en la población control para el grupo BL (67% frente a un 33%) y en la población control para el grupo AINE (62% frente a un 38%) (Tabla 8). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

En relación a los niveles medios de IgE en la población control global fue de 94,31 kUI/L (DE: 163,04), siendo los valores ligeramente más elevados en la población de controles de BL en relación con la población de controles de AINE; 98,93 kUI/L (DE: 139,22) frente a 91,62 kUI/L (DE: 175,82) (Tabla 8). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p=0,7$ ).

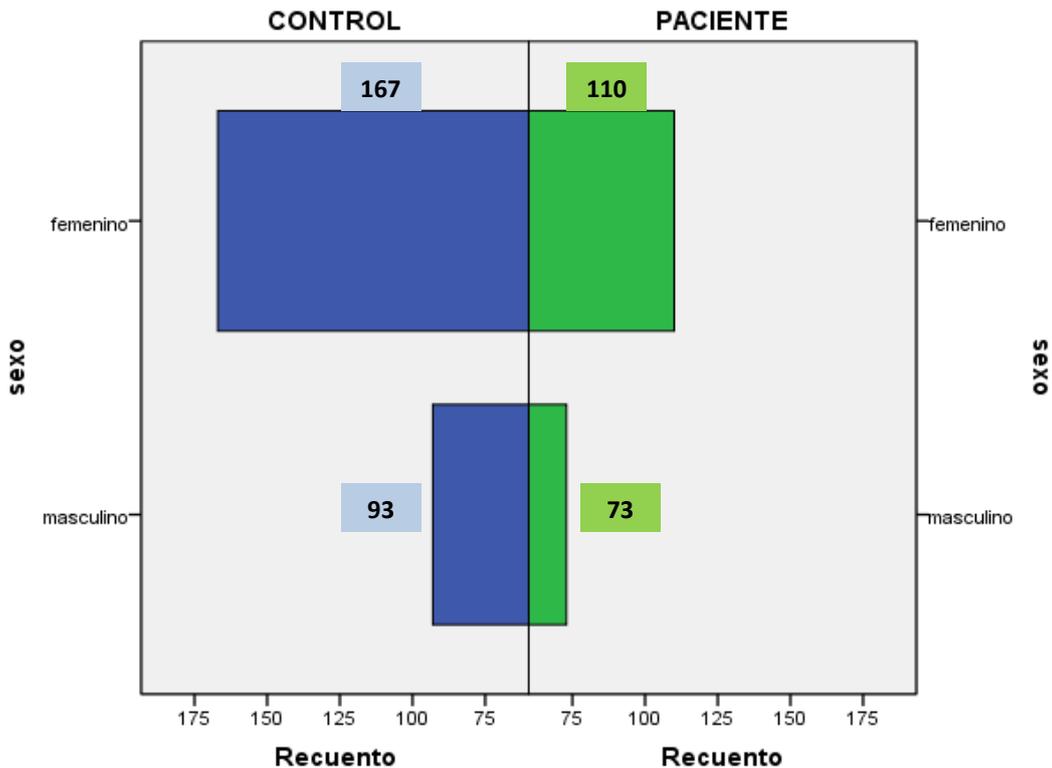
## DESCRIPCIÓN DE LOS PACIENTES

En el estudio se han incluido 202 pacientes clasificados en dos grupos según los protocolos diagnósticos de reacciones de hipersensibilidad a BL y a AINE establecidos por los facultativos del Servicio. La mediana de edad para la población global fue de 49 años (RI: 26) (Figura 22), con una distribución de sexos a favor del sexo femenino (60%, 110 mujeres frente a 73 hombres) (Figura 23) y este predominio se mantuvo en los pacientes alérgicos a BL (58% de mujeres frente a un 42% de varones) y en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (63% de mujeres frente a un 37% de varones) (Tabla 8). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.



**Figura 22.** Distribución por edades de los individuos del grupo control y de los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antibióticos beta-lactámicos (BL) y a antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

El nivel medio de IgE en la población global de pacientes fue de 181,66 kUI/L (DE: 301,04), pero se observaron niveles medios de IgE más elevados en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a AINE frente a los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL, como puede observarse en la tabla 8.



**Figura 23.** Distribución por sexos de los individuos del grupo control y pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antibióticos beta-lactámicos (BL) y a antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

En este análisis, se han incluido, además de sexo, edad y niveles de IgE diversas variables clínicas que se han tenido en cuenta a lo largo del estudio para los diferentes grupos. Estas variables clínicas han sido presencia o no de: poliposis, asma, tríada del AAS (cuando los pacientes presentaban asma, poliposis nasal e hipersensibilidad al AAS y/u otros AINE), pruebas cutáneas positivas a aeroalérgenos comunes y sensibilización alérgica, separando claramente aquellos individuos sensibilizados a uno de los grupos (pólenes, ácaros, hongos o epitelios) de la batería de aeroalérgenos comunes utilizada en

el estudio (monosensibilizados) de aquellos sensibilizados a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados).

**Tabla 8.** Análisis descriptivo de la población global y análisis individual en cada uno de los grupos de pacientes con hipersensibilidad a BL e hipersensibilidad a AINE incluidos en el estudio.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO	POBLACIÓN GLOBAL		POBLACIÓN BL		POBLACIÓN AINE	
	Controles N=260	Pacientes N=183	Controles N=104	Pacientes N=98	Controles N=156	Pacientes N=85
Sexo	♂♀ 36%, 64%	♂♀ 40%, 60%	♂♀ 33%, 67%	♂♀ 42%, 58%	♂♀ 38%, 62%	♂♀ 37%, 63%
Edad	Med: 48 RI: 32	Med: 49 RI: 26	Med: 43 RI: 33	Med: 49 RI: 29	Med: 50 RI:33	Med: 49 RI: 21
IgE	$\bar{X}$ : 94,31 DE: 163,04	$\bar{X}$ : 181,66 DE: 301,04	$\bar{X}$ : 98,94 DE: 139,22	$\bar{X}$ : 165,83 DE: 342,91	$\bar{X}$ : 91,62 DE: 175,82	$\bar{X}$ : 206,43 DE: 232,55
p (niveles IgE)	p<0,001		p=0,1		p<0,001	

Med: mediana; RI: rango intercuartílico; DE: desviación estándar

## ANÁLISIS GENOTÍPICO

Se han calculado las frecuencias alélicas y genotípicas para la población control y para los pacientes de los grupos de reacciones de hipersensibilidad a BL y de reacciones de hipersensibilidad a AINE, obtenidas en el análisis de los polimorfismos que se detallan a continuación en las tablas 9 y 10.

En los siguientes apartados se detalla la estadística descriptiva univariante, el análisis de los 22 polimorfismos de los 13 genes de citocinas analizados, así como el análisis multivariante y el estudio de haplotipos y diplotipos en cada uno de los grupos que se han incluido en el estudio, en los individuos con reacciones de hipersensibilidad a BL y sus controles, en individuos con reacciones de hipersensibilidad a AINE y sus controles, así como del grupo comparativo que incluye conjuntamente los pacientes de ambos grupos.

**Tabla 9.** Distribución de frecuencias alélicas en la población control y en los pacientes de los grupos BL y AINE.

GEN	Cambio	Controles BL	Pacientes BL	Controles AINE	Pacientes AINE
<i>IL1A</i>	-889 C>T	C: 0,91 T: 0,09	C: 0,86 T: 0,14	C: 1,00 T: 0,00	C: 0,98 T: 0,02
<i>IL1B</i>	-511 C>T	C: 0,68 T: 0,32	C: 0,73 T: 0,27	C: 0,70 T: 0,30	C: 0,69 T: 0,31
<i>IL1B</i>	3962 C>T	C: 0,77 T: 0,23	C: 0,82 T: 0,18	C: 0,83 T: 0,17	C: 0,76 T: 0,24
<i>IL1R1</i>	<i>pst1</i> C>T	C:0,63 T: 0,36	C: 0,67 T: 0,33	C:0,67 T: 0,33	C:0,73 T: 0,27
<i>IL1RN</i>	<i>mspa1</i> T>C	C: 0,24 T:0,76	C: 0,21 T: 0,79	C: 0,24 T: 0,76	C: 0,32 T: 0,68
<i>IL2</i>	-330 T>G	G: 0,34 T: 0,66	G: 0,34 T: 0,66	G: 0,32 T: 0,68	G: 0,33 T: 0,67
<i>IL2</i>	166 G>T	G:0,74 T: 0,26	G: 0,73 T: 0,27	G:0,72 T: 0,28	G:0,64 T: 0,26
<i>IL4</i>	-1098 T>G	G: 0,05 T: 0,95	G: 0,06 T: 0,94	G: 0,07 T: 0,93	G: 0,14 T: 0,86
<i>IL4</i>	-589 C>T	C: 0,88 T: 0,12	C: 0,84 T: 0,16	C: 0,86 T: 0,14	C: 0,74 T: 0,26
<i>IL4</i>	-33 C>T	C: 0,91 T: 0,09	C: 0,85 T: 0,15	C: 0,86 T: 0,14	C: 0,82 T: 0,18
<i>IL4R</i>	1092 A>G	A: 0,75 G: 0,25	A: 0,79 G: 0,21	A: 0,77 G: 0,23	A: 0,81 G: 0,19
<i>IL6</i>	-174 G>C	C: 0,35 G: 0,65	C: 0,33 G: 0,67	C: 0,38 G: 0,62	C: 0,30 G: 0,70
<i>IL6</i>	nt565 G>A	A: 0,32 G: 0,68	A: 0,31 G: 0,69	A: 0,37 G: 0,63	A: 0,27 G: 0,73
<i>IL10</i>	-592 C>A	A: 0,25 C: 0,75	A: 0,28 C: 0,72	A: 0,31 C: 0,69	A: 0,30 C: 0,70
<i>IL10</i>	-819 C>T	C:0,71 T: 0,29	C:0,70 T: 0,30	C:0,67 T: 0,33	C:0,69 T: 0,31
<i>IL10</i>	-1082 A>G	A: 0,62 G:0,38	A: 0,63 G:0,37	A: 0,67 G:0,33	A: 0,67 G:0,33
<i>IL12B</i>	-1188 A>C	A: 0,62 C: 0,38	A: 0,79 C: 0,21	A: 0,83 C: 0,17	A: 0,73 C: 0,27
<i>IFNG</i>	874 A>T	A: 0,62 T: 0,38	A: 0,53 T: 0,47	A: 0,65 T: 0,35	A: 0,54 T: 0,46
<i>TGFB1</i>	c10 T>C	C: 0,43 T: 0,57	C: 0,43 T: 0,57	C: 0,41 T: 0,59	C: 0,49 T: 0,51
<i>TGFB1</i>	c25 G>C	C: 0,05 G: 0,95	C: 0,12 G: 0,88	A: 0,25 G: 0,75	C: 0,06 G: 0,94
<i>TNFA</i>	-238 G>A	A: 0,05 G: 0,95	A: 0,05 G: 0,95	A: 0,07 G: 0,93	A: 0,08 G: 0,92
<i>TNFA</i>	-308 G>A	A: 0,12 G: 0,88	A: 0,11 G: 0,89	A: 0,06 G: 0,94	A: 0,25 G: 0,75

**Tabla 10.** Distribución de frecuencias genotípicas en la población control y en los pacientes de los grupos BL y AINE.

GEN	Cambio	Controles BL	Pacientes BL	Controles AINE	Pacientes AINE
<i>IL1A</i>	-889 C>T	CC: 0,88 CT: 0,06 TT: 0,06	CC: 0,84 CT: 0,05 TT: 0,11	CC: 1,00 CT: 0,00	CC: 0,97 CT: 0,03
<i>IL-1B</i>	-511 C>T	CC: 0,52 CT: 0,32 TT: 0,16	CC: 0,54 CT: 0,38 TT: 0,08	CC: 0,48 CT: 0,44 TT: 0,08	CC: 0,48 CT: 0,41 TT: 0,11
<i>IL-1B</i>	3962 C>T	CC: 0,61 CT: 0,32 TT: 0,07	CC: 0,73 CT: 0,20 TT: 0,07	CC: 0,70 CT: 0,26 TT: 0,04	CC: 0,57 CT: 0,40 TT: 0,03
<i>IL-1R1</i>	<i>pst1</i> C>T	CC:0,40 CT: 0,46 TT: 0,14	CC:0,44 CT: 0,45 TT: 0,11	CC:0,45 CT: 0,44 TT: 0,11	CC:0,54 CT: 0,39 TT: 0,07
<i>IL-1RN</i>	<i>mspa1</i> T>C	CC: 0,06 CT: 0,36 TT: 0,58	CC: 0,06 CT: 0,29 TT: 0,65	CC: 0,05 CT: 0,38 TT: 0,57	CC: 0,07 CT: 0,50 TT: 0,43
<i>IL-2</i>	-330 T>G	GG: 0,11 GT: 0,46 TT: 0,43	GG:0,12 GT: 0,44 TT: 0,44	GG: 0,10 GT: 0,43 TT: 0,47	GG: 0,15 GT: 0,36 TT: 0,49
<i>IL-2</i>	166 G>T	GG: 0,57 GT: 0,35 TT: 0,08	GG: 0,54 GT: 0,38 TT: 0,08	GG:0,51 GT: 0,41 TT: 0,08	GG: 0,44 GT: 0,40 TT: 0,16
<i>IL-4</i>	-1098 T>G	GG: 0,00 GT: 0,11 TT: 0,89	GG:0,01 GT: 0,09 TT: 0,90	GG: 0,03 GT: 0,08 TT: 0,89	GG: 0,00 GT: 0,27 TT: 0,73
<i>IL-4</i>	-589 C>T	CC: 0,77 CT: 0,22 TT: 0,01	CC: 0,70 CT: 0,29 TT: 0,01	CC: 0,75 CT: 0,21 TT: 0,04	CC: 0,51 CT: 0,47 TT: 0,02
<i>IL-4</i>	-33 C>T	CC: 0,83 CT: 0,16 TT: 0,01	CC: 0,72 CT: 0,26 TT: 0,02	CC: 0,75 CT: 0,22 TT: 0,03	CC: 0,67 CT: 0,29 TT: 0,04
<i>IL-4R</i>	1092 A>G	AA: 0,58 AG: 0,37 GG: 0,05	AA: 0,65 AG: 0,29 GG: 0,06	AA: 0,60 AG: 0,33 GG: 0,07	AA: 0,64 AG: 0,34 GG: 0,02
<i>IL-6</i>	-174 G>C	CC: 0,12 CG: 0,46 GG: 0,42	CC: 0,12 CG: 0,42 GG: 0,46	CC: 0,15 CG: 0,46 GG: 0,39	CC: 0,06 CG: 0,48 GG: 0,46
<i>IL-6</i>	nt565 G>A	AA: 0,10 AG: 0,45 GG: 0,45	AA: 0,10 AG: 0,42 GG: 0,48	AA: 0,14 AG: 0,46 GG: 0,40	AA: 0,04 AG: 0,47 GG: 0,49
<i>IL-10</i>	-592 C>A	AA: 0,08 AC: 0,35 CC: 0,57	AA: 0,07 AC: 0,42 CC: 0,51	AA: 0,12 AC: 0,38 CC: 0,50	AA: 0,02 AC: 0,55 CC: 0,43
<i>IL-10</i>	-819 C>T	CC: 0,56 CT: 0,31 TT: 0,13	CC: 0,52 CT: 0,35 TT: 0,13	CC: 0,49 CT: 0,36 TT: 0,15	CC: 0,43 CT: 0,53 TT: 0,04
<i>IL-10</i>	-1082 A>G	AA: 0,41 AG: 0,42 GG: 0,17	AA: 0,41 AG: 0,44 GG: 0,15	AA: 0,46 AG: 0,43 GG: 0,11	AA: 0,36 AG: 0,60 GG: 0,04
<i>IL 12B</i>	-1188 A>C	AA: 0,60 AC: 0,33 CC: 0,07	AA: 0,65 AC: 0,29 CC: 0,06	AA: 0,71 AC: 0,25 CC: 0,04	AA: 0,54 AC: 0,38 CC: 0,08
<i>IFN-G</i>	874 A>T	AA: 0,44 AT: 0,35 TT: 0,21	AA: 0,40 AT: 0,27 TT: 0,33	AA: 0,51 AT: 0,27 TT: 0,22	AA: 0,32 AT: 0,45 TT: 0,23

GEN	Cambio	Controles BL	Pacientes BL	Controles AINE	Pacientes AINE
<i>TGFB-1</i>	c10 T>C	CC: 0,21 CT: 0,44 TT: 0,35	CC: 0,20 CT: 0,46 TT: 0,34	CC: 0,18 CT: 0,47 TT: 0,35	CC: 0,22 CT: 0,54 TT: 0,24
<i>TGFB-1</i>	c25 G>C	CC: 0,00 CG: 0,09 GG: 0,91	CC: 0,03 CG: 0,18 GG: 0,79	CC: 0,04 CG: 0,16 GG: 0,80	CC: 0,01 CG: 0,09 GG: 0,90
<i>TNF-A</i>	-238 G>A	AA: 0,00 AG: 0,11 GG: 0,90	AA: 0,01 AG: 0,08 GG: 0,91	AA: 0,01 AG: 0,14 GG: 0,85	AA: 0,01 AG: 0,14 GG: 0,85
<i>TNF-A</i>	-308 G>A	AA: 0,04 AG: 0,15 GG: 0,81	AA: 0,03 AG: 0,17 GG: 0,80	AA: 0,01 AG: 0,10 GG: 0,89	AA: 0,06 AG: 0,38 GG: 0,56

## 5.1 GRUPO PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL

### 5.1.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Como ya se ha citado previamente, este grupo incluyó un total de 202 individuos, repartidos entre 104 controles y 98 pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL. Los criterios de selección de este grupo se describen en el apartado 4.1 (población estudiada) de la sección de Material y Métodos.

Los 98 pacientes alérgicos a BL presentaban antecedentes de reacción inmediata con un antibiótico beta-lactámico e hipersensibilidad inmediata demostrada mediante el estudio alergológico. En estos pacientes, se han estudiado una serie de características clínicas como el tipo de reacción presentada (urticaria, anafilaxia, exantema, otra), así como el antibiótico BL responsable de la hipersensibilidad inmediata (Tabla 11).

En relación a los 104 controles del estudio de BL, fueron estudiados por reacción adversa a un antibiótico beta-lactámico con resultado negativo en el estudio y con tolerancia comprobada a este tipo de antibióticos. Los valores estadísticos de los controles en relación a las características clínicas estudiadas también se muestran en la tabla 11.

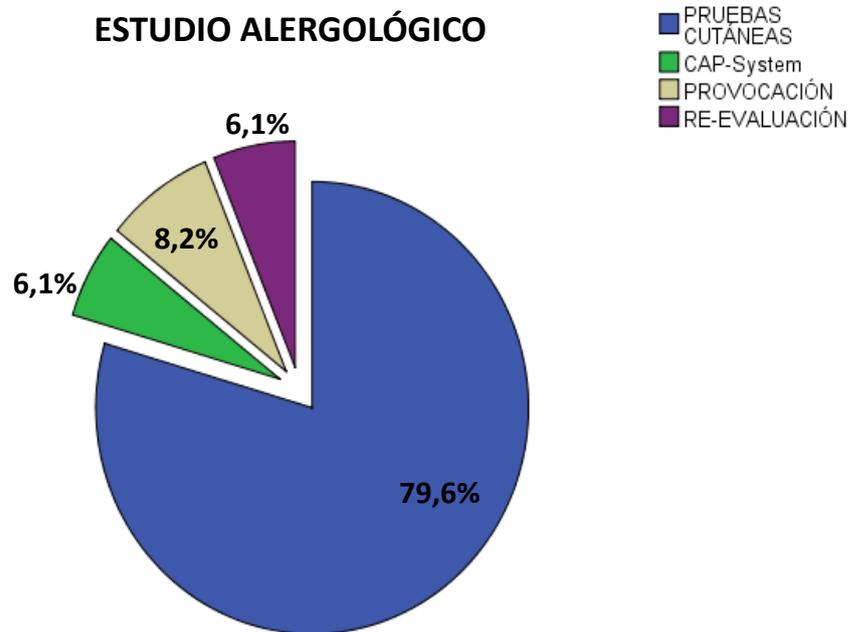
Un 27,3% (27) de los controles BL presentaban pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes. De los 27 controles BL con pruebas cutáneas positivas, 14 de

ellos presentaban sensibilización a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados) y los 13 restantes estaban sensibilizados a varios grupos de aeroalérgenos (polisensibilizados).

**Tabla 11.** Valores de distribución de características clínicas como el tipo de reacción y el fármaco implicado en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a BL y sus controles.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PACIENTES BL (N=98)	CONTROLES BL (N=104)	P-Valor
<b><u>Tipo de reacción</u></b>			<b>&lt;0,001</b>
✓ <b>Urticaria</b>	54,1% (53)	30,8% (32)	
✓ <b>Anafilaxia</b>	32,5% (32)	1% (1)	
✓ <b>Exantema</b>	9,4% (9)	28,8% (30)	
✓ <b>Otra</b>	4% (4)	39,4% (41)	
<b><u>Antibiótico BL implicado</u></b>			<b>&lt;0,001</b>
• <b>BP</b>	3,1% (3)	29,8% (31)	
• <b>Amoxicilina</b>	79,5% (78)	55,8% (58)	
• <b>Cloxacilina</b>	2,1% (2)	1,9% (2)	
• <b>Cefalosporinas</b>	9,2% (9)	5,7% (6)	
• <b>Amoxicilina-clavulánico</b>	3,1% (3)	1,9%(2)	
• <b>Desconocido</b>	3% (3)	4,9% (5)	

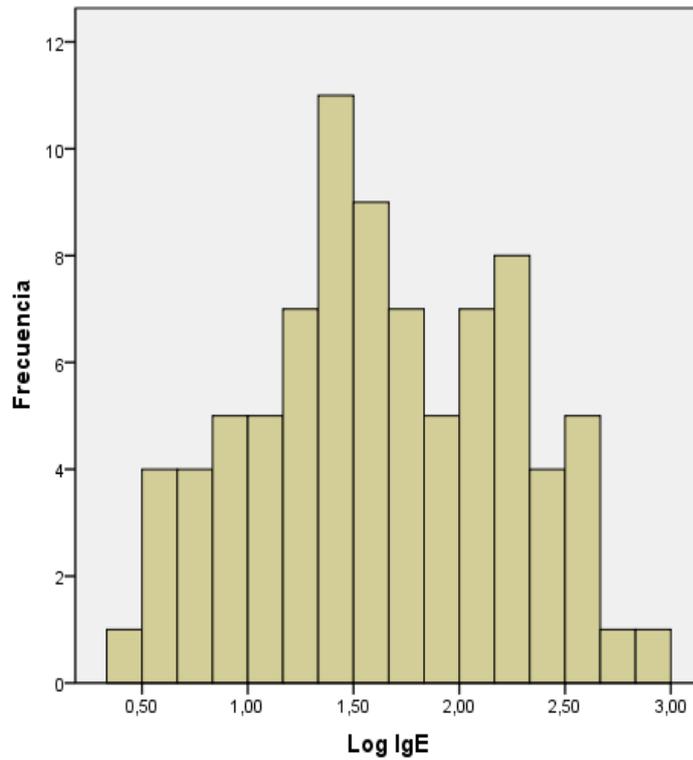
El estudio alergológico de los pacientes con hipersensibilidad a BL muestra que en el 79,6% de los casos el diagnóstico se hizo mediante pruebas cutáneas; ya fueran intraepidérmicas (17,3%) o intradérmicas (62,3%); en un 6,1% se hizo mediante la determinación de IgE específica para BL (CAP-System) y con resultado negativo en las pruebas cutáneas; en un 8,2% de los casos se realizó la prueba de provocación y en 6,1% el diagnóstico se realizó durante la reevaluación de los pacientes a las tres semanas. La figura 24 muestra el estudio alergológico de los pacientes con hipersensibilidad a BL.



**Figura 24.** Valores de distribución en el estudio alergológico de los pacientes con hipersensibilidad a BL.

La mediana de edad para los controles fue de 43 años (RI: 33) y para los pacientes de 49 años (RI: 29) (Tabla 8). La distribución por sexos también se ve reflejada en la tabla 8, con un ligero predominio del sexo femenino tanto en controles como pacientes (67% y 58%) respectivamente frente al sexo masculino (33% en controles y 42% en pacientes).

Los valores medios de los niveles de IgE total para controles fueron de 98,94 kUI/L (DE: 139,22) frente a los pacientes con hipersensibilidad a BL cuyos valores medios alcanzaron niveles de 165,83 kUI/L (DE: 342,91) (Tabla 8). No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles medios de IgE en controles y pacientes con hipersensibilidad a BL ( $p=0,098$ ). En la figura 25 se muestra la distribución de los niveles de IgE expresado en logaritmo en base 10 en los pacientes con hipersensibilidad a BL.



**Figura 25.** Distribución de los valores de niveles de IgE en pacientes con hipersensibilidad a BL (expresado en logaritmo en base 10).

Al comparar los niveles de IgE en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a BL con las distintas variables clínicas incluidas en el estudio, identificamos una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,009$ ) con los pacientes sensibilizados a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados), obteniéndose unos niveles medios de IgE de 252,73 kUI/L (DE: 401,57). En concreto, esta asociación se ha visto en pacientes sensibilizados a pólenes y ácaros, encontrando unos niveles medios de IgE de 366,67 kUI/L (DE: 512,70). No se observaron diferencias estadísticamente significativas con las variables asma y monosensibilización respecto a los niveles de IgE.

### 5.1.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL

Tras realizar el análisis de los 22 polimorfismos entre pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL con relación a los controles, solamente se identificaron diferencias estadísticamente significativas en el caso del polimorfismo c25 *TGFB1* (Tabla 12).

En este caso, encontramos que el alelo C del polimorfismo en el codón 25 del gen *TGFB1* fue más frecuente en los pacientes (11,8%) que en los controles (4,5%) con una  $p=0,029$ ; OR: 2,84; IC 95% (1,07 – 7,51). No se observaron diferencias significativas al estudiar las frecuencias genotípicas.

**Tabla 12.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL.

SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)	SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)
<b>pst1 1970 <i>IL1R</i></b>	0,55	0,83	<b>c25 <i>TGFB1</i></b>	<b>0,029*</b>	0,11
<b>3962 <i>IL1B</i></b>	0,17	0,18	<b>-1098 <i>IL4</i></b>	0,88	0,56
<b>-511 <i>IL1B</i></b>	0,30	0,22	<b>-590 <i>IL4</i></b>	0,24	0,44
<b>-889 <i>IL1A</i></b>	0,36	0,69	<b>-33 <i>IL4</i></b>	0,08	0,21
<b>874 <i>IFNG</i></b>	0,33	0,49	<b>-330 <i>IL2</i></b>	0,99	0,98
<b>-1188 <i>IL12</i></b>	0,54	0,80	<b>166 <i>IL2</i></b>	0,71	0,93
<b>-1902 <i>IL4RA</i></b>	0,30	0,35	<b>-174 <i>IL6</i></b>	0,65	0,79
<b>1110 <i>IL1RA</i></b>	0,41	0,52	<b>nt565 <i>IL6</i></b>	0,69	0,86
<b>-308 <i>TNFA</i></b>	0,95	0,94	<b>-1082 <i>IL10</i></b>	0,75	0,86
<b>-238 <i>TNFA</i></b>	0,95	0,50	<b>-819 <i>IL10</i></b>	0,51	0,61
<b>c10 <i>TGFB1</i></b>	0,95	0,98	<b>-592 <i>IL10</i></b>	0,69	0,82

\*p-Valor < 0,05

### NIVELES DE IgE TOTAL

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre los pacientes con hipersensibilidad a BL y los controles con los niveles de IgE, sólo se identificaron diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo -1188 de *IL12*. Se encontró una asociación significativa

( $p=0,044$ ) con los niveles de IgE de los portadores del genotipo AA ( $\bar{X}$ : 119,76; DE: 217,98) para este polimorfismo con respecto a los del genotipo CC ( $\bar{X}$ : 54,58; DE: 43,26).

### PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS CON AEROALÉRGENOS COMUNES

En el análisis de los polimorfismos de citocinas en los pacientes con hipersensibilidad a BL se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos *pst1 1970 IL1R*, *874 IFNG* y *-33 IL4* tal como se muestra en la tabla 13.

En este estudio, encontramos que el alelo T del polimorfismo en posición 1970 del gen *IL1R* resultó más frecuente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos (45,7%) que en los controles (31,1%) con una  $p=0,014$ ; OR: 1,86; IC 95% (1,13 – 3,05). Con respecto a las frecuencias genotípicas, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,017$ ) en el genotipo TT, siendo más frecuente en los pacientes (23,9%) que en los controles (7,9%), lo que fue confirmado mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo,  $p=0,007$ ; OR: 5,23; IC 95% (1,59 – 17,21).

El alelo A en la posición 874 del *IFNG* se observó con más frecuencia en los pacientes con pruebas cutáneas positivas (71,4%) que en los controles (50%), con una  $p=0,027$ , OR: 2,50; IC 95% (1,09 – 5,68). No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas.

**Tabla 13.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de pacientes con pruebas cutáneas positivas.

SNP	FRECUENCIAS	PRUEBAS CUTÁNEAS + (Grupo BL) N=46
<b>pst1 1970 <i>IL1R</i></b>	P-Alélica	<b>0,014*</b>
	P-Genotípica	<b>0,017*</b>
<b>874 <i>IFNG</i></b>	P-Alélica	<b>0,027*</b>
	P-Genotípica	0,15
<b>-33 <i>IL4</i></b>	P-Alélica	<b>0,004*</b>
	P-Genotípica	<b>0,017*</b>

\*p-Valor < 0,05

En el caso del SNP en posición -33 del gen *IL4*, se encontró el alelo T con mayor frecuencia en los controles (16,8%) que en los pacientes con pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos (4,5%) con una  $p=0,004$ ; OR: 0,23; IC 95% (0,08 – 0,68). El análisis de las frecuencias genotípicas reflejó una mayor proporción del genotipo CT en los controles (28%) que en los pacientes (9,1%) ( $p=0,017$ ). Al ajustar por edad y por sexo, esta asociación se confirmó obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,005.

Para confirmar si estas diferencias encontradas se debían a la presencia de hipersensibilidad a BL o a la propia atopía se realizó un análisis confirmatorio dentro del grupo de pacientes de hipersensibilidad a BL entre la presencia y ausencia de pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos *pst1 1970 IL1R*, *874 IFNG* y *-33 IL4* coincidiendo con los que se detallan en la tabla 13. También se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,007$ ) en el polimorfismo *1902 IL4RA*, el genotipo GG resultó más frecuente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas (15,8%) que en los pacientes con pruebas cutáneas negativas (1,8%). Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,012; OR: 56,14; IC 95% (2,40 – 1131,39) (Tabla 14). Lo que confirma que estas asociaciones son debidas a la atopía.

**Tabla 14.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con presencia y ausencia de pruebas cutáneas positivas en pacientes con hipersensibilidad a BL.

SNP	p-Valor	FRECUENCIA (Alélica)	FRECUENCIA (Genotípica)
<b>pst1 1970 <i>IL1R</i></b>	Alélica: 0,08		
	Genotípica: <b>0,024*</b>		TT: 21,1% PC+/ 8,9% PC-
<b>874 <i>IFNG</i></b>	Alélica: <b>0,034*</b>	A: 65% PC+/ 44,4% PC-	
	Genotípica: 0,43		
<b>-33 <i>IL4</i></b>	Alélica: <b>0,038*</b>	T: 20,4% PC-/ 5,6% PC+	
	Genotípica: 0,11		
<b>1902 <i>IL4RA</i></b>	Alélica: 0,83		
	Genotípica: <b>0,007*</b>		GG: 15,8% PC+/ 1,8% PC-

\* $p$ -Valor < 0,05

PC += pruebas cutáneas positivas; PC -= pruebas cutáneas negativas

## SENSIBILIZACIÓN A UNO O VARIOS GRUPOS DE AEROALÉRGENOS

En el análisis de los pacientes sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados) y de los pacientes sensibilizados a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados) se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos que se muestran en la tabla 15, si bien el tamaño muestral era escaso.

**Tabla 15.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes monosensibilizados y polisensibilizados en el grupo de BL.

SNP	FRECUENCIAS	MONOSENSIBILIZACIÓN	POLISENSIBILIZACIÓN
		(a un único grupo de aeroalérgenos) N=27	(a más de un grupo de aeroalérgenos) N=19
<b>pst1 1970 IL1R</b>	P-Alélica	<b>0,018*</b>	0,18
	P-Genotípica	<b>0,002*</b>	0,29
<b>874 IFNG</b>	P-Alélica	0,26	<b>0,017*</b>
	P-Genotípica	0,61	0,09
<b>-33 IL4</b>	P-Alélica	<b>0,013*</b>	0,10
	P-Genotípica	<b>0,045*</b>	0,26

\*p-Valor < 0,05

La comparación de frecuencias del polimorfismo *pst1 1970 IL1R* en los pacientes sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos, resultó significativa tanto para frecuencias alélicas como genotípicas. Se obtuvo una  $p=0,018$ ; OR: 2,05; IC 95% (1,12 – 3,75) resultante de la comparación de la frecuencia del alelo T en pacientes monosensibilizados (48,1%) y en controles (31,1%) La comparación de las frecuencias genotípicas mostró una significación de  $p=0,002$  como consecuencia de la diferencia en la distribución del genotipo TT en los pacientes monosensibilizados (33,3%) respecto a los controles (7,9%). Poder 88% para un error  $\alpha=0,05$ , FPRP=1% para una probabilidad *a priori* del 10%. Al ajustar por edad y sexo se confirmó la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,004 con una OR: 6,34; IC 95% (1,82 – 22,03).

El análisis del polimorfismo -33 de *IL4* mostró una asociación estadísticamente significativa de las frecuencias alélicas y genotípicas con la sensibilización a un único grupo

de aeroalérgenos. Se obtuvo una  $p=0,013$ ; OR: 0,19; IC 95% (0,04 – 0,82) resultante de la comparación de la frecuencia del alelo T en controles (16,8%) y pacientes monosensibilizados (3,7%). El genotipo CT resultó ser más abundante en controles (28% frente al 7,4% en los pacientes monosensibilizados) con una  $p=0,045$ . Poder 81% para un error  $\alpha=0,05$  y FPRP de 8,5% para una probabilidad *a priori* del 10%. Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,010.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo en posición 874 *IFNG* mostraron una asociación con la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos. El análisis de frecuencias alélicas mostró significación ( $p=0,017$ , OR: 4,00; IC 95% [1,21 – 13,20]). Se observó una frecuencia mayor del alelo A en los pacientes polisensibilizados (80% frente a un 50% en controles).

Del mismo modo para analizar si estas asociaciones se debían a la sensibilización a uno o más grupos de aeroalérgenos se analizó el conjunto de polimorfismos en pacientes con hipersensibilidad a BL comparando la presencia de sensibilización a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados) frente a la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos que se muestran en la tabla 16 indicando que el peso de la asociación recae en la sensibilización para estos SNP.

**Tabla 16.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes monosensibilizados y polisensibilizados en pacientes con hipersensibilidad a BL.

SNP	p-Valor	FRECUENCIA (Alélica)	FRECUENCIA (Genotípica)
<b>874 IFNG</b>	Alélica: <b>0,045*</b>	A: 87,5% polisenb/ 50%monosenb	
	Genotípica: 0,43		
<b>-590 IL4</b>	Alélica: <b>0,048*</b>	T: 25% polisenb/ 3,8% monosenb	
	Genotípica: <b>0,035*</b>	CT: 50% polisenb/ 7,7% monosenb	
<b>-330 IL2</b>	Alélica: <b>0,007*</b>	T: 91,7% polisenb/45,8%monosenb	
	Genotípica: <b>0,044</b>	TT: 83,3% polisenb/ 25% monosenb	

\*p-Valor < 0,05

polisenb= polisensibilizados; monosenb= monosensibilizados

### 5.1.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLOTIPOS EN LA HIPERSENSIBILIDAD A BL

En el análisis de haplotipos y diplotipos de los genes *IL1B*, *IL6* y *TGFB1* se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en relación a la atopia y al asma en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a BL.

En el análisis de haplotipos del gen *IL1B* (posiciones -511/3962), se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con la sensibilización a un único grupo de aeroalérgenos. El haplotipo TT se observó con más frecuencia en los pacientes monosensibilizados que en los controles con una  $p=0,010$ ; OR: 4,03; IC 95% (1,29 – 12,62).

El análisis de diplotipos en el gen de *IL6* mostró únicamente cierta asociación ( $p=0,039$ ) entre la mayor presencia del diplotipo CG GG en los pacientes sensibilizados a ácaros y pólenes frente a los controles. Hay que destacar que el diplotipo CG GG no se encontró en ningún control, mientras que se localizó en un 11,1% de los pacientes. Al ajustar por edad y sexo se confirmó la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,002.

Por último, en el análisis de diplotipos del gen *TGFB1* se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,044$ ). En concreto, con el diplotipo TG CG, asociado a la presencia de asma. Poder 89% para un error  $\alpha=0,05$  y FPRP de 7,6% para una probabilidad *a priori* del 10%. Al ajustar por edad y sexo, se confirmó dicha asociación  $p=0,004$ .

## 5.2 GRUPO PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE

### 5.2.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Este grupo incluyó un total de 241 individuos, repartidos en 156 controles y 85 pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos. Los criterios de selección de este grupo se describen en el apartado 4.1 (población estudiada) de la sección de Material y Métodos.

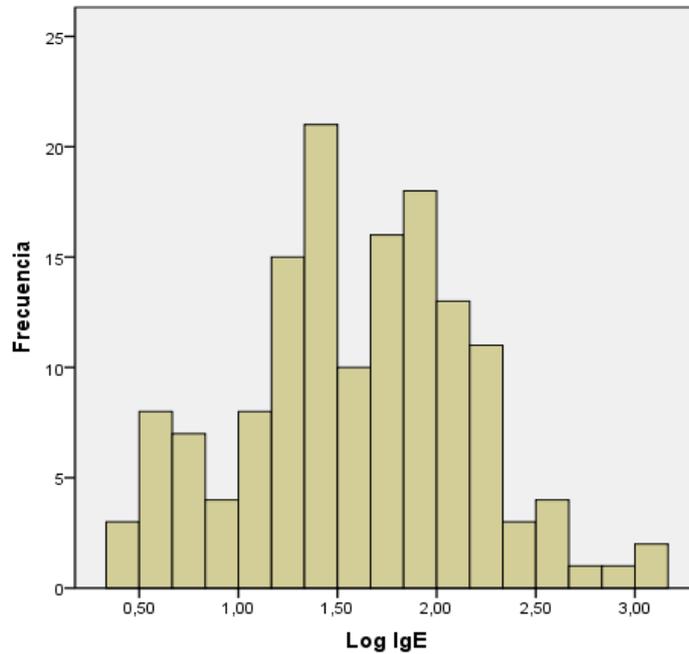
Los 85 pacientes con hipersensibilidad a AINE presentaban EREA, de los cuáles un 83,5% (71) presentan como sintomatología respiratoria, asma y rinitis, producidas por los AINE en pacientes que tenían como patología respiratoria de base poliposis nasosinusal y asma. Por otro lado, un 14,1% (12) de los pacientes presentan solamente asma bronquial como patología de base exacerbada por los AINE y sólo un 2,4% (2) de los pacientes tenían sintomatología respiratoria nasal exacerbada por los AINE con poliposis nasosinusal como única patología respiratoria de base. Por tanto, la mayoría de nuestra población de pacientes con hipersensibilidad a AINE; un 97,6% (83), presentaban asma; ya sea asma y poliposis o asma aislada y en relación al tipo de asma, los datos se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Distribución del tipo de asma en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE.

TIPO DE ASMA	PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE (% de distribución)
ASMA INTERMITENTE (N=8)	9,6%
ASMA PERSISTENTE LEVE (N=10)	12%
ASMA PERSISTENTE MODERADA (N=51)	61,4%
ASMA PERSISTENTE GRAVE (N=14)	17%

La mediana de edad de los controles fue de 50 años (RI= 33), con cierto predominio del sexo femenino (62%) (Tabla 8). En los pacientes con hipersensibilidad a AINE la mediana fue de 49 años (RI: 21) y la distribución de sexos también se inclinó a favor del sexo femenino (63% frente al 37% masculino); estos datos se reflejan en la tabla 8.

En relación a los niveles de IgE total, se obtuvieron unos niveles medios de 91,62 kUI/L (DE: 175,82) en los controles, mientras que en los pacientes, los niveles medios se incrementaron hasta 206,43 kUI/L (DE: 232,55) (Tabla 8). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles medios de IgE entre controles y pacientes con hipersensibilidad a AINE ( $p < 0,001$ ). En la figura 26 se muestra la distribución de los niveles de IgE, expresados en logaritmo en base 10 en los pacientes con hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos.



**Figura 26.** Distribución de los valores de niveles de IgE en pacientes con hipersensibilidad a AINE (expresado en logaritmo en base 10).

Al comparar los niveles de IgE con diversas variables clínicas: poliposis, asma, tríada del AAS, pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos y sensibilización a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados) o a varios grupos de aeroalérgenos (polisensibilizados), se encontraron asociaciones significativas con la sensibilización alérgica tal como se muestra en la tabla 18.

**Tabla 18.** Asociaciones significativas de los niveles de IgE con la presencia o ausencia de sensibilización alérgica en los pacientes con hipersensibilidad a AINE.

VARIABLES CLÍNICAS (VC)	GRUPO AINE		
	NIVELES DE IgE (pacientes con presencia de VC*)	NIVELES DE IgE (pacientes con ausencia de VC*)	p significativa (t student)
<b>MONOSENSIBILIZACIÓN (N=11)</b>	$\bar{X}$ : 363,52; DE: 380,14	$\bar{X}$ : 122,01; DE: 86,58	p<0,001
<b>POLISENSIBILIZACIÓN (N=15)</b>	$\bar{X}$ : 169,50; DE: 96,63	$\bar{X}$ : 363,52; DE:380,14	p=0,007

\*VC: variable clínica estudiada

## 5.2.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN HIPERSENSIBILIDAD A AINE

Al analizar el conjunto de polimorfismos en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con relación a los controles, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos -308 *TNFA*, -1098 *IL4*, -590 *IL4*, nt565 *IL6*, -1082 *IL10*, -592 *IL10* y -819 *IL10* (Tabla 19).

El análisis del polimorfismo en la posición -308 del gen de *TNFA* mostró que el alelo A fue más frecuente en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE (25%) que en los controles (6,2%) con una p<0,001; OR: 5,035 (2,82 – 9,01). Poder 98% y FPRP 0,2% para una probabilidad *a priori* del 0.001%. El análisis de las frecuencias genotípicas reflejó una mayor proporción del genotipo AG en los pacientes (38,1%) frente a los controles (9,8%), Poder >99%, FPRP 1,2% (PAP 0.001%), lo que fue confirmado al ajustar por edad y sexo, p<0,001; OR: 6,15; IC 95% (3,04 – 12,43).

El alelo G del polimorfismo -1098 *IL4*, se observó con más frecuencia en los pacientes con AINE (13,8%) que en los controles (7,1%), con una p=0.023; OR: 2,07; IC 95% (1,09 – 3,93). En el análisis de frecuencias genotípicas se observaron diferencias significativas en el genotipo TG, significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a AINE (27,5% vs 8,6% en controles), con p<0,001. PE 94% FPRP 7,4% PAP 1%. Esta asociación se confirmó al ajustar por edad y sexo obteniéndose una p de la regresión <0.001.

En el polimorfismo en la posición -590 del gen *IL4*, se observó una frecuencia mayor del alelo T en pacientes con AINE (25,9% frente al 14,1% en los controles) con una

p=0,002; OR: 2,13; IC 95% (1,31 – 3,47). Con respecto a las frecuencias genotípicas, se encontró que el genotipo CT es significativamente más frecuente en los pacientes (46,9%) respecto a los controles (21,1%) (p<0,001). PE 90% FPRP 0,3% PAP 1%. Mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo esta asociación se confirmó obteniéndose una p de la regresión <0.001.

**Tabla 19.** Estudio comparativo de las frecuencias alélicas y genotípicas en los controles y pacientes con reacciones de hipersensibilidad a AINE.

SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)	SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)
pst1 1970 <i>IL1R</i>	0,17	0,40	c25 <i>TGFB1</i>	<b>0,043*</b>	0,19
<b>3962 <i>IL1B</i></b>	0,09	0,11	<b>-1098 <i>IL4</i></b>	<b>0,023*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>-511 <i>IL1B</i></b>	0,74	0,76	<b>-590 <i>IL4</i></b>	<b>0,002*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>-889 <i>IL1A</i></b>	0,34	0,34	<b>-33 <i>IL4</i></b>	0,26	0,41
<b>874 <i>IFNG</i></b>	0,12	0,09	<b>-330 <i>IL2</i></b>	0,84	0,48
<b>-1188 <i>IL12</i></b>	<b>0,013*</b>	<b>0,047*</b>	<b>166 <i>IL2</i></b>	0,10	0,14
<b>-1902 <i>IL4RA</i></b>	0,34	0,37	<b>-174 <i>IL6</i></b>	0,08	0,13
<b>11100 <i>IL1RA</i></b>	0,06	0,11	<b>nt565 <i>IL6</i></b>	<b>0,041*</b>	<b>0,040*</b>
<b>-308 <i>TNFA</i></b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>-1082 <i>IL10</i></b>	0,88	<b>0,026*</b>
<b>-238 <i>TNFA</i></b>	0,78	0,91	<b>-819 <i>IL10</i></b>	0,59	<b>0,006*</b>
<b>c10 <i>TGFB1</i></b>	0,09	0,18	<b>-592 <i>IL10</i></b>	0,79	<b>0,008*</b>

\*p-Valor < 0,05

El análisis del polimorfismo nt565 *IL6*, reflejó una mayor proporción del alelo A en los sujetos del grupo control (36,9%) que en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE (27,4%) con una p=0,041; OR: 0,65; IC 95% (0,42 – 0,98). El análisis de frecuencias genotípicas resultó significativo (p=0,040), con una menor frecuencia del genotipo AA en los pacientes (3,7%) que en los controles (14,2%). Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una p de la regresión de 0,023; OR: 5,78; IC 95% (1,28 – 26,14).

En relación con el gen *IL10*, se han encontrado asociaciones significativas en las frecuencias genotípicas de los polimorfismos localizados en las posiciones -1082, -819 y -592. En el polimorfismo -1082 *IL10*, la comparación de las frecuencias genotípicas mostró una significación de 0,026 como consecuencia de la diferencia en la distribución del

genotipo AG en los pacientes (59,8% frente a 43,4% en controles), lo que fue confirmado mediante regresión logística al ajustar por edad y sexo,  $p=0,034$ ; OR: 4,04; IC 95% (1,11 - 14,69).

En el caso del SNP -819 del gen *IL10*, el genotipo TC presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,006$ ), observándose una mayor frecuencia en pacientes con hipersensibilidad a los AINE (53,7%) que en los controles (36,2%). Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,016.

Finalmente, el genotipo AC en posición -592 del gen de *IL10*, se observó con más frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (54,9%) que en los controles (37,9%) con una  $p=0,008$ . PE 81% FPRP 2,8% PAP 10% En este caso, se confirmó la asociación al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,015.

### **NIVELES DE IgE TOTAL**

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con hipersensibilidad a AINE y controles con los niveles de IgE, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos 874 *IFNG*, -1188 *IL12*, -308 *TNFA*, -238 *TNFA* y -1098 *IL4*.

En el caso del polimorfismo 874 *IFNG*, se ha encontrado una asociación significativa ( $p=0,041$ ) de los niveles de IgE del genotipo TA ( $\bar{X}$ : 185,96; DE: 279,60) con los del genotipo AA ( $\bar{X}$ : 75,40; DE: 81,56). Para el resto de polimorfismos los valores estadísticos se detallan en la tabla 20.

**Tabla 20.** Estudio comparativo de los 22 polimorfismos con los niveles de IgE en los controles y en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a AINE.

SNP	VALORES DE IgE ( $\bar{X}$ ; DE)	p-VALOR
<b>874 IFNG</b>	TA: 185,96; 279,60 AA: 75,40; 81,56	0,041
<b>-1188 IL12</b>	AA: 90,16; 147,84	0,029
	AC: 174,91; 236,50	
	AA: 90,16; 147,84 CC: 270,09; 403,19	0,014
<b>-308 TNFA</b>	AA: 316,73; 342,06	0,047
	GG: 114,66; 219,95	
<b>-238 TNFA</b>	GG: 121,44; 193,16	0,038
	AA: 53,25; 17,46	
<b>-1098 IL4</b>	TT: 126,16; 197,93	0,025
	GG: 26,03; 33,49	

## POLIPOSIS Y/O ASMA

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con las variables clínicas poliposis y/o asma y controles en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos que se muestran en la tabla 21.

En relación a los pacientes con “Poliposis y Asma” se observó una asociación estadísticamente significativa con los polimorfismos 874 *IFNG*, -1188 *IL12B*, -308 *TNFA*, -1098 *IL4*, -590 *IL4*, -1082 *IL10*, -819 *IL10* y -592 *IL10* (Tabla 21). Debido a que los pacientes del grupo de individuos con hipersensibilidad a AINE que presentan las variables clínicas: poliposis y asma son los pacientes con la tríada del AAS, los polimorfismos que se asocian de forma estadísticamente significativa con esta entidad clínica también conocida como síndrome de Fernand Vidal son los anteriormente descritos y que se detallan en la tabla 21.

En el análisis de frecuencias genotípicas del polimorfismo en posición 874 de *IFNG*, se observaron diferencias significativas en el genotipo TA, más frecuente en el grupo de pacientes con poliposis y asma (47,1% vs 26,9% en controles), con p=0,047. PE 84% y FPRP

4% PAP 10%. Esta asociación se confirmó al ajustar por edad y sexo obteniéndose una p de la regresión de 0,027; OR: 3,36; IC 95% (1,14 – 9,83).

En el caso del SNP en posición -1188 del gen *IL12B*, se encontró el alelo C con mayor frecuencia en los los pacientes con poliposis y asma (26,1%) que en los controles (16,7%) con una p=0,024; OR: 1,77; IC 95% (1,07 – 2,91). El análisis de las frecuencias genotípicas reflejó una mayor proporción del genotipo AC en los pacientes con poliposis y asma (40,3%) que en los controles (24,6%) (p=0,049). Al ajustar por edad y por sexo, esta asociación se confirmó obteniéndose una p de la regresión de 0,029.

**Tabla 21.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes con poliposis y/o asma.

SNP	FRECUENCIAS	POLIPOSIS (Grupo AINE) (N=73)	ASMA (Grupo AINE) (N=83)	POLIPOSIS Y ASMA (Grupo AINE) (N=71)
<b>3962 <i>IL1B</i></b>	P-Alélica	0,16	0,09	0,17
	P-Genotípica	<b>0,044*</b>	0,12	0,05
<b>874 <i>IFNG</i></b>	P-Alélica	<b>0,048*</b>	0,13	0,07
	P-Genotípica	<b>0,044*</b>	0,07	<b>0,047*</b>
<b>-1188 <i>IL12B</i></b>	P-Alélica	<b>0,015*</b>	<b>0,020*</b>	<b>0,024*</b>
	P-Genotípica	<b>0,046*</b>	0,05	<b>0,049*</b>
<b>-308 <i>TNFA</i></b>	P-Alélica	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
	P-Genotípica	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>-1098 <i>IL4</i></b>	P-Alélica	<b>0,010*</b>	<b>0,008*</b>	<b>0,007*</b>
	P-Genotípica	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>-590 <i>IL4</i></b>	P-Alélica	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
	P-Genotípica	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>
<b>nt565 <i>IL6</i></b>	P-Alélica	<b>0,043*</b>	<b>0,031*</b>	<b>0,032*</b>
	P-Genotípica	0,06	<b>0,040*</b>	0,06
<b>-1082 <i>IL10</i></b>	P-Alélica	0,81	0,85	0,77
	P-Genotípica	<b>0,002*</b>	<b>0,027*</b>	<b>0,002*</b>
<b>-819 <i>IL10</i></b>	P-Alélica	0,72	0,52	0,64
	P-Genotípica	<b>0,002*</b>	<b>0,009*</b>	<b>0,004*</b>
<b>-592 <i>IL10</i></b>	P-Alélica	0,91	0,71	0,82
	P-Genotípica	<b>0,003*</b>	<b>0,012*</b>	<b>0,004*</b>

\*p-Valor < 0,05

El polimorfismo en posición -308 del gen *TNFA* mostró una intensa asociación con las variables “Poliposis”, “Asma” y “Poliposis y Asma”, en mayor proporción en los pacientes que en los controles, tanto en la distribución de frecuencias alélicas como genotípicas, tal como se muestra en la tabla 22. En el caso de las frecuencias genotípicas se confirmó la mayor proporción del genotipo AG al ajustar por edad y sexo mediante regresión en los pacientes con presencia de poliposis, en los pacientes con presencia de asma y en los pacientes con poliposis y asma. Los valores estadísticos de la regresión se muestran en la tabla 22. En todos los casos, tanto en la distribución de frecuencias alélicas (alelo A) como genotípicas (genotipo AG) el poder estadístico fue del 99% con un FPRP inferior a 2% para una probabilidad *a priori* del 0,001%.

La comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo -1098 *IL4*, mostró diferencias significativas en la frecuencia del alelo G en pacientes con poliposis y asma (14,5% frente al 6,5% en controles), con una  $p=0,007$ ; OR: 2,45; IC 95% (1,25 - 4,80). El genotipo TG resultó ser más abundante en los pacientes con poliposis y asma (29%) que en los controles (8,6%) con una  $p<0,001$ . PE 95% y y FPRP 8,2% PAP 1%. Se confirmó esta asociación al ajustar por edad y sexo obteniéndose en la regresión una  $p<0,001$ .

Se encontró una asociación significativa en las frecuencias del alelo T en posición -590 de *IL4*, más representado en los pacientes con poliposis y asma (29,7%) que en los controles (14,1%) con una  $p<0,001$ ; OR: 2,58; IC 95% (1,57 - 4,23). También se detectó que el genotipo CT era más frecuente en pacientes con poliposis y asma (56,6%) que en los controles (21,1%) con una  $p<0,001$ . PE >99% y y FPRP 0,1% PAP 0,1%. Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación estadística obeniéndose una  $p$  de la regresión  $<0,001$ .

**Tabla 22.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -308 *TNFA* de controles y pacientes con poliposis y/o asma.

VARIABLES CLÍNICAS	FRECUENCIA		p-Valor	OR Regresión (OR)
	Alelo A	Genotipo AG		
<b>POLIPOSIS (N=73)</b>	p: 0,28/c: 0,06	p: 0,42/c: 0,10	Alélica: 0,001 Genotípica: <0,001	A: 5,77 (3,19-10,41) G: 7,40 (3,58-15,29)
<b>ASMA (N=83)</b>	p: 0,25/c: 0,06	p: 0,38/c: 0,10	Alélica: 0,001 Genotípica: <0,001	A: 5,00 (2,79-8,96) G: 6,09 (3,01-12,35)
<b>POLIPOSIS Y ASMA (N=71)</b>	p: 0,28/c: 0,06	p: 0,41/c: 0,09	Alélica: 0,001 Genotípica: <0,001	A: 5,79 (3,20-10,48) G: 7,36 (3,54-15,29)

p=pacientes; c=controles

En el caso de los polimorfismos del gen *IL10*, se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas. Con respecto al polimorfismo -1082 *IL10*, en el análisis de frecuencias genotípicas se observaron diferencias en el genotipo AG, significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con poliposis y asma (65,7% vs 43,4% en controles), con  $p=0,002$ . PE 90% y y FPRP 5,3% PAP 10%. Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación estadística, obteniéndose en la regresión una  $p=0,021$ ; OR: 11,35; IC 95% (1,45 – 88,81).

En el análisis del SNP -819 *IL10*, se observaron diferencias en el genotipo TC, que fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes con poliposis y asma (55,7% vs 36,2% en controles) con una  $p=0,004$ . PE 81% y y FPRP 8,2% PAP 10%. También en este caso se pudo con la significación estadística al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,033 con una OR: 1,99; IC 95% (1,06 – 3,75).

Con respecto a la distribución de frecuencias genotípicas del polimorfismo -592 *IL10*, se encontraron diferencias significativas en la distribución del genotipo AC, que fue más frecuente en los pacientes con poliposis y asma (57,1% frente al 37,9% en controles). Se pudo confirmar la significación estadística al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,030 con una OR: 2,00; IC 95% (1,07 – 3,74).

En relación a todos los pacientes del grupo de hipersensibilidad a AINE con la variable “Poliposis” o con la variable “Asma”, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los mismos polimorfismos previamente descritos para pacientes con la variable “Poliposis y Asma” como puede observarse en la tabla 21.

En el caso de pacientes con la variable “Poliposis” además de las asociaciones anteriormente descritas, se observó también asociación con el SNP 3962 del gen *IL1B*. El análisis de las frecuencias genotípicas, mostró diferencias significativas en la distribución de la frecuencia del genotipo TC en pacientes con poliposis (42,5% frente al 26,2% en controles) con una  $p=0,044$ . Al ajustar por edad y por sexo, esta asociación se confirmó obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,047 con una OR: 1,90; IC 95% (1,01 – 3,60).

## **PRUEBAS CUTÁNEAS POSITIVAS CON AEROALÉRGENOS COMUNES**

Al analizar el conjunto de polimorfismos entre pacientes con pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes y controles en el grupo de pacientes con

hipersensibilidad a AINE, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el polimorfismo -308 *TNFA*.

El análisis de frecuencias alélicas del polimorfismo en posición -308 del gen *TNFA* mostró una mayor frecuencia del alelo A en pacientes con pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos (17,3% frente a un 6,2% en controles) y una  $p=0,006$  OR: 3,14; IC 95% (1,33 – 7,38). Al comparar las frecuencias genotípicas de este polimorfismo, se encontró una asociación significativa en la distribución del genotipo AG más frecuente en pacientes con pruebas cutáneas positivas (26,9%) que en controles (9,9%). Esta asociación se confirmó al ajustar por edad y sexo, obteniéndose un valor de  $p=0,017$ ; OR: 3,47; IC 95% (1,25 – 9,66).

### SENSIBILIZACIÓN A UNO O VARIOS GRUPOS DE AEROALÉRGENOS

En el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados), no se encontró asociación significativa con ninguno de los polimorfismos incluidos en el estudio. Sin embargo, en los pacientes sensibilizados a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos 3962 *IL1B*, -1188 *IL12B*, 11100 *IL1RA* y 166 *IL2* que se detallan a continuación en la tabla 23.

**Tabla 23.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los controles y pacientes polisensibilizados en el grupo de AINE.

SNP	FRECUENCIAS	POLISENSIBILIZACIÓN (N=15) (a más de un grupo de aeroalérgenos)
<b>3962 <i>IL1B</i></b>	P-Alélica	<b>0,004*</b>
	P-Genotípica	<b>0,019*</b>
<b>-1188 <i>IL12B</i></b>	P-Alélica	<b>0,007*</b>
	P-Genotípica	<b>0,003*</b>
<b>11100 <i>IL1RA</i></b>	P-Alélica	0,16
	P-Genotípica	<b>0,018*</b>
<b>166 <i>IL2</i></b>	P-Alélica	<b>0,026*</b>
	P-Genotípica	<b>0,002*</b>

\*p-Valor < 0,05

El análisis de frecuencias alélicas del polimorfismo en posición 3962 del gen de *IL1B* mostró una mayor frecuencia del alelo T en pacientes polisensibilizados (50% frente a un 16,9% en controles) y una  $p=0,004$ ; OR: 4,90; IC 95% (1,51 – 15,93). Al comparar las frecuencias genotípicas de este polimorfismo 3962 *IL1B* en los pacientes polisensibilizados, se encontró una asociación significativa en la distribución del genotipo TC, más frecuente en pacientes (66,7%) que en controles (26,2%). Esta asociación se confirmó al ajustar por edad y sexo, obteniéndose un valor de  $p=0,037$ ; OR: 10,71; IC 95% (1,15 – 99,21).

En este caso, también encontramos que el alelo C del polimorfismo en posición -1188 del gen de *IL12B* fue más frecuente los pacientes polisensibilizados (50%) que en los controles (16,7%) con una  $p=0,007$ ; OR: 2,77; IC 95% (1,20 – 6,40). Con respecto a las frecuencias genotípicas, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,003$ ) en el genotipo CC, siendo más frecuente en los pacientes polisensibilizados (40%) que en los controles (4,3%). PE 82% y FPRP 2,6% PAP 10%. Esta asociación no se confirmó al ajustar por edad y sexo mediante regresión logística.

El genotipo CC del polimorfismo 11100 *IL1RA*, se observó con más frecuencia en los pacientes polisensibilizados (33,3%) que en los controles (5,2%), con una  $p=0,018$ . Esta asociación no se pudo confirmar al ajustar por edad y sexo mediante regresión logística.

El polimorfismo en posición 166 del gen de *IL2* mostró asociación con la polisensibilización, sobre todo en la distribución de frecuencias genotípicas. Con respecto a la distribución de frecuencias alélicas, se encontraron diferencias significativas en la distribución del alelo T en los pacientes polisensibilizados (58,3%) frente a los controles (28,3%) con una  $p=0,026$ ; OR: 3,54; IC 95% (1,09 – 11,48). La comparación de las frecuencias genotípicas mostró una intensa significación de 0,002, debido a la mayor proporción del genotipo TT en los pacientes polisensibilizados (50%) respecto a los controles (7,7%). PE 85% y FPRP 4,7% PAP 10%. Esta significación volvió a ponerse de manifiesto obteniéndose una  $p$  en la regresión de 0,018; OR: 9,82; IC 95% (1,47 – 65,54).

## 5.2.4 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE

### GEN TNFA (-308/-238)

En el análisis de haplotipos del gen *TNFA* (posiciones -308/-238), se observó que el haplotipo AG se encontraba con mayor frecuencia en los pacientes y el haplotipo GG en los controles. Se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas en los haplotipos del gen *TNFA*, tanto en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE como con distintas características clínicas, que se muestran en la tabla 24. Para el haplotipo AG, en todos los casos, se alcanzó y superó un poder estadístico de 90% y un FPRP para una probabilidad *a priori* del 0,001% (Aine: 0,2%, Poliposis: 0%, Asma: 0,2% y Tríada del AAS: 0%). En relación al haplotipo GG el poder estadístico también superó el 90% en todos los casos y el valor de FPRP para una probabilidad *a priori* del 0,001% fue (Aine: 2,9%, Poliposis: 0,6%, Asma: 3,9% y Tríada del AAS: 0,3%).

**Tabla 24.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *TNFA* (-308/-238).

GRUPO Y VARIABLE CLÍNICA	HAPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES	FRECUENCIA CONTROLES	p-Valor	OR
<b>AINE (N=85)</b>	AG	24,9%	6,3%	p<0,001	4,95 (2,77-8,86)
	GG	66,7%	86,1%	p<0,001	0,32 (0,20-0,51)
<b>POLIPOSIS (N=73)</b>	AG	27,7%	6,3%	p<0,001	5,71 (3,16-10,32)
	GG	64%	86,1%	p<0,001	0,29 (0,18-0,46)
<b>ASMA (N=83)</b>	AG	24,9%	6,3%	p<0,001	4,95 (2,76-8,88)
	GG	66,5%	86,1%	p<0,001	0,32 (0,20-0,51)
<b>TRÍADA AAS (N=71)</b>	AG	27,8%	6,3%	p<0,001	5,74 (3,17-10,39)
	GG	63,7%	86,1%	p<0,001	0,28 (0,18-0,45)

En el análisis de diplotipos del gen *TNFA* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa tanto a nivel de grupo (pacientes con hipersensibilidad a AINE y controles) como con distintas variables clínico-biológicas (ver tabla 25). En concreto, el diplotipo GG GG se observó con más frecuencia en los controles que en los pacientes del grupo AINE y en los controles que en los subgrupos de pacientes con poliposis, con asma, con tríada del

AAS y con pruebas cutáneas positivas. El poder estadístico superó el 95% en todos los casos, y el valor de FPRP fue para el grupo AINE de 5,2% para una probabilidad de 10%, para poliposis de 2,1% para una probabilidad de 10%, para asma de 4,5% para una probabilidad de 10%, para tríada del AAS de 2,1% para una probabilidad de 10% y para pruebas cutáneas positivas de 8,6% para una probabilidad de 10%. También resultó intensa la asociación del diplotipo AG GG en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE y en el subgrupo de pacientes con la variable clínica asma. Para este diplotipo AG GG el poder estadístico también alcanzó y superó el 95%.

**Tabla 25.** Asociación de los diplotipos del gen TNFA (-308/-238).

GRUPO Y VARIABLE CLÍNICA	DILOTIPO	FRECUENCIA GRUPO SIGNIFICATIVO	p-Valor	p Regresión (OR)
<b>AINE (N=84)</b>	AG GG	pac (32,1%)/ con (9,3%)	p<0,001	p=0,001
	GG GG	con (74,7%)/ pac (46,4%)	p<0,001	0,019: 0,13 (0,02-0,72)
<b>POLIPOSIS (N=72)</b>	GG GG	con (74,7%)/ pac (41,7%)	p<0,001	0,008: 0,10 (0,02-0,55)
<b>ASMA (N=82)</b>	AG GG	pac (31,7%)/ con (9,3%)	p<0,001	p=0,001
	GG GG	con (74,7%)/ pac (46,3%)	p<0,001	0,017: 0,13 (0,02-0,70)
<b>TRÍADA AAS (N=71)</b>	GG GG	con (74,7%)/ pac (42,3%)	p<0,001	0,008: 0,10 (0,19-0,55)
<b>PC + (N=26)</b>	GG GG	con (74,7%)/ pac (53,8%)	p=0,036	p=0,031

pac: pacientes; con: controles  
PC+= pruebas cutáneas positivas

### GEN TGFB1 (c10/c25)

En relación al análisis de diplotipos del gen *TGFB1* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas variables clínico biológicas (ver tabla 26). En especial el diplotipo TG CG, se observó con mayor frecuencia en los pacientes con poliposis (p=0,027) y con tríada del AAS (p=0,023). En ambos casos el poder estadístico fue superior al 80%, en el caso de la variable poliposis fue de 86% y en el caso de tríada del AAS fue de 89%. Estas asociaciones fueron confirmadas mediante regresión logística, obteniéndose una p de la regresión de 0,015 para la variable poliposis y de 0,017 para la variable tríada del AAS.

**Tabla 26.** Diplotipos significativos en el análisis del gen *TGFB1*.

VARIABLE CLÍNICA	DILOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES	FRECUENCIA CONTROLES	p-Valor
<b>POLIPOSIS (N=69)</b>	TG CG	58%	33,7%	p=0,027
<b>TRÍADA AAS (N=68)</b>	TG CG	58,8%	33,7%	p=0,023

El análisis de haplotipos del gen *TGFB1* (posiciones c10/c25) reflejó solamente una asociación estadísticamente significativa con el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE respecto a sus controles. El haplotipo CG se observó con mayor frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (44,8%) que en los controles (34,3%) con una  $p=0,047$  OR: 1,56; IC 95% (1,00 – 2,42).

### **GEN IL4 (-1098/-590/-33)**

En el análisis de haplotipos del gen *IL4* (-1098/-590/-33) se obtuvo una asociación estadísticamente significativa a nivel de grupo (pacientes con hipersensibilidad a AINE y sus controles) y con distintas variables clínicas (ver tabla 27). Principalmente, esta asociación se encontró en el haplotipo TCC, siendo más frecuente en los controles que en los pacientes del grupo AINE, y en los controles que en los subgrupos de pacientes con presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS. Respecto al haplotipo TCC, en todos los casos, se alcanzó y superó un poder estadístico de 90% y un FPRP para una probabilidad *a priori* del 0,001% (Aine: 6%, Poliposis: 1,1%, Asma: 5,1% y Tríada del AAS: 3%).

**Tabla 27.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *IL4*.

GRUPO Y VARIABLE CLÍNICA	HAPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES	FRECUENCIA CONTROLES	p-Valor	OR
<b>AINE (N=85)</b>	TCC	59,1%	79,9%	p<0,001	0,37 (0,24-0,57)
<b>POLIPOSIS (N=73)</b>	TCC	55,8%	79,9%	p<0,001	0,32 (0,78-2,39)
<b>ASMA (N=83)</b>	TCC	58,5%	79,9%	p<0,001	0,36 (0,23-0,56)
<b>TRÍADA AAS (N=71)</b>	TCC	55,1%	79,9%	p<0,001	0,31 (0,20-0,49)

En el análisis de diplotipos del gen *IL4*, el diplotipo TCC TCC se observó intensamente asociado no sólo con el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE, también con la presencia de poliposis, asma y tríada del AAS (p<0,001 en todos los casos) (Tabla 28). Al ajustar por edad y sexo mediante regresión logística se confirmaron dichas asociaciones obteniéndose una p de la regresión <0,001 en todos los casos. El análisis de diplotipos del gen *IL4* (posiciones -1098/-590/-33) también reflejó una asociación significativa (p=0,002) entre el diplotipo TCC TTT y la variable pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos, siendo más frecuente en controles que en pacientes con pruebas cutáneas positivas. Dicha asociación también se confirmó al ajustar por edad y sexo obteniéndose una p de la regresión de 0,025.

**Tabla 28.** Asociación de los diplotipos del gen *IL4* (-1098/-590/-33).

GRUPO Y VARIABLE CLÍNICA	DIPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES	FRECUENCIA CONTROLES	p-Valor	PODER
<b>AINE (N=63)</b>	TCC TCC	33,3%	65%	p<0,001	99%
<b>POLIPOSIS (N=53)</b>	TCC TCC	27,8%	65%	p<0,001	>99%
<b>ASMA (N=61)</b>	TCC TCC	32,8%	65%	p<0,001	99%
<b>TRÍADA AAS (N=53)</b>	TCC TCC	28,3%	65%	p<0,001	>99%
<b>PRUEBAS CUTÁNEAS+ (N=20)</b>	TCC TTT	0%	20,4%	p=0,002	70%

### GEN IL2 (-330/166)

En el análisis de diplotipos del gen *IL2* se encontró una asociación estadísticamente significativa del diplotipo TT TT con la variable clínica sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos ( $p=0,049$ ), en mayor proporción en pacientes polisensibilizados (50%) que en controles (7,7%). No se confirmó la significación al ajustar por edad y sexo pero el poder estadístico fue de un 80%.

En el análisis de haplotipos del gen *IL2* se obtuvo una asociación estadísticamente significativa con distintas variables clínicas (ver tabla 29). Se encontró asociación del haplotipo TT (-330 y 166) con la presencia de poliposis ( $p=0,046$ ) y con la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados) ( $p=0,025$ ).

**Tabla 29.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *IL2* (-330/166).

VARIABLE CLÍNICA	HAPLOTIPO	FRECUENCIA GRUPO SIGNIFICATIVO	p-Valor	OR
<b>POLIPOSIS (N=73)</b>	TT	pac (37,9%)/con (28,3%)	$p=0,046$	1,54 (1,06-2,36)
<b>POLISENSIBILIZACIÓN (a más de un grupo de aeroalérgenos) (N=15)</b>	TT	pac (58,3%)/con (27,1%)	$p=0,025$	3,54 (1,09-11,49)

pac: pacientes; con: controles

### GEN IL10 (-1082/-819/-592)

En el análisis de diplotipos se encontró que el diplotipo ATA GCC se asociaba de forma muy significativa con el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE y dentro de este grupo con la presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS ( $p<0,001$  en todos los casos) (Tabla 30). Además al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose una  $p$  de la regresión  $<0,001$  en todos los casos.

**Tabla 30.** Asociación de los diplotipos del gen *IL10* (-1082/-819/-592).

GRUPO Y VARIABLE CLÍNICA	DIPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES	FRECUENCIA CONTROLES	p-Valor	PODER
<b>AINE (N=49)</b>	ATA GCC	36,7%	11,3%	p<0,001	95%
<b>POLIPOSIS (N=42)</b>	ATA GCC	42,9%	11,3%	p<0,001	98%
<b>ASMA (N=48)</b>	ATA GCC	35,4%	11,3%	p<0,001	91%
<b>TRÍADA AAS (N=42)</b>	ATA GCC	42,9%	11,3%	p<0,001	98%

El análisis de haplotipos del gen *IL10* (posiciones 1082/-819/-592) mostró una asociación estadísticamente significativa con la sensibilización alérgica, en concreto con la sensibilización a uno de los grupos de aeroalérgenos (monosensibilizados). Se encontró una asociación p=0,003; OR: 14,24; IC 95% (1,42 – 142,38) del haplotipo GCA con la sensibilización a uno de los grupos de aeroalérgenos, siendo más frecuente en pacientes monosensibilizados que en controles (5% vs 0,4%), aunque la escasa representación de estos haplotipos del gen *IL10*, hace que en ningún caso se alcance un poder del 80%.

### 5.3 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE

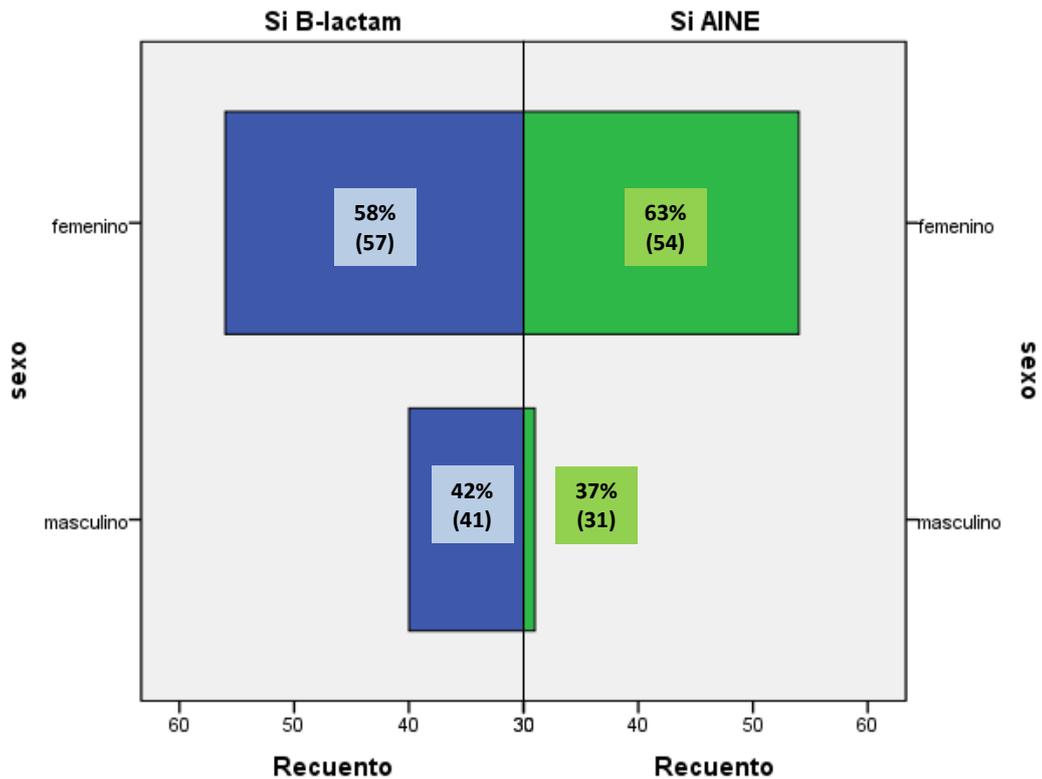
#### 5.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En este grupo, como ya se ha mencionado previamente, se han incluido todos los pacientes analizados en este estudio, los 98 pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL y los 85 pacientes con reacciones de hipersensibilidad a AINE. Los criterios de selección de ambos tipos de pacientes se han descrito en el apartado 4.1 de la sección de Material y Métodos. Se trata de un grupo de pacientes con dos patologías tipos de reacciones adversas claramente diferenciadas desde el punto de vista clínico-biológico, por lo que se realiza un análisis comparativo.

La mediana de edad para los pacientes con hipersensibilidad a BL fue la misma que en el caso de los pacientes con hipersensibilidad a AINE, 49 años (RI: 29 y 21, respectivamente) (Tabla 8). La distribución por sexos en ambos tipos de pacientes mostró un predominio del sexo femenino en ambos, como se observa en la figura 27.

En relación a las diversas variables clínicas incluidas en este estudio, en la tabla 31 se detallan cada una de ellas y su frecuencia de distribución en pacientes con hipersensibilidad a BL y en pacientes con hipersensibilidad a AINE.

**Pacientes con hipersensibilidad a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE**



**Figura 27.** Distribución por sexos de los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a antibióticos beta-lactámicos (BL) y pacientes con hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Un 20,2% de los pacientes con hipersensibilidad a BL presentó pruebas cutáneas positivas frente a algún grupo de aeroalérgenos de la batería de alérgenos comunes utilizada en el estudio, frente a un 30,6% de los pacientes con hipersensibilidad a AINE. Los datos de sensibilización alérgica en ambos tipos de pacientes se muestran en la tabla 32. Para cada uno de los grupos de aeroalérgenos, se ha calculado su frecuencia de distribución.

**Tabla 31.** Distribución de las variables clínicas incluidas en el estudio en los pacientes con hipersensibilidad a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE.

VARIABLES CLÍNICAS (VC)	GRUPO BL Y AINE		
	PACIENTES BL N=98	PACIENTES AINE N=85	p-Valor (para cada VC)
EDAD	Mediana: 49; RI: 29	Mediana: 49; RI: 21	p=0,06
NIVELES DE IgE TOTAL	$\bar{X}$ : 165,83; DE: 342,91	$\bar{X}$ : 206,43; DE: 232,55	p=0,39
POLIPOSIS	1,7%	85,9%	p<0,001
ASMA	13,6%	97,6%	p<0,001
TRÍADA DEL AAS	0%	83,5%	p<0,001
PRUEBAS CUTÁNEAS +	20,2%	30,6%	p=0,062
MONOSENSIBILIZACIÓN	68,4%	42,3%	p=0,59
POLISENSIBILIZACIÓN	31,6%	57,7%	p=0,59

No se observaron diferencias significativas en la distribución de los grupos de aeroalérgenos entre ambos tipos de pacientes como puede observarse en la tabla 32.

**Tabla 32.** Distribución de los grupos de aeroalérgenos respecto al total de pruebas cutáneas positivas en los pacientes con hipersensibilidad a BL y en los pacientes con hipersensibilidad a AINE.

GRUPOS DE AEROALÉRGENOS	GRUPO BL (N=98)	GRUPO AINE (N=85)	p-Valor
ÁCAROS	52,6%	52,9%	0,88
PÓLENES	63,2%	64,7%	0,90
ÁCAROS Y PÓLENES	21,1%	17,6%	0,73
EPITELIOS	22,2%	29,4%	0,26
HONGOS	5,3%	5,9%	0,23

### 5.3.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE

El análisis del conjunto de polimorfismos entre pacientes con reacciones de hipersensibilidad a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE, reflejó diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos 3962 *IL1B*, -889 *IL1A*, 11100 *IL1RA*, -308 *TNFA*, -1098 *IL4*, -590 *IL4*, -1082 *IL10* y -819 *IL10* (Tabla 33).

El análisis del polimorfismo en posición 3962 del gen *IL1B* mostró diferencias significativas en la frecuencia del genotipo TC en pacientes con hipersensibilidad a AINE (39,8% frente al 20,7% en pacientes con hipersensibilidad a BL), con una  $p=0,020$ . PE 80% y FPRP 3,7% PAP 10%. Al ajustar por edad y sexo pareando por edad se obtuvo una  $p$  de la regresión de 0,015; OR: 2,40; IC 95% (1,18 – 4,83).

En este estudio, encontramos que el alelo T del polimorfismo en posición -889 del gen *IL1A* fue significativamente más frecuente en los pacientes con hipersensibilidad a BL (14,6%) que en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (1,7%) con una  $p=0,008$ ; OR: 10,11; IC 95% (1,28 – 80,09). PE 88% y FPRP 7,1% PAP 10%. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas.

**Tabla 33.** Estudio comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con hipersensibilidad a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE.

SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)	SNP	p-Valor (Alélica)	p-Valor (Genotípica)
pst1 1970 <i>IL1R</i>	0,15	0,35	c25 <i>TGFB1</i>	0,09	0,29
3962 <i>IL1B</i>	0,12	<b>0,020*</b>	-1098 <i>IL4</i>	<b>0,007*</b>	<b>0,003*</b>
-511 <i>IL1B</i>	0,32	0,59	-590 <i>IL4</i>	<b>0,024*</b>	<b>0,048*</b>
-889 <i>IL1A</i>	<b>0,008*</b>	0,13	-33 <i>IL4</i>	0,46	0,74
874 <i>IFNG</i>	0,92	0,27	-330 <i>IL2</i>	0,87	0,43
-1188 <i>IL12</i>	0,18	0,32	166 <i>IL2</i>	0,09	0,26
-1902 <i>IL4RA</i>	0,79	0,35	-174 <i>IL6</i>	0,47	0,39
11100 <i>IL1RA</i>	<b>0,012*</b>	<b>0,007*</b>	nt565 <i>IL6</i>	0,43	0,27
-308 <i>TNFA</i>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,001*</b>	-1082 <i>IL10</i>	0,42	<b>0,021*</b>
-238 <i>TNFA</i>	0,17	0,32	-819 <i>IL10</i>	0,82	<b>0,016*</b>
c10 <i>TGFB1</i>	0,24	0,36	-592 <i>IL10</i>	0,61	0,15

\*p-Valor < 0,05

En el caso del SNP en posición 11100 del gen *IL1RA*, se encontró el alelo C con mayor frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (32,1%) que en los pacientes alérgicos a BL (20,4%) con una  $p=0,012$ ; OR: 1,844; IC 95% (1,14 – 2,98). El análisis de las frecuencias genotípicas reflejó una mayor proporción del genotipo TC en los pacientes AINE (50%) que en los pacientes BL (28%) ( $p=0,007$ ). PE 86% y FPRP 11,6% PAP 10%. Al ajustar por edad y por sexo, esta asociación se confirmó obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,003.

En el análisis del polimorfismo en posición -308 del gen *TNFA* se observó una mayor frecuencia del alelo A en los pacientes con hipersensibilidad a AINE (25% frente a un 11,1% en los pacientes con hipersensibilidad a BL), con una  $p<0,001$ ; OR: 2,68; IC 95% (1,51 – 4,75). En el análisis de frecuencias genotípicas se observaron diferencias significativas en la distribución del genotipo AG, significativamente más frecuente en el grupo de pacientes AINE (38,1% vs 15,8% en pacientes BL), con una  $p=0,001$ . PE 92% y FPRP 6% PAP 0,1%. Esta asociación se confirmó al ajustar por edad y sexo, obteniéndose en la regresión una  $p=0,001$ ; OR: 3,49; IC 95% (1,70 – 7,16).

La comparación de frecuencias de los polimorfismos -1098 *IL4* y -590 *IL4* resultó significativa tanto para alelos como para genotipos. En el polimorfismo -1098 *IL4*, se obtuvo una  $p=0,007$ ; OR: 2,80; IC 95% (1,28 – 6,12), resultante de la comparación de la frecuencia del alelo G en pacientes AINE (13,8%) y pacientes BL (5,4%). La comparación de las frecuencias genotípicas mostró una  $p=0,003$  como consecuencia de la diferencia en la distribución del genotipo TG en los pacientes AINE (27,5%) respecto a los pacientes BL (8,6%). PE 89% y FPRP 14,2% PAP 1%. Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación obteniéndose en la regresión una  $p$  de 0,001.

En el caso del SNP -590 *IL4*, el análisis de frecuencias alélicas mostró una significación estadística ( $p=0,024$ ; OR: 0,59; IC 95% [0,32 – 0,93]), pues se observó una frecuencia mayor del alelo T en pacientes con hipersensibilidad a AINE (25,9% frente a un 16,1% en pacientes con hipersensibilidad a BL). El análisis de frecuencias genotípicas resultó significativo ( $p=0,048$ ), con una mayor frecuencia del genotipo CT en los pacientes AINE (46,9%) que en los pacientes BL (30,1%). Esta significación se mantuvo al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,015.

Con respecto a los polimorfismos -1082 *IL10* y -819 *IL10*, se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas. En el SNP -1082 *IL10*, se encontraron diferencias significativas en la distribución del genotipo AG en los pacientes

con hipersensibilidad a AINE (59,8%) frente a los pacientes con hipersensibilidad a BL (45,2%), con una  $p=0,021$ . Al ajustar por edad y sexo se mantuvo la significación, obteniéndose una  $p=0,012$ , OR: 5,35; IC 95% (1,44 - 19,93). El otro polimorfismo, -819 *IL10*, mostró una asociación del genotipo TC en pacientes AINE (53,7%) respecto a pacientes BL (34,8%) con una  $p=0,016$ . En este caso, se confirmó de nuevo la significación al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,018.

### 5.3.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS Y DIPLIOTIPOS EN PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y A AINE

#### GEN TNFA (-308/-238)

En el análisis de haplotipos del gen *TNFA* (posiciones -308/-238), se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los pacientes con hipersensibilidad a BL y aquellos con hipersensibilidad a AINE (Tabla 34). En concreto, el haplotipo GG aparecía en mayor proporción en los pacientes hipersensibles a BL y el haplotipo AG en los que presentaban hipersensibilidad a AINE. Para el haplotipo GG el poder estadístico alcanzó el 81% con un FPRP de 12,2% para una probabilidad *a priori* del 0,01%. En el caso del haplotipo AG, el poder estadístico fue de un 70% con un FPRP de 12,8% para una probabilidad *a priori* del 0,1%.

**Tabla 34.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *TNFA* (-308/-238).

HAPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES BL	FRECUENCIA PACIENTES AINE	p-Valor	OR
<b>AG</b>	10,5%	24,9%	$p<0,001$	OR: 2,81 (1,57-5,02)
<b>GG</b>	84,7%	66,7%	$p<0,001$	OR: 0,35 (0,21-0,58)

Estas asociaciones se pusieron de manifiesto con el estudio de diplotipos de ambos polimorfismos (-308/-238), en el que el diplotipo GG GG se observó con más frecuencia en la hipersensibilidad a BL (76,8% vs 46,4%), con una  $p<0,001$  y un poder estadístico de un 99%. Por el contrario, el diplotipo AG GG se encontró en una mayor proporción en

pacientes con hipersensibilidad a AINE (32,1% vs 13,7%) con una  $p < 0,001$  y el poder estadístico alcanzó el 82%. Se confirmaron ambas asociaciones al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión  $< 0,001$  en el diplotipo GG GG y de 0,004 en el diplotipo AG GG.

### GEN IL4 (-1098/-590/-33)

Al comparar los haplotipos del gen *IL4* entre pacientes con hipersensibilidad a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE se encontró una asociación estadísticamente significativa con los haplotipos TCC y GCC como se muestra en la tabla 35. Para el haplotipo TCC el poder estadístico alcanzó el 83% con un FPRP de 6,5% para una probabilidad *a priori* del 0,01%. En el caso del haplotipo GCC, el poder estadístico fue de un 52% con un FPRP de 2,3% para una probabilidad *a priori* del 10%

**Tabla 35.** Haplotipos significativos en el análisis del gen *IL4*.

HAPLOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES BL	FRECUENCIA PACIENTES AINE	p-Valor	OR
GCC	4%	11,9%	$p=0,005$	OR: 3,29 (1,35-8,01)
TCC	79,5%	59,1%	$p < 0,001$	OR: 0,38 (0,23-0,61)

En el análisis de diplotipos del gen *IL4* (posiciones-1098/-590/-33), se observó una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre el diplotipo TCC TCC y las reacciones de hipersensibilidad a BL con un poder estadístico superior al 98%. Este análisis también reflejó una asociación intensamente significativa ( $p=0,001$ ) entre el diplotipo TCC GCC y la hipersensibilidad a AINE y el poder estadístico alcanza el 95%. Ambas asociaciones se confirmaron al ajustar por edad y sexo obteniéndose una  $p$  de la regresión  $< 0,001$  en el diplotipo TCC TCC y de 0,001 en el diplotipo TCC GCC.

**GEN IL10 (-1082/-819/-592)**

En el análisis de haplotipos del gen *IL10* (posiciones -1082/-819/-592), no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar pacientes con hipersensibilidad a BL y con hipersensibilidad a AINE.

Al comparar los diplotipos del gen *IL10* entre la hipersensibilidad a BL y a AINE, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,003$ ) (Tabla 36). Al ajustar por edad y sexo mediante regresión logística, se confirmó la significación para el diplotipo ACC GCC y para el diplotipo GCC GCC obteniéndose una  $p$  de la regresión de 0,007 y 0,032 respectivamente.

**Tabla 36.** Diplotipos significativos en el análisis del gen *IL10*.

DILOTIPO	FRECUENCIA PACIENTES BL	FRECUENCIA PACIENTES AINE	p-Valor	PODER
<b>ACC GCC</b>	20,9%	44,9%	0,003	80%
<b>GCC GCC</b>	20,9%	6,1%	0,003	63%





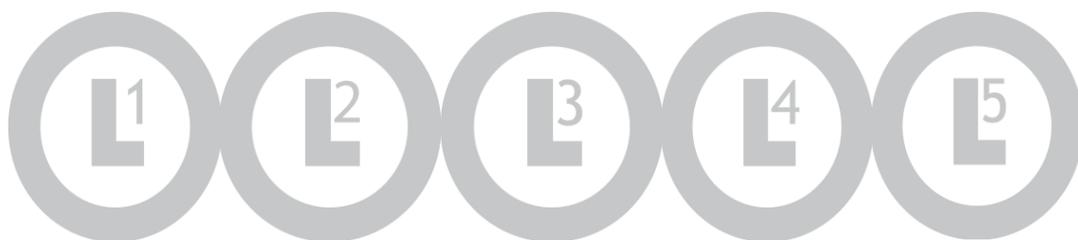
UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# DISCUSIÓN

---

---





## 6. DISCVSIÓN

En este estudio se han analizado 22 polimorfismos correspondientes a 13 genes en 443 individuos, 202 de los cuales corresponden a individuos del estudio de hipersensibilidad a beta-lactámicos, mientras que los 241 restantes corresponden al estudio de hipersensibilidad a antiinflamatorios no esteroideos. En total, se han tenido en cuenta múltiples variables tanto fenotípicas como genotípicas, 103 en la población de BL y 160 en la población de AINE, lo que supone el análisis y manejo de 59.366 datos. A continuación se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de los grupos de individuos con cada una de las citocinas incluidas en el estudio.

### *6.1 GRUPO DE INDIVIDUOS CON HIPERSENSIBILIDAD A LOS BETA-LACTÁMICOS*

En relación a los 98 pacientes alérgicos a los BL, todos presentaban reacciones de hipersensibilidad inmediata a los BL demostrada mediante el estudio alergológico protocolizado. En estos pacientes se han evaluado una serie de características clínicas como el tipo de reacción presentada (urticaria, anafilaxia, exantema, otra), así como el antibiótico BL responsable de la hipersensibilidad inmediata. La reacción más frecuente entre los pacientes con hipersensibilidad a BL fue la urticaria y el antibiótico más frecuente que desencadena este tipo de reacciones fueron las aminopenicilinas.

En relación a los 104 controles del estudio de BL, todos ellos fueron estudiados por reacción adversa a un antibiótico BL, obteniendo un resultado negativo en el estudio y con tolerancia comprobada a este tipo de antibióticos.

En este grupo de individuos con hipersensibilidad a BL, hemos encontrado escasas asociaciones entre los polimorfismos de los genes de citocinas analizados y las diversas variables clínicas. La gran mayoría de nuestros resultados han sido asociaciones entre algunos polimorfismos (1970 *IL1R1*, 874 *IFNG*, -330 *IL2*, -590 *IL4*, -33 *IL4* y 1902 *IL4RA*) y las pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes, así como la sensibilización a uno o varios grupos de aeroalérgenos. Nuestros resultados confirman los datos publicados en la bibliografía, apoyando la idea de la influencia de la atopia en los estudios de asociación génica identificada en las reacciones de hipersensibilidad inmediata a los BL.

## GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1

La IL-1 es una citocina proinflamatoria que presenta dos formas codificadas por dos genes distintos, *IL1 $\alpha$*  e *IL1 $\beta$* , cuyas actividades biológicas son prácticamente indistinguibles. Desempeña un papel fundamental en la presentación antigénica y en la respuesta inflamatoria inmediata.

En este estudio, se han analizado varios polimorfismos presentes en la agrupación de la IL-1: un polimorfismo del gen *IL1A* (rs1800587), dos polimorfismos de *IL1B* (rs16944 y rs1143634), un polimorfismo del gen del receptor de tipo I de la IL-1 (*IL1R1*) (rs2234650) y un polimorfismo del gen del antagonista del receptor de la IL-1 (*IL1RN*) (rs315952).

Hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo del gen del receptor de tipo I de la IL-1 (*IL1R1*) (rs2234650) con la presencia de pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes y con la sensibilización a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados). Este polimorfismo consiste en una mutación sinónima, en la que un cambio de una C por una T no modifica el aminoácido codificado.

En la bibliografía, cabe destacar algunos estudios que analizan una posible relación de este polimorfismo pst1 1970 *IL1R1* con diversas enfermedades inmunológicas. Así, ha sido estudiado en pacientes con oftalmopatía de Graves [343], inmunodeficiencia variable común [344] o enfermedad reumática crónica [345], sin que se haya encontrado una asociación significativa. Sin embargo, sí que se ha encontrado una asociación significativa de este polimorfismo con la gravedad de la esclerosis múltiple [346] y la diabetes del tipo I [347]. También se ha encontrado una asociación entre diversos polimorfismos en el gen de *IL1R1* y la osteoartritis [348].

No se encontró una asociación significativa estudiando individualmente los polimorfismos en las posiciones 3962 y -511 del gen *IL1B* en el grupo de individuos con hipersensibilidad a BL, pero sí en el estudio de haplotipos (posiciones -511/3962), en el que el haplotipo TT se encontró significativamente en mayor proporción en los pacientes sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos respecto a los controles.

En la bibliografía, no se ha encontrado ninguna asociación entre polimorfismos en la agrupación de la IL-1 y las reacciones de hipersensibilidad a antibióticos BL, pero sí en relación a la atopía. El polimorfismo en posición 4845 del gen, que codifica la citocina inflamatoria IL-1A, está notablemente asociado con la atopía [349]. Algunos estudios

también han determinado que el complejo de genes de *IL1*, en su conjunto, tendría un efecto en el riesgo de atopía. Karjalainen J. y cols. [350], encuentran una asociación de *IL1A* con las pruebas cutáneas positivas a alérgenos comunes, mientras que en otro estudio [351] dirigido por este mismo grupo, el haplotipo (alelo G 4845G>T *IL1A*/alelo C 3954C>T *IL1B*/2 repeticiones de la secuencia de 86 pb en el intrón 2 VNTR *IL1RN*) contenía los alelos decisivos o las combinaciones alélicas que incrementaban el riesgo de atopía. Finalmente, en un estudio de haplotipos, el haplotipo *IL1B* TT (3962T y -511T) se asoció con la atopía y con el asma moderada-persistente [352].

## GEN DE LA INTERLEUCINA 2

La IL-2 es una citocina que estimula el crecimiento y proliferación de los linfocitos T y otras células inmunitarias, además de inducir la síntesis de otras citocinas y moléculas pro-inflamatorias. En este estudio se han analizado dos polimorfismos del gen *IL2*. El primero de ellos se encuentra en la región promotora, en posición -330, una zona de unión de factores de transcripción. Se ha propuesto que la presencia de este polimorfismo en homocigosis provocaría un incremento en la expresión de la IL-2 [353]. El segundo se encuentra en la región codificante, en la posición 166 y produce una mutación sinónima.

En este estudio hemos encontrado una asociación del polimorfismo en posición -330 con la sensibilización alérgica, siendo el alelo T y el genotipo TT más frecuentes en los pacientes BL polisensibilizados que en los pacientes BL monosensibilizados. En relación a los estudios publicados, destaca el de Christensen y cols. [354], un estudio de asociación en el que se incluyeron un total de 250 familias danesas con enfermedades alérgicas. Este grupo puso de manifiesto que determinados polimorfismos en el gen de *IL2* se asociaban a enfermedades alérgicas y por primera vez se encontró una asociación de estos polimorfismos con la alergia mediada por IgE (prueba de RAST positiva y pruebas cutáneas positivas), tanto en el análisis de los SNP por separado como en el estudio de haplotipos. Los autores encontraron que para el polimorfismo en la región promotora de *IL2* (rs2069762), el alelo G se transmitía con menos frecuencia de lo esperado por azar en individuos atópicos, a diferencia de lo que ocurre con el alelo T. De este modo, han asociado la presencia del alelo T a la generación de un sitio de unión a factores de transcripción TCF11/MafG, relacionados con la regulación negativa de la transcripción, por lo que según el análisis *in silico*, los portadores del alelo T mostrarían una menor expresión de la IL-2, que podría provocar una desviación del equilibrio Th1-Th2 hacia Th2, que es

típico de los individuos con fenotipo atópico (asma, rinitis, dermatitis atópica). Estos resultados parecen ser apoyados por otros estudios, como el de Hoffman y cols. [355], quienes estudiaron los niveles de expresión de la IL-2 en función del genotipo del polimorfismo -330 de *IL2* en células en cultivo. Observaron que la expresión de IL-2 se encontraba sensiblemente aumentada en las células con genotipo GG respecto a las células con los genotipos TG y TT.

Nuestros resultados parecen apoyar el estudio de Christensen y cols, ya que como se ha comentado anteriormente, hemos encontrado una mayor frecuencia del alelo T y del genotipo TT en los pacientes BL polisensibilizados. Probablemente estos pacientes presenten menores niveles de IL-2, que conducen a una desviación Th2 y a un fenotipo atópico en relación a los pacientes BL monosensibilizados en los que la presencia de unos niveles más elevados de IL-2, desencadenen una desviación hacia Th2 más moderada. Sin embargo, en un estudio publicado por el grupo de Nieters y cols. [356], sus resultados mostraron que los individuos homocigotos para el alelo G podían tener un mayor riesgo de rinitis, e, incluso, un trabajo de Matesanz y cols. [357], informó de un efecto opuesto en los niveles de expresión de IL-2 en células portadoras del alelo G, lo que sugiere la posible presencia de otros polimorfismos en esta región promotora que podrían afectar a la regulación del gen *IL2*.

### **GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y LA SUBUNIDAD $\alpha$ DE SU RECEPTOR**

La citocina IL-4 es la molécula responsable de la inhibición del desarrollo de linfocitos Th1 y de la activación de linfocitos Th2. Resulta fundamental en el cambio de isotipo de las células B hacia la producción de IgE y en la inducción de la inflamación. La IL-4 es, junto con IL-13, una citocina muy importante en el desarrollo de la alergia, debido al papel fundamental que desempeña en la inducción de la respuesta de las células Th2 [358], por lo que se trata de un buen gen candidato a ser estudiado. De hecho, es uno de los genes más estudiados en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos en general y en las reacciones alérgicas a antibióticos BL en particular, principalmente en las reacciones inmediatas mediadas por IgE, así como en la atopia. Se ha descrito que los polimorfismos -33 C>T, -590 C>T y -1098 T>G se asociaban con los niveles de IgE total y con las reacciones de hipersensibilidad a antibióticos BL [359, 360, 264, 268].

Otro gen que resulta un candidato ideal asociado con reacciones de hipersensibilidad inmediata a BL y atopia, al participar en la transmisión de señales de la IL-4 e IL-13, por su papel clave en la inflamación alérgica al promover el desarrollo de células Th2 y la producción de IgE, es la subunidad alfa del receptor de la IL-4 (*IL4RA*).

En este estudio, no hemos encontrado ninguna asociación directa de alguno de los polimorfismos de *IL4* con la hipersensibilidad a BL pero sí con la sensibilización a aeroalérgenos. En concreto, el polimorfismo -590 C>T se asoció significativamente con la sensibilización alérgica, el alelo T y el genotipo CT se encontraron con mayor frecuencia en los pacientes BL polisensibilizados. Por otro lado, se ha encontrado una asociación del polimorfismo -33 C>T de *IL4* en los individuos con pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos y en los individuos sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos (monosensibilizados) siendo, en ambos casos, el alelo T y el genotipo CT más frecuentes en los controles que en los pacientes.

En relación a la subunidad alfa del receptor de la IL-4 (*IL4RA*), en este estudio se ha incluido el análisis del polimorfismo en posición 1092. Este polimorfismo (rs1801275) consiste en la sustitución de una A por G, lo que tiene como consecuencia el cambio del aminoácido en posición 576 de glutamina a arginina (Q576R). No hemos encontrado ninguna asociación directa de este polimorfismo con reacciones de hipersensibilidad a BL, pero sí en relación a las pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos comunes en el grupo pacientes con hipersensibilidad a BL. El genotipo mutado GG se encontró con mayor frecuencia en pacientes BL con pruebas cutáneas positivas. Este polimorfismo ya ha sido previamente estudiado en nuestro grupo de trabajo, encontrando una asociación entre la presencia de arginina en posición 576 y valores de IgE más elevados en pacientes con pruebas cutáneas positivas a aeroalérgenos [361], apoyando por tanto estos resultados.

Revisando la bibliografía, el grupo de Yang J y cols. [359] encontraron que determinados SNP en los genes *IL4* e *IL13* desempeñan un papel en la regulación de la IgE específica en pacientes con alergia a penicilinas. Son varios los trabajos publicados por Qiao y cols., y en uno de ellos [360], este grupo encuentra que los niveles de IL-4 e IL-13 se incrementan significativamente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a BL según el grado de positividad de las pruebas cutáneas y realzan el importante papel de estas citocinas en la alergia a las penicilinas. En otro trabajo de este grupo [264], los autores confirman la correlación entre los niveles de IL-4 e IL-13 y los niveles de IgE específica, incrementándose los niveles de estas citocinas a medida que aumenta la positividad de la

IgE específica. Además, Qiao y cols., estudian dos polimorfismos, C589T, del gen *IL4*, y Q576R, del gen *IL4R $\alpha$* , y su posible papel en la alergia a las penicilinas. Encuentran una clara asociación del alelo que codifica glutamina en posición 576 (Q576) de *IL4R $\alpha$*  y las reacciones alérgicas a penicilinas y confirman que este alelo se relaciona con la expresión de IgE específica frente a penicilinas. En relación al otro polimorfismo, C589T de *IL4*, este grupo no encuentra ninguna asociación, a diferencia de otros trabajos previos en los que sí se encontraba una asociación de este polimorfismo con los niveles de IgE y con la alergia a penicilinas. El gen *IL4* se localiza en la región 5q31, rica en genes de citocinas, y, además, en esta región se encuentran varios genes implicados en la regulación de IgE. Una explicación de estos resultados contradictorios es que este polimorfismo es sólo uno de los marcadores que se localizan en esta región 5q31 y que el polimorfismo C589T de *IL4* podría estar ligado a otros genes cercanos. Por tanto, es posible que el polimorfismo de C589T *IL4* influya en los niveles de expresión de la citocina, pero su influencia podría estar afectada por interacciones intergénicas, que deben ser diferentes en las diversas poblaciones.

Guéant-Rodríguez y cols. [273] también han estudiado diferentes polimorfismos de *IL13* e *IL4RA* y han evidenciado que determinadas combinaciones de estos polimorfismos influyen en los niveles de IgE en general y muestran una asociación con reacciones de hipersensibilidad inmediata a los BL. Además, debido a los niveles elevados de IgE total encontrados en esta población, este grupo sugiere seguir investigando la influencia de la atopia en las reacciones alérgicas inmediatas a los BL. En el trabajo publicado por Apter y cols. [268] de nuevo se muestra al gen *IL4* como un importante factor genético, por la asociación de polimorfismos de *IL4* con las reacciones de hipersensibilidad inmediata a las penicilinas, pero en este caso, ellos indican que esa asociación es independiente de la contribución de otros factores. En el 2009 se publicó otro trabajo [265], que relacionaba los polimorfismos (Q576R y I75V) de *IL4R $\alpha$*  y el haplotipo del gen que codifica IL-4R $\alpha$  (Q576/I75) con la alergia a las penicilinas.

Uno de los estudios más recientes, publicado por el grupo de Cornejo-García y cols. [289], vuelve a poner de manifiesto que algunos determinantes de atopia, como la IgE total, IgE específica frente a ácaros y los polimorfismos (I50V y Q551R) de *IL4RA*, son predictores de la alergia inmediata a BL. Estos polimorfismos de *IL4RA* también fueron estudiados en una población italiana [362]. Hay que destacar que la influencia de la sensibilización a aeroalérgenos frecuentes, abre nuevas ideas sobre los mecanismos de hipersensibilidad a BL y podría contribuir a explicar su elevada prevalencia en el sur de Europa.

## GEN DEL INTERFERON GAMMA

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o interferón de tipo II es una citocina esencial en la respuesta innata y adaptativa contra infecciones por virus o bacterias intracelulares, así como en el control de tumores.

Las células T colaboradoras (Th) desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la alergia. Aunque las enfermedades alérgicas se han relacionado con un mayor repuesta Th2, asociada con elevados niveles de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, las evidencias acumuladas han demostrado que la disminución de la respuesta inmune Th1 juega un importante papel en la patogénesis de estas enfermedades y el IFN- $\gamma$  podría actuar como un centro regulador de este proceso [363]. El IFN- $\gamma$  ejerce sus efectos biológicos a través de la unión en la superficie de las células al receptor 1 del IFN- $\gamma$  (*IFNR1*) en combinación con el receptor 2 del IFN- $\gamma$  (*IFNR2*). La unión del IFN- $\gamma$  a su receptor activa una vía de señalización intracelular, que induce la expresión de varios genes incluyendo el factor 1 regulador de IFN- $\gamma$  (*IRF1*).

En nuestro estudio hemos encontrado una asociación del polimorfismo 874 A>T *IFNG* con las pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos y la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos. Se detectó una mayor proporción del alelo A no mutado en pacientes con pruebas cutáneas positivas y en pacientes polisensibilizados respecto a controles.

Debido al importante papel que desempeña esta citocina en la regulación de la respuesta inmune, son muchos los estudios que han analizado la posible asociación de variantes génicas en los distintos genes asociados al IFN- $\gamma$ , *IFNG*, *IFNR1*, *IFNR2* e *IRF1*, y la predisposición a padecer asma o atopia [278, 279, 364]. Un polimorfismo microsatélite en el intrón 1 de *IFNG* (repetición CA), se asoció con asma en niños Japoneses [280]. Khani-Hanjani y cols. [281] comunicaron una asociación intensa entre un polimorfismo microsatélite en el intrón 1 de *IFNG* y la susceptibilidad y gravedad de la artritis reumatoide; sin embargo, Constantin y cols. [282] no lograron confirmar esta asociación. En otro trabajo [283], se demostró que el polimorfismo (Val14Met) del gen *IFNR1* conlleva una desviación Th2, y este cambio incrementaba la susceptibilidad al lupus eritematoso sistémico.

En algunas publicaciones se ha demostrado que el gen *IFNG* y sus genes asociados serían responsables de una predisposición inherente a desarrollar reacciones alérgicas a penicilinas. Gao y cols. [284], llevaron a cabo un estudio en población china, determinando los niveles de IFN- $\gamma$  en el suero de los pacientes con alergia a penicilinas y en sujetos control

y evaluando dos polimorfismos de dos genes, una repetición CA en el primer intrón del gen *IFNG* y un SNP en el codón 14 que codifica el cambio Val/Met en el gen *IFNR1*. Este grupo no pudo encontrar ninguna asociación entre el polimorfismo en el primer intrón del gen *IFNG* y la alergia a las penicilinas. Pravica y cols. [365], demostraron que el alelo 12 en la repetición microsatélite CA se asocia con niveles elevados de IFN- $\gamma$  *in vitro*. Los resultados de Gao y cols. mostraron una asociación entre el alelo 18CA del gen *IFNG* y la urticaria. También encontraron que la frecuencia del alelo que codifica el cambio de metionina por valina en posición 14 en los pacientes con reacciones alérgicas a las penicilinas fue significativamente inferior que en controles sanos, lo que apoya la teoría de su papel protector.

### **GEN DEL FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO $\beta$ 1**

El factor transformador del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) es una citocina reguladora que ejerce importantes efectos sobre el epitelio bronquial, estimulando la fibrosis, la formación de la matriz extracelular y la cicatrización [366].

En este trabajo hemos analizado la posible asociación de dos polimorfismos exónicos, que afectan, respectivamente, a los codones c10 y c25. Ambos polimorfismos provocan un cambio de aminoácido en la secuencia proteica, en concreto prolina por leucina en posición 10 (L10P), cambio que se ha asociado a niveles elevados de traducción de esta citocina [367]; y arginina por prolina en posición 25 (R25P), asociado a una mayor expresión del TGF- $\beta$ 1 en los linfocitos [368].

En nuestro estudio, hemos encontrado una asociación del polimorfismo c25 *TGFB1* con la hipersensibilidad a BL, encontrando una mayor proporción del alelo C en pacientes respecto a controles. Sin embargo, el poder fue escaso. En el análisis de diplotipos del gen *TGFB1*, se encontró una asociación del diplotipo TG CG con la presencia de asma en el grupo de individuos con hipersensibilidad a BL. Así, en la bibliografía, ambos polimorfismos se han asociado a la hiperreactividad bronquial [369] y a la predisposición al asma [370, 371], y no se ha descrito ninguna asociación con las reacciones de hipersensibilidad a BL.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 10

La IL-10 es una citocina que desempeña un papel muy importante en la inmunorregulación y la inflamación. Tiene un papel crucial en la enfermedad alérgica mediante la regulación de citocinas y la producción de anticuerpos. La IL-10 inhibe numerosas citocinas asociadas con la inmunidad celular y la alergia, mientras que estimula la respuesta inmune humoral. Se han descrito varios polimorfismos en la región promotora del gen *IL10* que podrían tener relación con los niveles de expresión de esta citocina, entre ellos los tres incluidos en este trabajo, en las posiciones -1082, -819 y -592 [372]. En este estudio no hemos encontrado ninguna asociación entre los polimorfismos de *IL10* y la hipersensibilidad a BL, pese a ser una citocina que desempeña un importante papel en la alergia a penicilinas como así lo corroboran algunos estudios que se citan a continuación.

Recientes estudios de asociación han tratado de relacionar polimorfismos en la región promotora de *IL10* con el riesgo de desarrollar hipersensibilidad a los BL. Así, Guglielmi y cols. [269] encontraron que las mujeres atópicas homocigotas o heterocigotas para el haplotipo -819T/-592A de *IL10* presentaban un elevado riesgo de desarrollar reacciones alérgicas a BL mediadas por IgE. Estos dos alelos están siempre relacionados con el alelo A del polimorfismo en la posición -1082 de *IL10*, que es el responsable de una baja expresión de esta citocina. En el estudio de Qiao y cols. [270], los resultados mostraron que los pacientes con IgE o con IgG específica positiva frente a BL presentaban niveles bajos de IL-10 en relación al grupo control o al grupo con anticuerpos negativos. Por tanto, parece que el bajo nivel de IL-10 reduce el control sobre la producción de citocinas como IL-4 e IL-13 y estas citocinas incrementan la producción de anticuerpos específicos. El grupo [270] también encontró que el polimorfismo de la región promotora -1082 A>G de *IL10* se asociaba con el nivel de IgE específica en los pacientes con alergia a penicilinas, y que el polimorfismo -819 C>T se asociaba con IgG específica en la alergia a penicilinas, por ajuste en la secreción de IL-10. Los autores sugieren que la IL-10 es una citocina que juega un importante papel en el balance inmune y que tiene una estrecha relación con la producción de anticuerpos específicos en la alergia a penicilinas. Qiao y cols. al igual que otros autores apuntan el importante papel de IL-10 en la alergia a penicilinas, aunque el mecanismo resulta todavía desconocido.

En definitiva, como se comentó al principio de este grupo, las asociaciones identificadas en este estudio entre SNP de genes de citocinas e hipersensibilidad a BL son muy escasas, y en la mayoría de los casos se limitan a variables relacionadas con la atopia,

poniendo de manifiesto la influencia de la sensibilización a aeroalérgenos frecuentes en los mecanismos de hipersensibilidad inmediata a BL.

## *6.2 GRUPO DE INDIVIDUOS CON HIPERSENSIBILIDAD A LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS*

En relación a los 85 pacientes con hipersensibilidad a AINE presentaban EREA (enfermedad respiratoria exacerbada por AINE), 71 de los cuáles presentan como sintomatología respiratoria, rinitis y asma, producidas por los AINE en pacientes que tenían como patología respiratoria de base poliposis nasosinusal y asma. Por otro lado, 12 de los pacientes presentaban solamente asma bronquial como patología de base exacerbada por los AINE y sólo 2 de los pacientes tenían sintomatología respiratoria nasal exacerbada por los AINE con poliposis nasosinusal como única patología respiratoria de base.

En relación a los 156 controles utilizados en este grupo, ninguno de ellos presentaba síntomas o antecedentes de asma, poliposis nasosinusal, hipersensibilidad a AINE o alergia. Además todos ellos presentaron un resultado negativo en las pruebas cutáneas con aeroalérgenos comunes.

En el grupo de individuos con hipersensibilidad a los AINE hemos encontrado asociaciones significativas con una gran cantidad de polimorfismos de diversas citocinas, no sólo en el estudio de pacientes con hipersensibilidad a AINE frente a controles, sino con distintas variables clínicas: poliposis, asma, tríada del AAS. Parece que el marcado componente inflamatorio subyacente en todas estas patologías podría presentar asociación con los genes que codifican citocinas moduladoras de procesos inflamatorios que contribuyen a la patogénesis de estas enfermedades como en el caso de la agrupación (*cluster*) de los genes de *IL1*, *IL12*, *IL4*, *IL10* y *TNFA*. En este grupo también se ha encontrado un pequeño porcentaje de asociaciones significativas entre polimorfismos de genes de citocinas y la sensibilización a aeroalérgenos. Quizás esto pueda ser debido a que la atopia puede ser un factor de predisposición en la hipersensibilidad a AINE con reacciones a múltiples AINE [373].

## GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1

La agrupación de genes de la IL-1, se localiza en el cromosoma 2 y contiene genes que codifican citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias, incluyendo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra y varias citocinas nuevas denominadas IL-1F5 e IL-1F10. Las citocinas proinflamatorias IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  están involucradas en el aumento de la inflamación y en la defensa del huésped. La molécula antiinflamatoria IL-1Ra contrarresta la función de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas citocinas son producidas por una variedad de células, como monocitos, macrófagos y queratinocitos. Todos los genes de la familia de la IL-1 son polimórficos y varios de estos polimorfismos han sido asociados ya sea con la susceptibilidad o ya sea con la gravedad de distintas enfermedades inflamatorias [374].

Como ya se ha indicado en el caso del grupo de pacientes con hipersensibilidad a los BL, se han analizado varios polimorfismos presentes en la agrupación de la IL-1 en este trabajo: un polimorfismo del gen *IL1A* (rs1800587), dos polimorfismos de *IL1B* (rs16944 y rs1143634), un polimorfismo del gen del receptor de tipo I de la IL-1 (*IL1R1*) (rs2234650) y un polimorfismo del gen del antagonista del receptor de la IL-1 (*IL1RN*) (rs315952).

En este trabajo no se ha encontrado ninguna asociación directa estadísticamente significativa del polimorfismo rs1143634 del gen *IL1B* en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE pero sí en los subgrupos clínicos: presencia de poliposis, de tríada del AAS y sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos. Este polimorfismo se encuentra en una región codificante (posición 3962), en la que un cambio de una C por una T produce una mutación sinónima, es decir, no modifica el aminoácido codificado. En todos los casos, se encontró una mayor proporción del genotipo TC en los pacientes que en los controles. Además, en el análisis del polimorfismo del gen del antagonista del receptor de la IL-1 (*MspI* 11100/*IL1RN*), en el que se produce una mutación sinónima debido a un cambio de una T por una C, se detectó una cierta significación con la variable sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos en el grupo de individuos con hipersensibilidad a AINE. El genotipo GG se encontró con mayor frecuencia en los pacientes polisensibilizados que en los controles. Si bien los poderes estadísticos de estas asociaciones no alcanzaron el 80%.

En relación a los polimorfismos de la agrupación de la IL-1, aparecen asociados principalmente a enfermedades con un marcado componente inflamatorio como el asma y la poliposis nasal. Cabe destacar el estudio de Sekigawa y cols. [375] en el que se relacionó un polimorfismo de *IL1* con un subtipo de asma inducida por antiinflamatorios no

esteroideos, en concreto el asma inducida por aspirina (AIA). Se identificó un polimorfismo de *IL1R2* mediante análisis de expresión de genes de la poliposis nasal en AIA, sugiriendo que podría ser un gen candidato en la susceptibilidad a rinitis-asma inducida por aspirina. Mahdavian y colaboradores [376], detectaron una asociación de los SNP -889 *IL1A*, -511 *IL1B* y MspI 11100 *IL1RN* y la presencia de asma en una población Iraní, que incluyó a 140 controles y 60 pacientes con asma.

Además, se han asociados diversos polimorfismos del gen *IL1A* con la poliposis nasal [377] y con la rinosinusitis crónica con o sin poliposis nasal [378]. También el polimorfismo en posición -511 de *IL1B* ha sido asociado con la poliposis nasosinusal, tanto en presencia [377] como en ausencia de asma [379].

Ya hemos citado en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a BL la asociación de los polimorfismos de la agrupación cluster de la IL-1 con la atopia [349, 350, 351], así, en este grupo de individuos con hipersensibilidad a AINE, también hemos encontrado como se describe previamente asociación con la sensibilización alérgica.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 2

La IL-2 es una citocina proinflamatoria derivada de células Th1. Está involucrada en la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK. Polimorfismos de la región promotora de *IL2* se han asociado con alteraciones en la producción de IL-2 o han sido identificados como marcadores pronóstico de varias enfermedades infecciosas. Como se ha dicho, en este estudio se han analizado dos polimorfismos del gen *IL2*. El primero de ellos, en la posición -330, se encuentra en la región promotora, una zona de unión de factores de transcripción. Se ha propuesto que la presencia de este polimorfismo en homocigosis tiene como consecuencia un incremento en la expresión de la IL-2 [353]. El segundo, en la posición 166, se encuentra en la región codificante y produce una mutación sinónima. Este cambio resulta interesante puesto que se encuentra en una región potenciadora del ajuste exónico (ESE: *exonic splicing enhancer*), por lo que este tipo de polimorfismos podrían jugar un papel fundamental en la expresión génica.

En el grupo de individuos con hipersensibilidad a los AINE no se encontró ninguna asociación con el polimorfismo en posición -330 del gen *IL2*. En relación con el polimorfismo en posición 166, tampoco se encontró ninguna asociación en el grupo de pacientes con

hipersensibilidad a AINE pero si encontramos asociación en el subgrupo clínico: sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos. Se observó una mayor frecuencia del alelo mutado T y del genotipo mutado en homocigosis en los pacientes polisensibilizados respecto a los controles. De nuevo hay que citar el estudio de Christensen y cols. [354] ya mencionado en la discusión de resultados del grupo de individuos con hipersensibilidad a los BL. Estos autores encontraron una asociación de este polimorfismo 166 de *IL2* con la positividad de las pruebas cutáneas, y llevaron a cabo un estudio *in silico* de la secuencia de este gen, llegando a la conclusión de que la presencia del alelo G podría inactivar un sitio potencial de pseudoajuste, y así contribuir a un mejor ajuste del transcrito normal. Estos resultados no han sido confirmados por otros autores [380, 381], por lo que es muy probable que otros factores estén influyendo en dicha expresión, dando lugar a resultados contradictorios. Además de enfermedades alérgicas y atopia, polimorfismos del gen de *IL2* también han sido asociados con otras patologías como la periodontitis crónica [382, 383] y la artritis reumatoide [384].

Con respecto al estudio de haplotipos en el grupo de individuos con hipersensibilidad a los AINE, al analizar los dos polimorfismos de *IL2* estudiados (-330/166) encontramos una asociación estadísticamente significativa del haplotipo TT con la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos, lo que podría indicar su asociación a la respuesta mediada por IgE. En el análisis de diplotipos del gen *IL2* (posiciones -330/166), se obtuvo una asociación estadísticamente significativa del diplotipo TT TT con la sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos (polisensibilizados). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Christensen y cols. [354], quienes encontraron que este haplotipo TT se transmitía con mayor frecuencia en individuos con rasgo de atopia, como la dermatitis atópica.

## **GEN DE LA INTERLEUCINA 4 Y DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DE SU RECEPTOR**

La IL-4 desempeña un papel crítico en la respuesta inmune, actuando como factor de crecimiento de las células Th2 e induciendo a la producción de IgE, al favorecer el cambio de isotipo en los linfocitos B. Ya se ha citado que desempeña un papel central en el desarrollo de asma alérgica y atopia y que las variaciones génicas de *IL4* pueden alterar su transcripción y traducción y su posible influencia en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. En el presente estudio se han incluido polimorfismos en las posiciones -33 C>T, -590 C>T y -1098 T>G que han sido asociados con niveles totales de IgE, asma y otros fenotipos alérgicos en diferentes poblaciones [385, 386, 387].

En el presente estudio, hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa del polimorfismo -1098 T>G del gen de *IL4*, no solamente en el grupo global de pacientes con hipersensibilidad a AINE sino también en los subgrupos de pacientes con presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS. También resultó estadísticamente muy significativa la asociación del polimorfismo -590 C>T de *IL4* en el análisis del grupo global de pacientes con hipersensibilidad a AINE, así como en los subgrupos que presentaban las variables clínicas poliposis, asma y tríada del AAS.

En relación a los polimorfismos de *IL4*, son muchos los estudios publicados que encuentran asociación con el asma [388, 389, 390, 391]. Sin embargo, en un estudio reciente [392] Liang y cols. no encontraron ninguna asociación entre polimorfismos de *IL4* y la susceptibilidad al asma. El polimorfismo -590 C>T (rs2243250) también ha sido asociado con el asma atópica [393] y como posible factor de riesgo del desarrollo de alergia atópica [394]. Pero resulta muy interesante en este grupo la influencia de los polimorfismos de *IL4* en los asmáticos con hipersensibilidad a la aspirina (AIA). La aspirina reprime la activación del factor nuclear K activador de las células B (NF-KB) e inhibe la producción de IL-4 e IL-13 inducida por la activación de STAT6 [395]. En un estudio realizado en una población coreana [319] se observó que la frecuencia del alelo T del polimorfismo -589 C>T fue más elevada en el grupo con AIA que en el grupo de asmáticos tolerantes a la aspirina. Parece que la caracterización funcional de este SNP indica que las proteínas de unión  $\beta$  potenciadoras de la secuencia CCAAT y el factor nuclear activador de células T (NF-AT) actúan como factores de transcripción que se unen en esta posición, y que la aspirina favorecería esta unión, modificando la expresión de la proteína. Estos datos podrían indicar que la aspirina regularía la expresión de la IL-4 de forma alelo específica mediante la modificación de la capacidad de unión de los factores de transcripción, elementos reguladores clave en la región promotora de *IL4*, dando lugar a la hipersensibilidad a la aspirina y otros AINE.

Así, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Kim y cols. en población coreana [319]: en nuestro estudio encontramos una intensa asociación del polimorfismo -590 C>T, con una mayor frecuencia de portadores del alelo T en los pacientes con hipersensibilidad a AINE, con asma y con poliposis. Estos datos sugieren el importante papel de la IL-4 en el asma y fenotipos asociados al asma y la influencia de la aspirina en la expresión de IL-4 de una manera alelo específica, lo que conduciría a la hipersensibilidad a AINE.

También se han asociado polimorfismos de *IL4* con la rinosinusitis crónica [396] y con la poliposis nasal [397, 398]. En un estudio realizado en población china [396], los autores encontraron que determinados polimorfismos de *IL4* (-590C>T y -33C>T) se asociaban con la susceptibilidad a la rinosinusitis crónica y que el haplotipo de *IL4* TT (-33T y -590T) es un factor de riesgo de rinosinusitis crónica. En otro estudio [397] se sugiere que el alelo T del polimorfismo -590 del gen *IL4* está asociado con un mecanismo protector frente a la poliposis nasal en población coreana. Otros autores [398] sugieren que el polimorfismo -590C>T se asocia con la expresión de la 5-lipooxigenasa (5-LO) en los pacientes con poliposis nasal. Una disregulación en la expresión de 5-LO (enzima que participa en el metabolismo del ácido araquidónico), puede contribuir a la patogenia de la poliposis nasal y de las reacciones de hipersensibilidad a AINE. Finalmente, se han encontrado asociaciones de polimorfismos de *IL4* con otras patologías de base inflamatoria, como la inmunodeficiencia variable común [399], la artritis reumatoide [400] y la periodontitis crónica [401].

En el análisis de haplotipos y diplotipos de las posiciones -1098/-590/-33 del gen *IL4*, detectamos una intensa asociación estadísticamente significativa del haplotipo TCC en el grupo global de pacientes con hipersensibilidad a los AINE, así como en los subgrupos que presentaban las variables clínicas: presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS. En todos los casos, el haplotipo TCC resultó más frecuente en los controles que en los pacientes. Previamente, este haplotipo TCC también fue asociado en el grupo control frente a pacientes con inmunodeficiencia variable común [399]. Con respecto al estudio de diplotipos, encontramos que la combinación TCC TCC fue significativamente más frecuente en los controles que en grupo de pacientes con hipersensibilidad a los AINE, y también resultó más frecuente en controles que en pacientes con las variables: presencia de asma, de poliposis y de tríada del AAS.

En este estudio, como ya se ha indicado en el grupo de individuos con hipersensibilidad a BL, se ha incluido el análisis del polimorfismo en posición 1092 del gen de la subunidad alfa del receptor de la interleucina 4 (*IL4RA*). Se trata de una molécula común a los receptores de IL-4 e IL-13, presentes en las membranas plasmáticas de los linfocitos T activados, y es responsable de la similitud de sus papeles biológicos. Este polimorfismo consiste en la sustitución de una A por G, lo que tiene como consecuencia el cambio del aminoácido 576 de glutamina a arginina (Q576R). En nuestro grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE no hemos encontrado ninguna asociación con este

polimorfismo, pero en la bibliografía se ha asociado con una mayor respuesta a la IL-4 en pacientes atópicos [263] y con asma alérgica [402].

## GEN DE LA INTERLEUCINA 6

La interleucina 6 (IL-6) es un importante mediador de la respuesta de fase aguda y la inflamación crónica, y ejerce efectos pro- y anti-inflamatorios gracias a la unión con su receptor (IL6R $\alpha$ ) [403]. Existen estudios que proponen que determinados polimorfismos presentes en la región promotora del gen *IL6* influyen en los niveles de expresión de la citocina [404, 405], con el consecuente efecto sobre las respuestas inmunológicas mediadas por la IL-6. En nuestra población de individuos con hipersensibilidad a los AINE, se ha incluido el polimorfismo nt565 G>A de *IL6*, detectando una mayor presencia del alelo A y del genotipo AA en los controles que en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE. También se ha encontrado una asociación de este polimorfismo nt565 G>A de *IL6* con la variable clínica asma en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas. Pero, hay que destacar que en ningún caso el poder estadístico alcanzó el 80%. Este polimorfismo ha sido previamente asociado a fenómenos inflamatorios como la diabetes de tipo I [406] o el síndrome metabólico [407], y no se ha encontrado asociación con la enfermedad de Alzheimer [408] ni con la artritis reumatoide [409].

En este estudio también se ha incluido otro polimorfismo en la región promotora, -174 G>C del gen *IL6*, pero no se encontró ninguna asociación en nuestro grupo de individuos con hipersensibilidad a los AINE. En otros estudios [410, 411, 412] se ha encontrado una menor frecuencia del alelo C de este polimorfismo en los pacientes respecto a los controles, lo que podría indicar que la presencia de la mutación podría ejercer un cierto efecto protector en los controles, quizás debido a una disminución en la producción de IL-6. Esta situación se ha confirmado en otros estudios en los que la presencia del alelo C en posición -174 se ha asociado a niveles disminuidos de IL-6 en controles [413, 414] y se ha postulado que la presencia de este polimorfismo produciría cambios en la expresión que provocarían una disregulación de la síntesis de esta citocina, lo que tendría como consecuencia una disminución de la respuesta inflamatoria Th2. Parece que son necesarios más estudios que aumenten el tamaño de las muestras para confirmar el efecto protector de este polimorfismo.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 10

La IL-10 es una potente molécula inmunomoduladora que inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias y favorece la expresión de células B, su producción y diferenciación [415]. Se han descrito varios polimorfismos en la región promotora del gen *IL10* que podrían tener relación con los niveles de expresión de esta citocina, entre ellos los tres incluidos en este estudio, en las posiciones -1082, -819 y -592 [372]. En nuestro estudio, en la población de individuos con hipersensibilidad a los AINE, hemos encontrado una intensa asociación de los tres polimorfismos con la hipersensibilidad a AINE y con los subfenotipos de poliposis, de asma y de tríada del AAS.

Numerosos estudios publicados encuentran asociación entre polimorfismos de *IL10*, principalmente en la región promotora, con patologías como el asma en diferentes poblaciones [416, 417, 418, 419, 332], con la exacerbación del asma por sensibilización a ácaros [420] y con la EPOC [421, 422]. Nos centraremos ahora en la posible influencia del gen *IL10* en la sensibilización a la aspirina de los pacientes asmáticos y de los pacientes con urticaria. Destaca el trabajo publicado por Kim y cols. [315], en el que identifican al alelo G del polimorfismo -1082 de *IL10* como un factor de riesgo de la hipersensibilidad a la aspirina en asmáticos (AIA) e indican que este alelo está relacionado con un aumento en los niveles de expresión de IL-10. En conjunto, sus resultados indican que las alteraciones en la producción de IL-10 causadas por el polimorfismo -1082 A>G, contribuyen al desarrollo de hipersensibilidad a la aspirina en asmáticos con rinosinusitis y que este efecto se vería fortalecido mediante interacciones génicas entre polimorfismos -1082 A>G de *IL10* y -509 C>T de *TGFβ1*. Otro trabajo a destacar en los fenotipos de hipersensibilidad a la aspirina es el de Palikhe y cols. [333], en el que se identificó una asociación del alelo mutado T del polimorfismo -819 C>T del gen *IL10*, sugiriendo que este alelo es un factor de riesgo y contribuye al desarrollo de hipersensibilidad a aspirina en pacientes con urticaria, incluyendo el tipo agudo (AIAU) y el tipo crónico (AICU).

Nuestra población de pacientes con hipersensibilidad a los AINE padece patología respiratoria, asma y rinitis exacerbada por los AINE, con patología respiratoria de base (poliposis nasosinusal y asma bronquial), como ya se ha descrito y, según nuestros resultados y los publicados en el trabajo de Kim y cols., parece que el peso de las asociaciones descritas en los polimorfismos de *IL10* y su interacción con polimorfismos de *TGFβ1* subyace en la poliposis nasosinusal más que en la patología asmática. Parece que la interacción gen-gen entre los polimorfismos de *IL10* y *TGFβ1* contribuye a la continua

inflamación de la mucosa nasal o del tejido del pólipa contribuyendo a la hipersensibilidad a la aspirina en asmáticos con rinosinusitis y no así en asmáticos hipersensibles a la aspirina aislados. Por tanto, la presencia de ciertos alelos en la región promotora de *IL10*, podría considerarse un factor de riesgo de desarrollo de hipersensibilidad a aspirina en pacientes asmáticos (AIA) e incluso interacciones intergénicas entre polimorfismos de *IL10* y *TGF $\beta$ 1* podrían contribuir al desarrollo de AIA en pacientes con rinosinusitis. Además, estos polimorfismos, mediante la modificación de la unión de ciertos factores de transcripción, regularían los niveles de expresión de IL-10, con el consecuente efecto sobre las respuestas inmunológicas mediadas por esta citocina.

En el estudio de diplotipos encontramos una asociación estadísticamente significativa de ATA GCC (posiciones -1082/-819/-592) en el grupo de los pacientes con hipersensibilidad a AINE, así como en los subgrupos de poliposis, de asma y de tríada del AAS. En un estudio de haplotipos en polimorfismos localizados en la región promotora del gen *IL10* [423] coincidiendo con los analizados en nuestro estudio, sus autores sugerían que el haplotipo GCC (G-1082/C-819/C-592) se asociaba con una elevada producción de IL-10, mientras que el haplotipo ATA (A-1082/T-819/A-592) estaba asociado a bajos niveles de expresión de IL-10, sugiriendo que estos polimorfismos podrían interferir en la unión de factores de transcripción, regulando por tanto los niveles de expresión de la citocina. De este modo, los polimorfismos -1082 A>G y -592 C>A se encuentran en una región a la que se unen factores de transcripción que dan lugar a una represión de la expresión de IL-10, mientras que el polimorfismo -819 C>T está dentro de una región a la que se unen factores de transcripción que favorecen la activación de la expresión de IL-10. Sin embargo, parece claro que la secreción de IL-10 no sólo se debe atribuir a variaciones en los polimorfismos y haplotipos en la región promotora, sino que se piensa que otros factores adicionales intervienen en su producción.

## GEN DE LA INTERLEUCINA 12

La IL-12 es una citocina proinflamatoria que actúa como un inductor esencial en el desarrollo de la respuesta Th1, induciendo un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$ , suprimiendo, de este modo, la respuesta Th2. Existen varios estudios que muestran la posible influencia de polimorfismos en su región promotora, que podrían ser responsables de alteraciones en sus niveles de expresión [424, 425, 426]. En nuestro caso, el estudio del polimorfismo en posición -1188 del gen *IL12B* no mostró una asociación en el grupo global

de pacientes con hipersensibilidad a AINE pero sí dentro de este grupo, con distintas variables clínicas: poliposis y asma y sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos. En el caso de los pacientes con poliposis y asma, encontramos una mayor frecuencia del alelo mutado C y del genotipo AC. En los pacientes polisensibilizados, se observó una mayor proporción del alelo mutado C y del genotipo CC respecto a controles.

Nuestros resultados coinciden con el estudio de Padrón-Morales y cols. [352], que encontró una intensa asociación entre el polimorfismo -1188 de *IL12B* y el asma atópica, siendo el genotipo AC el que se asociaba con el riesgo de asma. Además, estudios previos [427] han destacado el papel del SNP de la región promotora -1188 del gen de *IL12B* en la expresión del gen. En concreto, han resaltado que el genotipo heterocigoto se asocia con una reducción de la transcripción del gen de *IL12* y, por tanto, con una disminución de los niveles de IL-12, y que se asocia a su vez con la presencia de asma y sobre todo con una predisposición al asma grave. Estos datos sugieren que el SNP de la región promotora de *IL12B*, conduce a una reducción en los niveles de expresión de la citocina, con la consecuente activación de la respuesta Th2, lo que desencadenaría la sensibilización a varios aeroalérgenos comunes. Sin embargo, esta hipótesis es controvertida, ya que para otros autores, como Khoo y cols. [428], el polimorfismo -1188 de la región promotora de *IL12B* no se asoció con la susceptibilidad y gravedad del asma y la atopia en una población australiana; para el grupo de Tug y cols. [429], los efectos del polimorfismo de *IL12B* en el asma, la rinitis alérgica, el asma familiar, la eosinofilia y los niveles de IgE no son relevantes. En otro estudio, realizado en población japonesa [430], no se encontró ninguna asociación entre polimorfismos en el gen de *IL12B* y fenotipos de atopia. Sin embargo, los autores sugirieron que este polimorfismo debe influir en el desarrollo de otras enfermedades o infecciones inmunes por la importancia biológica de la IL-12. La falta de acuerdo y la aparición de resultados contradictorios, nos lleva a pensar que se necesita investigar esta hipótesis en muestras mayores.

En relación a polimorfismos en el gen de *IL12B* que se asocien con reacciones de hipersensibilidad a AINE, no hemos encontrado ningún estudio en la bibliografía y es que como ya se ha citado previamente, el gen de *IL12B* es un potencial candidato para asma [352, 427]. Se localiza en el cromosoma 5q31-33 y esta región ha sido asociada con niveles de eosinófilos en la circulación, diferenciación a una respuesta Th2, atopia y niveles totales de IgE en suero [431].

## GEN DEL INTERFERON GAMMA

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), también llamado interferón inmunitario o de tipo II, es un tipo de citocina producida por los linfocitos T y las células citolíticas espontáneas (*natural killer*, NK) cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las respuestas celulares adaptativas, previamente interviene en el reclutamiento de monocitos de la circulación.

En nuestro estudio hemos encontrado una asociación del polimorfismo 874 A>T del gen *IFNG* con la poliposis y con la tríada del AAS en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE. Encontramos una mayor frecuencia del genotipo TA en pacientes respecto a controles. El gen *IFNG* se localiza en el cromosoma 12 y parece que esta región del genoma se ha asociado con el asma a través de numerosos estudios de ligamiento. Por ello, son numerosos los estudios que se centran en la posible influencia de las variantes génicas de *IFNG* en el desarrollo de fenotipos relacionados con el asma y alteraciones en los niveles de expresión de la citocina. Li y cols. (2007) encontraron que el polimorfismo A874T de *IFNG* se asociaba de forma significativa con el asma [432]. Además, estos autores consideraron que este polimorfismo influía directamente en el nivel de producción de IFN- $\gamma$ , hecho apoyado también por otros autores [433]. Los genotipos AA, AT y TT del polimorfismo en posición 874 conferirían así tres fenotipos diferentes, bajo, intermedio y alto, respectivamente, en el nivel de producción de IFN- $\gamma$ . Posteriormente, Hussein y cols. [434] pusieron de manifiesto que el polimorfismo en la posición 874A>T del gen *IFNG* contribuía a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades atópicas mediante el descenso de la cantidad de IFN- $\gamma$  en aquellos individuos que presentaban el alelo A en homocigosis (AA), comparado con los que tenían el homocigoto mutado, TT. Los estudios recientes [435, 436, 437] confirman estos resultados, no sólo con el polimorfismo en posición 874A>T, sino con otras variantes génicas de *IFNG*, como un marcador de repetición CA en el intrón 1 o el polimorfismo A>G rs1861494 en el intrón 3 del gen, poniendo de manifiesto que dichas variantes regulan no sólo los niveles de expresión de la citocina, sino que juegan un importante papel en el mecanismo fisiopatológico del asma y en los fenotipos relacionados con el asma.

En relación al asma inducida por los AINE, destaca el estudio de Akahosshi [308], en el que se examina al gen *TBX21*, que codifica T-bet, como posible gen candidato en su asociación con fenotipos asmáticos. T-bet es un factor de transcripción específico de las células Th1 perteneciente a la familia T-box y destaca por su control en la expresión de IFN-

y en las células T. El polimorfismo en posición -1993 T>C de la región promotora del gen *TBX21* se ha asociado con el riesgo de asma inducida por aspirina (AIA) [308]. Parece que la sustitución de T por C en este polimorfismo incrementa la afinidad por un factor de transcripción al sitio de unión en la posición -1993 del gen *TBX21*, lo que supone un aumento de la actividad transcripcional del gen *TBX21*. Por lo tanto, el incremento de la producción de T-bet (con el posterior incremento de IFN- $\gamma$ ) en las vías respiratorias de los individuos con el polimorfismo -1993 T>C puede contribuir al desarrollo de ciertos fenotipos relacionados con el asma, tal como el asma inducida por la aspirina (AIA).

### GEN DEL FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO $\beta$ 1

EL TGF- $\beta$ 1 es una citocina multifuncional con efectos inmunosupresores y antiinflamatorios. Está implicada en los mecanismos patogénicos de enfermedades inflamatorias crónicas, como el asma y la dermatitis atópica [325, 438, 439]. Se asocia con la gravedad del asma, al promover la deposición de la matriz extracelular [325]. Además, el TGF- $\beta$ 1 juega un importante papel en el remodelado y obstrucción irreversible de las vías respiratorias [440, 441], y los niveles de mRNA *TGF $\beta$ 1* están sobreexpresados en el asma [442]. Sin embargo, no está claro todavía como el TGF- $\beta$ 1 está involucrado en la dermatitis atópica, aunque todo indica que podría suprimir las lesiones de la piel típicas de la dermatitis atópica.

En este estudio hemos analizado la posible asociación de dos polimorfismos exónicos, que afectan, respectivamente, a los codones c10 y c25. Ambos polimorfismos provocan un cambio de aminoácido en la secuencia proteica, prolina por leucina, en la posición 10 (L10P), y arginina por prolina en la posición 25 (R25P). Pese a que este gen tiene gran importancia en la patogénesis de la hipersensibilidad a la aspirina y otros AINE, en este estudio, sólo hemos encontrado una asociación muy débil del polimorfismo 915 G>C (codón 25) con la hipersensibilidad a los AINE, observando el alelo mutado C con mayor frecuencia en los controles respecto a los pacientes. Además, el poder estadístico no alcanzó el 80%.

Varios polimorfismos del gen *TGF $\beta$ 1* se han asociado con el asma [443, 444, 445] y con la gravedad de esta [446, 312]. Parece que el polimorfismo de la región promotora -509C>T influye en la expresión del gen de *TGF $\beta$ 1* [447, 448, 449]. Se piensa que este efecto ocurre al aumentar la afinidad de unión por el factor de transcripción YY1, lo que permite

incrementar la transcripción de *TGFβ1* y aumentar la concentración de TGF-β1 en plasma. Nos centraremos en el papel de estos polimorfismos en la patogénesis de la hipersensibilidad a la aspirina en asmáticos y otros tipos de reacciones a la aspirina. Destaca el estudio de Kim y cols. [314], quienes observan una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo -509C>T de *TGFβ1*, en concreto en los pacientes portadores del alelo T, y la prevalencia de rinosinusitis, una característica típica del AIA. Este grupo, previamente, había demostrado la correlación que existe entre la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) y los niveles de TGF-β1 en el tejido de los pólipos nasales de pacientes asmáticos con hipersensibilidad a la aspirina; por tanto, parece claro que el TGF-β1 contribuye a la inflamación eosinofílica de la poliposis nasal. Todos estos resultados sugieren la contribución de este polimorfismo a la susceptibilidad de AIA con rinosinusitis, y no al fenotipo AIA aislado. Estos autores también encontraron que el alelo T del polimorfismo -509C>T de *TGFβ1* se asoció con niveles plasmáticos bajos de TGF-β1. Estos resultados contradicen estudios previos, en los que las concentraciones de TGF-β1 en plasma fueron de aproximadamente el doble en los pacientes con genotipo mutado TT en comparación con los homocigotos CC [450]. Esta discrepancia podría explicarse porque el estudio de Kim y cols. incluyó pacientes con AIA y el TGF-β1 sólo fue detectado en su forma activa. En cambio, en el trabajo de Grainger y cols. [450] con mujeres postmenopáusicas, se estudiaron ambas formas para el TGF-β1, la forma activa y la forma latente. Parece claro que el TGF-β1 está localizado y compartimentalizado en la mucosa nasal de los pacientes asmáticos con hipersensibilidad a la aspirina y rinosinusitis. Sin embargo, el mecanismo exacto responsable del descenso en la producción de TGF-β1 en el suero de los pacientes con rinosinusitis y/o poliposis nasal necesita ser investigado en profundidad. Posteriormente, en otro estudio de este mismo grupo [315], se encontró que polimorfismos en la región promotora de *IL10* contribuyen al desarrollo de AIA con rinosinusitis, interactuando genéticamente con el *TGFβ1*.

En relación a otro fenotipo de hipersensibilidad a la aspirina, como es la urticaria/angioedema inducida por aspirina u otros AINE, hay que comentar el estudio de Park y cols. [330]. Parece que las células mastocitarias desempeñan un papel central en la patogénesis de la urticaria y que la homeostasis de dichas células podría estar influida por los niveles de IgE y de varias citocinas, incluyendo el TGF-β1 [451, 452]. Los polimorfismos del *TGFβ1* podrían influir en la función de las células mastocitarias de pacientes con urticaria/angioedema inducida por aspirina (AICU) y en la regulación y expresión del TGF-β1. Estos autores [330] sugieren que el polimorfismo -509T>C de la región promotora de

*TGFβ1*, podría afectar a la actividad del gen de *TGFβ1*, disminuyendo los niveles en suero de TGF-β1 en el caso de los portadores del alelo T para este polimorfismo. Como consecuencia, se incrementaría la liberación de mediadores por los mastocitos, lo que permitiría el desarrollo del fenotipo AICU. No obstante, se necesita seguir investigando como variantes genéticas incrementan la histamina liberada por las células mastocitarias en pacientes con urticaria/angioedema inducida por aspirina.

En el estudio de haplotipos de los polimorfismos (c10/c25), se encontró cierta asociación del haplotipo CG en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE, que resultó más frecuente en pacientes que en controles, reforzando el análisis individual. Estos resultados no concuerdan, en parte, con los obtenidos por otros autores, Mohavedi y cols. [452] encontraron frecuencias significativamente superiores del haplotipo TG en los controles respecto a los pacientes con asma.

El análisis de diplotipos en nuestro estudio mostró que el diplotipo TG CG (c10/c25) fue más frecuente en los pacientes con presencia de poliposis y en los pacientes con la tríada del AAS.

## **GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA**

El TNF-α es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel central en la inflamación de las vías respiratorias e incrementa la hiperreactividad bronquial [453, 454]. La expresión de TNF-α está aumentada en individuos asmáticos, mostrando un incremento de su secreción en las vías respiratorias y niveles elevados en el fluido del lavado broncoalveolar de sujetos sintomáticos [455]. Por esta razón, se especula que el gen *TNFA*, podría ser uno de los genes candidatos en el asma inducida por aspirina (AIA). Son numerosos los polimorfismos del gen *TNFA* que han sido estudiados en relación a distintos fenotipos de asma. En este estudio, hemos analizado los polimorfismos en posición -308 (G>A) y -238 (G>A).

El análisis del polimorfismo en posición -308 en el grupo de individuos con hipersensibilidad a los AINE mostró asociaciones estadísticamente muy significativas. Hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa tanto en la distribución alélica como en la genotípica en el grupo global de pacientes con hipersensibilidad a AINE y, dentro de este grupo, con distintas variables clínicas: presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS. El alelo A del polimorfismo -308 de *TNFA*, se encontró en mayor proporción

en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE y en pacientes con las variables clínicas: presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS respecto a los controles. En relación al análisis genotípico del polimorfismo -308, encontramos una frecuencia significativamente superior del genotipo AG en los pacientes del grupo con hipersensibilidad a AINE, así como en los pacientes con las variables clínicas: presencia de poliposis, de asma y de tríada del AAS. En relación a la variable pruebas cutáneas positivas con aeroalérgenos, también se encontró una asociación estadísticamente significativa con el polimorfismo -308 *TNFA*, el alelo A y el genotipo AG se observaron con mayor frecuencia en los pacientes que en los controles, sin embargo, el poder estadístico no alcanzó el 80% para esta asociación.

Son numerosos los estudios que encuentran asociación entre polimorfismos de *TNFA* y la susceptibilidad y gravedad del asma, especialmente del polimorfismo en posición -308 [456, 457, 458]. También se ha encontrado asociación del polimorfismo -308G>A de *TNFA* con la poliposis nasal [459, 460]. Lo que resulta más controvertido es la relación del polimorfismo -308 de *TNFA* con la atopia. De nuevo citaremos el estudio de Padrón-Morales y cols. [352], quienes encuentran que el alelo A del polimorfismo -308 de *TNFA* se asociaba con el asma atópica, especialmente en los pacientes con pruebas cutáneas positivas a ácaros del polvo y pólenes. Además, los autores encontraron una notable asociación de este SNP con la gravedad del asma: el genotipo AG fue más frecuente en los pacientes con asma grave persistente que en los controles. Sin embargo, otros autores [461], establecen que el polimorfismo -308G>A de *TNFA* se asocia con un incremento del riesgo de asma moderada y con hiperreactividad bronquial, pero no con la atopia. Esta diversidad en los resultados puede tener muchas causas, la más probable es la mala replicación que generalmente presentan los estudios de asociación, debido a las diferencias entre poblaciones, sin descartar el posible efecto de factores ambientales.

Además, la sustitución de G por A en la posición -308 en la región promotora de *TNFA* también se ha asociado con incrementos en la producción de TNF- $\alpha$  *in vitro* [462]. La presencia del alelo A en posición -308 ha sido relacionada con los niveles de expresión del TNF- $\alpha$  [463, 464, 465].

En relación a la hipersensibilidad a AINE, se ha comentado previamente que *TNFA*, podría considerarse un gen candidato del asma inducida por aspirina u otros AINE, debido a los niveles incrementados de esta citocina en las vías respiratorias de pacientes asmáticos. Kim y cols. [318] establecieron que los polimorfismos de la región promotora de *TNFA*

incrementaban significativamente la susceptibilidad al asma inducida por aspirina (AIA), por la interacción gen-gen con el marcador genético *HLA DPB1\*0301*. Hay que tener en cuenta la proximidad de *TNFA* con este marcador, ya que se localiza dentro de la región de clase III del CMH en la región del cromosoma 6p21.3, lo que facilita su ligamiento. En un estudio posterior [466], Choi y cols. investigaron el papel de los polimorfismos de la región promotora del *TNFA* en el desarrollo de urticaria inducida por aspirina (AIU). El TNF- $\alpha$  es liberado por los mastocitos de la piel y por otras células inflamatorias en los pacientes con urticaria. Los autores encontraron que dos polimorfismos de la región promotora del *TNFA* (-1031T>C y -863C>A) contribuían al desarrollo de urticaria inducida por aspirina. Estos resultados sugieren un posible ligamiento de los SNP de la región promotora del *TNFA* con otros marcadores genéticos cercanos que alteren los niveles de expresión de la citocina, contribuyendo así al desarrollo de la hipersensibilidad a la aspirina en asma o en urticaria crónica.

En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna asociación significativa del polimorfismo -238 (G>A) de *TNFA* en el grupo de individuos con hipersensibilidad a AINE, pero en la bibliografía se le ha asociado con enfermedades de componente inflamatorio variable. El alelo mutado A ha sido asociado con un riesgo incrementado de asma en niños de padres no fumadores [467] y con la artritis reumatoide juvenil [468]. En este mismo estudio, se observó que el alelo G en posición -238 formaba parte de una isla de metilación CpG, que podría modular la tasa de transcripción del *TNFA* [468], de manera que una mutación en ese nucleótido tendría como consecuencia una disregulación de la expresión de la citocina.

El análisis estadístico de la distribución del haplotipo formado por la combinación de polimorfismos de las posiciones -308 y -238 mostró resultados altamente significativos, muy similares a los obtenidos en el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas. Detectamos que la presencia del haplotipo AG (-308/-238 del *TNFA*) resultó ser más frecuente, no sólo a nivel de grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE, sino con las variables clínicas: poliposis, asma y tríada del AAS. Por otro lado, encontramos una asociación significativa del haplotipo GG, más representado en los controles que en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE y que en los pacientes con las variables clínicas: presencia de poliposis, de asma y tríada del AAS. Este haplotipo, en el que no se encuentra ningún alelo mutado, podría conferir a los individuos portadores menor riesgo de padecer la enfermedad.

El análisis de diplotipos concuerda con esta hipótesis, ya que se encontró que el diplotipo GG GG (posiciones -308/-238) fue más frecuente en los controles que en los pacientes con hipersensibilidad a AINE y con las variables clínicas: presencia de poliposis, de asma, de tríada del AAS y de pruebas cutáneas positivas. En el grupo de pacientes con hipersensibilidad a AINE y en el subgrupo de pacientes con la variable clínica asma, el haplotipo AG GG mostró una asociación estadística significativa respecto a los controles.

### **6.3 GRUPO DE PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A BL Y PACIENTES CON HIPERSENSIBILIDAD A AINE**

Finalmente, al comparar los pacientes con hipersensibilidad a los BL y los pacientes con hipersensibilidad a los AINE hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con los polimorfismos: 3962 *IL1B*, -889 *IL1A*, 11100 *IL1RA*, -1098 *IL4*, -590 *IL4*, -1082 *IL10*, -819 *IL10* y -308 *TNFA*.

#### **GENES DE LA AGRUPACIÓN (CLUSTER) DE LA INTERLEUCINA 1**

Al comparar ambos tipos de hipersensibilidades en relación a polimorfismos en la agrupación de la IL-1 hemos obtenido asociación con varios polimorfismos, cuyos resultados se describen a continuación.

En el análisis del polimorfismo en posición 3962 del gen de *IL1B*, encontramos una mayor proporción del genotipo TC en los pacientes con hipersensibilidad a AINE en relación a los pacientes con reacciones alérgicas a BL. Al analizar el polimorfismo -889 de *IL1A*, se detectó una asociación estadísticamente significativa, encontrando el alelo mutado T con mayor frecuencia en los pacientes con reacciones alérgicas a los BL que en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE. Además, en el análisis del polimorfismo del gen del antagonista del receptor de la IL-1 (MspI 11100 *IL1RN*), se detectó una asociación estadísticamente significativa con la hipersensibilidad a los AINE, encontrando el alelo mutado C y el genotipo heterocigoto con mayor frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a este grupo de fármacos (AINE).

Respecto a los pacientes con hipersensibilidad a los BL, de nuevo el peso en este grupo parece que se debe a la atopia, en concreto a la sensibilización a aeroalérgenos comunes

como ácaros y pólenes, apoyando lo descrito en la bibliografía [349, 350]. Nuestros resultados apuntan que son los individuos sensibilizados a un único grupo de aeroalérgenos, es decir los pacientes monosensibilizados, principalmente a los ácaros, los que se asocian a polimorfismos de la agrupación de la IL-1 en el grupo de pacientes con hipersensibilidad a BL. Esto mismo ha sido encontrado por otros autores ya citados previamente, como Karjalainen y cols [350]. En el análisis de los pacientes con hipersensibilidad a AINE, el peso de este grupo en relación a la asociación con polimorfismos de la agrupación de la IL-1 parece relacionarse más con el marcado componente inflamatorio de enfermedades como el asma y la poliposis nasal. En la bibliografía, como ya se ha citado, en el análisis individual del grupo, varios de estos polimorfismos se asociaron, ya fuera con la susceptibilidad o ya fuera con la gravedad de determinadas enfermedades inflamatorias [374, 375, 376, 377]. Nuestros resultados también muestran una asociación de los polimorfismos de la agrupación de la IL-1 con la sensibilización a varios grupos de aeroalérgenos, volviendo a poner de manifiesto la importancia de la atopia en la agrupación de genes de la IL-1.

#### **GEN DE LA INTERLEUCINA 4**

En relación a los polimorfismos del gen *IL4*, encontramos que el alelo mutado G y el genotipo heterocigoto del polimorfismo -1098 T>G del gen de *IL4* se observaban con mayor frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE que en los pacientes con reacciones alérgicas a los BL. En relación al polimorfismo en posición -590 C>T de *IL4*, también encontramos una asociación significativa en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas. El alelo T y el genotipo CT estaban más representados en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE, aunque en este caso, el poder estadístico resultó inferior al 80%. En el análisis de haplotipos de las posiciones -1098/-590/-33 del gen *IL4*, encontramos una mayor frecuencia del haplotipo TCC en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a los BL.. También resultó estadísticamente significativo el haplotipo GCC en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE, pero en este caso el poder fue escaso. Con respecto al estudio de diplotipos, el diplotipo TCC GCC estuvo más representado en los pacientes con hipersensibilidad a AINE, sin embargo, el diplotipo TCC TCC fue significativamente más frecuente en los pacientes con reacciones de hipersensibilidad a los BL.

En relación a la hipersensibilidad a los BL en el estudio de polimorfismos de *IL4*, ya se ha citado el papel fundamental que desempeña esta citocina en el cambio de isotipo de las células B hacia la producción de IgE y que la convierten en un candidato ideal en las reacciones de hipersensibilidad a fármacos en general y en las reacciones alérgicas inmediatas a BL en particular, así como en la atopia [268, 273, 289, 359, 360]. Respecto a la hipersensibilidad a los AINE, los datos de algunos estudios también sugieren el importante papel de la IL-4 en el asma y los fenotipos asociados al asma y la influencia de la aspirina en la expresión de IL-4 de una manera alelo-específica, lo que conduciría a la hipersensibilidad a los AINE [388, 389, 390, 319, 395, 398].

### GEN DE LA INTERLEUCINA 10

El análisis de los polimorfismos en la región promotora de *IL10* mostró una asociación estadísticamente significativa en la distribución genotípica de los polimorfismos en posición -1082 y -819. En relación al SNP -1082 de *IL10*, el genotipo AG se encontró más representado en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE respecto a los pacientes con reacciones alérgicas a los BL. El genotipo TC del polimorfismo en posición -819 también presentó una mayor frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a AINE respecto a los pacientes con hipersensibilidad a BL. Sin embargo, en ambos SNP el poder fue inferior al 80%. En el estudio de diplotipos encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el diplotipo (posiciones -1082/-819/-592) ACC GCC y los pacientes con hipersensibilidad a los AINE, siendo más frecuente en estos pacientes respecto a los pacientes alérgicos a BL. Sin embargo, el diplotipo GCC GCC se encontró en mayor proporción en pacientes con hipersensibilidad a BL, y en este caso el poder no alcanzó el 80%.

Estudios recientes de asociación han tratado de relacionar polimorfismos de la región promotora de *IL10* con el riesgo de desarrollar hipersensibilidad a BL. Ya se ha citado, en el análisis individual de este grupo, que algunos autores [269, 270] han sugerido que la IL-10 es una citocina que tiene una estrecha relación con la producción de anticuerpos específicos en la alergia a las penicilinas. En relación a la hipersensibilidad a los AINE, como se ha detallado previamente, en muchos estudios consideran al gen *IL10* como un gen candidato en su asociación con las reacciones de hipersensibilidad a los AINE, sobre todo en los pacientes con asma y rinitis y en los pacientes con urticaria crónica. Los estudios [315,

333] han identificado polimorfismos en la región promotora de *IL10* como factores de riesgo de la hipersensibilidad a AINE.

### GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

El análisis del polimorfismo en posición -308 de *TNFA*, mostró una asociación estadísticamente muy significativa del alelo mutado A y del genotipo AG con la hipersensibilidad a los AINE. Tanto el alelo A como el genotipo AG para este polimorfismo se encontró con una mayor frecuencia en pacientes con hipersensibilidad a los AINE respecto a pacientes con hipersensibilidad a los BL. El análisis estadístico del haplotipo formado por la combinación de polimorfismos de las posiciones -308 y -238 mostró resultados muy significativos. Así, detectamos que la presencia del haplotipo AG (-308/-238 del *TNFA*) resultó ser más frecuente en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE, sin embargo, el haplotipo GG se observó con más frecuencia en los pacientes con hipersensibilidad a los BL. En el análisis de diplotipos, encontramos que el diplotipo AG GG (posiciones -308/-238) resultó más frecuente en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE y el diplotipo GG GG, estuvo más representado en los pacientes con reacciones alérgicas a los BL .

En la bibliografía, el grupo de Gueant–Rodriguez y cols. [274] ha sugerido una influencia ambivalente del polimorfismo -308G>A de *TNFA* con el riesgo de alergia a los BL y con la producción de IgE específica frente a BL. Pero hay que resaltar que no se han encontrado más estudios que asocien polimorfismos del *TNFA* con la hipersensibilidad a los BL revisando la bibliografía y que en nuestra población de pacientes alérgicos a los BL no hemos encontrado ninguna asociación. Por tanto, se necesita seguir investigando mediante estudios experimentales el papel del *TNFA* en las reacciones alérgicas a fármacos en general y a BL en particular y en la producción de IgE. En relación a la hipersensibilidad a los AINE, ya hemos especificado previamente que *TNFA* podría considerarse un gen candidato del asma inducida por aspirina u otros AINE, debido a los niveles incrementados de esta citocina en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos. Algunos autores han establecido que los polimorfismos de la región promotora del *TNFA* incrementaban significativamente la susceptibilidad al asma inducida por los AINE por la interacción con otros marcadores genéticos cercanos [318] y el desarrollo de urticaria inducida por los AINE [466].

En este grupo, en el que comparamos pacientes con reacciones alérgicas o inmunológicas a BL y pacientes con hipersensibilidad a AINE, queremos resaltar el mecanismo diferencial de ambos grupos de fármacos en la patogenia de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos. Es probable que en estas diferencias, relacionadas con los mecanismos que conducen a la hipersensibilidad a los BL y a la hipersensibilidad a los AINE, se justifique el diferente comportamiento de los polimorfismos de los genes analizados. Así, en el estudio de Romano y cols. [469] acerca de la reactividad cruzada entre fármacos se pone de manifiesto el mecanismo diferencial que conduce a la hipersensibilidad a BL mediante la sensibilización preexistente a un componente relacionado estructuralmente o a la hipersensibilidad a AINE por las características farmacológicas comunes, es decir, por el mecanismo inherente de actuación del fármaco.

Gueant y cols. [251] determinan que la alergia a fármacos se refiere a una reacción de hipersensibilidad en la que se demuestra que es un mecanismo mediado por anticuerpos IgE o por células T. En el grupo de fármacos que desencadenan estas reacciones mediadas por un mecanismo inmunológico se encuentran los antibióticos BL entre otros, principalmente a través de un mecanismo mediado por IgE. Estos autores [251] han identificado múltiples factores genéticos en los últimos años en relación a las reacciones de hipersensibilidad inmediata a los antibióticos BL. Respecto a los genes de citocinas, ya se ha citado previamente que destacan aquellas involucradas en el cambio de isotipo a IgE por células B, como IL-4, IL-13 y IL4-RA. Pero, sin duda, revisando la bibliografía destacan los niveles elevados de IgE total e IgE específica frente a alérgenos comunes encontrados en diferentes poblaciones [268, 273, 289]. Para estos autores la influencia de la atopia podría ser la clave que contribuya a explicar los mecanismos de hipersensibilidad a BL, aunque se necesita seguir investigando la influencia de la sensibilización a alérgenos ambientales frecuentes en las reacciones alérgicas inmediatas a BL.

En el caso de las reacciones de hipersensibilidad a aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE), estas son producidas, en su mayor parte, por mecanismos no inmunológicos relacionados con el metabolismo del ácido araquidónico y la liberación de leucotrienos. Por ello, la mayoría de predictores genéticos de hipersensibilidad a aspirina y otros AINE han sido relacionados con la sobreproducción de los productos finales de la vía del ácido araquidónico. En la bibliografía se han identificado genes de citocinas, como IL-4 [319, 398], IL-10 [315, 333], TGF- $\beta$ 1 [314, 330] y TNF- $\alpha$  [318, 466], como se ha visto previamente en muchos estudios de genes candidato en su asociación con las reacciones de hipersensibilidad a los AINE, sobre todo en pacientes con asma y rinitis o en pacientes con

urticaria crónica exacerbada por AINE. Probablemente el marcado componente inflamatorio subyacente en todas estas patologías podría facilitar su asociación con polimorfismos que codifican citocinas moduladoras de procesos inflamatorios (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1 y TNF- $\alpha$ ) y que contribuyen a la patogénesis de la hipersensibilidad a los AINE. Aunque los mecanismos no alérgicos de hipersensibilidad a los AINE no están completamente esclarecidos, hay evidencias que suponen que existe también un mecanismo patogénico alérgico mediado por IgE [470], en el caso de pacientes con una hipersensibilidad selectiva a un AINE específico y buena tolerancia a otros AINE.

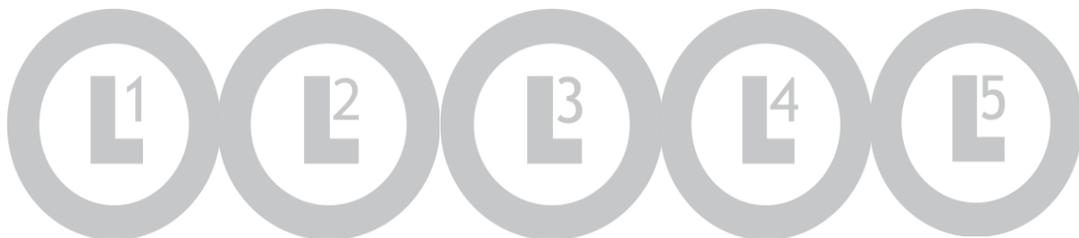
Sin embargo, en estos momentos, debido a los diferentes resultados demostrados en diversas poblaciones, existe una necesidad de realizar estudios más amplios en la identificación de predictores genéticos de hipersensibilidad a los fármacos, tanto en las reacciones mediadas por mecanismos inmunológicos (ya sea humoral o celular) como en las reacciones mediadas por mecanismos no inmunológicos. La investigación farmacogenómica también podría revelar nuevos marcadores genéticos para definir los factores de riesgo para la hipersensibilidad a fármacos. Se espera que en los próximos años, se obtengan más datos con respecto a la epidemiología y a los mecanismos de hipersensibilidad a los fármacos a partir de los resultados de estudios multicéntricos iniciados por la Red Europea de Alergia de Medicamentos (ENDA) [471]. Será necesario llevar a cabo más estudios de investigación básica, estudios observacionales y clínicos para llegar a tener una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la hipersensibilidad a medicamentos, lo que podría permitirnos identificar a los pacientes que están en riesgo antes de la prescripción de los fármacos y el desarrollo de estrategias terapéuticas para la hipersensibilidad grave y potencialmente mortal de algunos fármacos.





# CONCLVSiONES

---





## 7. CONCLUSIONES

1. En este estudio se han caracterizado múltiples polimorfismos de genes que codifican citocinas. Las principales asociaciones génicas detectadas entre los polimorfismos analizados y los diferentes grupos de hipersensibilidad a fármacos han sido las correspondientes a polimorfismos ubicados en los genes de la agrupación cluster de la *IL-1*, *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IFNG* y *TNFA*.
2. Se identifica un claro perfil diferencial de asociación génica entre la hipersensibilidad a beta-lactámicos y a antiinflamatorios no esteroideos.
3. En relación al grupo de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a los BL, las asociaciones génicas son escasas y los resultados sugieren una importante influencia de la atopia en las reacciones de hipersensibilidad inmediata a beta-lactámicos.
4. En relación al grupo de pacientes con reacciones de hipersensibilidad a los AINE, se identifican un mayor número de asociaciones génicas con SNP de diversas citocinas. El marcado componente inflamatorio subyacente en la enfermedad respiratoria exacerbada por los AINE (EREA), podría facilitar su asociación con genes que codifican citocinas moduladoras de procesos inflamatorios que contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad.
5. Aunque en ambos casos se observa una asociación con la sensibilización a aeroalérgenos, en el caso de las reacciones de hipersensibilidad a los BL, la asociación génica se identifica entre el cluster de la *IL-1* y la monosensibilización y en el caso de la hipersensibilización a los AINE, es entre el polimorfismo 166 *IL2* y los pacientes polisensibilizados.
6. En este estudio hemos encontrado intensas asociaciones con los polimorfismos del gen *IL4*, sugiriendo su asociación con la hipersensibilidad a los AINE. La aspirina y otros AINE pueden regular su expresión de una forma específica de alelo modificando la capacidad de unión de los factores de transcripción lo que podría subyacer en la patogénesis de la hipersensibilidad a la aspirina u otros AINE.

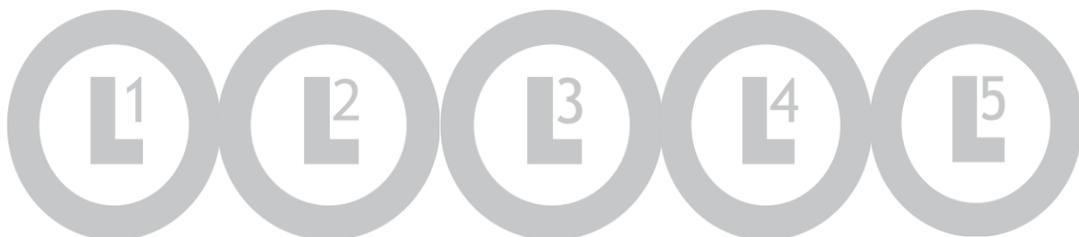
7. Se han identificado intensas asociaciones con los polimorfismos de *IL10* y *TNFA*, por lo que estos genes podrían considerarse genes candidato en su asociación con la hipersensibilidad a los AINE y podrían constituirse en marcadores pronóstico del riesgo de desarrollo de hipersensibilidad a este tipo de fármacos.
8. Se observa un perfil de asociación diferencial en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE atendiendo a la presencia o no de rinosinusitis asociada a asma, en especial, para los genes *IL10* y *TGFB1*. Esta asociación, podría contribuir al papel inflamatorio en la mucosa nasal y del tejido polipoideo.
9. En los polimorfismos -1098 *IL4*, -590 *IL4*, -819 *IL10* y -592 *IL10* detectamos cierta asociación con el sexo, que debe ser tomada en cuenta en este tipo de estudios.
10. El estudio de los haplotipos y diplotipos, proporciona una información más completa en relación a los estudios de genotipos aislados, en especial, para el gen *TNFA*.





# BIBLIografía

---





## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *International Drug Monitoring: The Role of the Hospital*. World Health Organization, ed. Report of a WHO Meeting. Technical Report Series No. 425. Geneva, Switzerland; 1969. p. 1-24.
2. World Health Organization. *International drug monitoring: the role of national centers*. World Health Organ Tech Rep Ser, 1972; **498**: p.1–25.
3. World Health Organization. *International drug monitoring: the role of national centers*. Report of a WHO Meeting. Technical Report Series No. 498. Geneva, Switzerland; 1972. p. 1-48.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de Hospital. *El farmacéutico y la farmacovigilancia en el hospital*. Barcelona 1984. Catálogo de publicaciones periódicas Sociedad Española Farmacia Hospitalaria. <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/sociedad/catalogosefh99.pdf> (fecha consulta 21/03/2014).
5. Karch, F. E., C. L. Smith, et al., *Adverse drug reactions-a matter of opinion*. Clin Pharmacol Ther, 1976. **19**(5 Pt 1): p. 489-92.
6. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D et al. *Incidence of Adverse Drug Events and Potential Adverse Drug Events. Implications for Prevention*. ADE Prevention Study Group. JAMA, 1995; **274**: p. 29-34.
7. Khan SA. *Descriptions of adverse drug events should be standardised*. BMJ, 1999; **318**(7176): p. 127.
8. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ et al., *Adverse drug reactions as a cause for admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients*. BMJ 2004; **329**: p. 15-9.
9. Schindel L. *Placebo-induced adverse reactions*. En: Meyler L, Pecta HM, eds. *Drug-induced Diseases*. vol 3. Amsterdam: Excerpta Medica, 1968.
10. Pelta R, Cosano L, Huertas A J, Olalde S, Peiró MJ. *Influencia del efecto placebo en el estudio de las reacciones adversas medicamentosas*. Comunicación XVIII Congreso Nacional SEAIC. Rev Esp Alergol Inmunol Clin, 1992; **7**(Supl 2): p. 125.
11. Rawlins M, Thompson W. *Mechanisms of adverse drug reactions*. En: Davies D, ed. *Textbook of adverse drug reactions*. 4º ed. Oxford (England): Oxford University Press; 1991. p. 18-45.
12. Pichler WJ. *Drug allergy: Classification and clinical features*. En: <http://www.uptodate.com/contents/drug-allergy-classification-and-clinical-features> (fecha consulta: 21/03/2014).

13. Caranasos, G. J., R. B. Stewart, et al., *Drug-induced illness leading to hospitalization*. JAMA, 1974. **228**(6): p. 713-7.
14. Brown, E. A., *Problems of drug allergy*. J Am Med Assoc, 1955. **157**(10): p. 814-9.
15. De Cos MA, Flórez J, Armijo JA. *Reacciones adversas a los medicamentos*. Farmacovigilancia. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, eds. Farmacología humana. 7ª ed. Barcelona (España): Elsevier España SL; 2014. p.106-20.
16. Vervloet, D. and S. Durham, *Adverse reactions to drugs*. BMJ, 1998. **316**(7143): p. 1511-4.
17. Molokhia M, McKeigue P. EUDRAGENE: *European collaboration to establish a case-control DNA collection for studying the genetic basis of adverse drug reactions*. Pharmacogenomics, 2006; **7**(4): p. 633-8.
18. Holmes MV, Shah T, Vickery C, Smeeth L, Hingorani AD, Casas JP. *Fulfilling the promise of personalized medicine? Systematic review and field synopsis of pharmacogenetic studies*. PLoS One, 2009; **4**: e7960.
19. Cortada Macías JM, López Serrano MC, Blasco Sarramián A, Mayorga C, Torres Jaén MJ. *Reacciones alérgicas inducidas por fármacos. Introducción, conceptos generales, epidemiología. Fisiopatología: los fármacos como antígenos*. En: Peláez Hernández A y Dávila González I, eds. Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Tomo II. Majadahonda (Madrid): Ergon; 2007. p. 1297-323.
20. Senent CJ, Alonso E, Díez Gómez ML, López Serrano MC, Cid de Rivera C, Muñoz Lejarazu D et al. *Reacciones adversas a medicamentos. Protocolos de estudio para el manejo de Alergia a medicamentos*. Rev Esp Alergol Inmunol Clín, 1990; **5** (Supl 2): p. 1-29.
21. Muszkat M. *Interethnic differences in drug response: the contribution of genetic variability in beta adrenergic receptor and cytochrome P4502C9*. Clin Pharmacol Ther, 2007; **82**: p. 215-8.
22. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF et al., *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003*. J Allergy Clin Immunol, 2004; **113**: p. 832-6.
23. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T et al., *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force*. Allergy, 2001; **56**: p. 813-24.
24. Mirakian R, Ewan PW, Durham SR, Youlten LJ, Dugue P, Friedmann PS et al., *BSACI guidelines for the management of drug allergy*. Clin Exp Allergy, 2009; **39**: p. 43–61.
25. Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy AalACoA, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. *Drug allergy: an updated practice parameter*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010; **105**: p. 259–73.

26. Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA et al., *International Consensus on drug allergy*. Allergy, 2014; **69**: p. 420-37.
27. Pawankar R, Giorgio Walter Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. World Allergy Organization (WAO) White book on allergy 2011-2012: executive summary. En: [http://www.worldallergy.org/publications/wao\\_white\\_book.pdf](http://www.worldallergy.org/publications/wao_white_book.pdf) (fecha consulta: 21 de Marzo de 2014).
28. Gomes, E. R. and P. Demoly, *Epidemiology of hypersensitivity drug reactions*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(4): p. 309-16.
29. Romano, A., M. J. Torres, et al., *Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3 Suppl): S67-73.
30. Kowalski, M. L., R. Asero, et al., *Classification and practical approach to the diagnosis and management of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Allergy, 2013. **68**(10): p. 1219-32.
31. Pichler WJ. *Drug allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001; **1**: p. 285-6.
32. Celik G, Pichler WJ, Adkinson F. Drug Allergy. En: Adkinson NF, Bochner BS, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, Simons FER, eds. *Middlenton's Allergy Principles and Practice*. 7th ed. Philadelphia (USA): Mosby Elsevier Inc; 2009. p. 1205-1226.
33. Primeau, M. N. and N. F. Adkinson, Jr., *Recent advances in the diagnosis of drug allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001. **1**(4): p. 337-41.
34. Levine, B. B., *Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man*. N Engl J Med, 1966. **275**(20): p. 1115-25.
35. Gomez, E., N. Blanca-Lopez, et al., *Induction of accelerated reactions to amoxicillin by T-cell effector mechanisms*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013. **110**(4): p. 267-73.
36. Gell PGH, Coombs RRA. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. En: Gell PGH, Coombs RRA, eds. *Clinical aspects of immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford (England): Blackwell; 1968. p. 575–596.
37. Aparecida T, Nagao-Días, Barros-Nunes P, Helena LL, Coelho, Dirceu Solé. *Allergic drug reactions*. J Pediatr, 2004; **80**: p. 259-66.
38. Demoly, P. and A. Romano, *Update on beta-lactam allergy diagnosis*. Curr Allergy Asthma Rep, 2005. **5**(1): p. 9-14.
39. Blanca, M., A. Romano, et al., *Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to betalactams*. Allergy, 2009. **64**(2): p. 183-93.
40. Birnbaum, J. and D. Vervloet, *Allergy to muscle relaxants*. Clin Rev Allergy, 1991. **9**(3-4): p. 281-93.

41. Antunez, C., N. Blanca-Lopez, et al., *Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2): p. 404-10.
42. Chung, C. H., B. Mirakhur, et al., *Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1109-17.
43. George JN. Drug-induced thrombocytopenia. En: <http://www.uptodate.com/contents/drug-induced-thrombocytopenia> (Fecha de consulta: 21 de Marzo de 2014).
44. Aster RH. Blood dyscrasias caused by hypersensitivity to drugs. En: Pichler WJ, ed. *Drug Hypersensitivity*. Basel (Suiza): Karger; 2007.p. 306-20.
45. Federici K, Weitten T, Alt M, Blaison G, Zamfir A, AudhuyB et al., *Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis*. Presse Med, 2008; **37**: p. 1327-33
46. Tesfa D, Marianne K, Palmblad J., *Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: possible mechanisms and management*. Am J Hematol, 2009; **84**: p. 428-34.
47. Garratty G, *Immune cytopenia associated with antibiotics*. Transfus Med Rev, 1993; **7**: p. 255-267.
48. Salama A., *Drug-induced immune hemolytic anemia*. Expert Opin Drug Saf, 2009; **8**: p. 73-9.
49. Warkentin TE. *Heparin-induced thrombocytopenia*. Hematol Oncol Clin N Am, 2007; **21**: p. 589-607.
50. Tsuji Y, et al. *Thrombocytopenia and anemia caused by a persistent high linezolid concentration in patients with renal dysfunction*. J Infect Chemother, 2011; **17**: p. 70-75.
51. Palmblad J. *Drug-induced neutropenias: now and then*. Arch Intern Med, 1999; **159**: p. 2745-2745.
52. Hunder GG., *Hypersensitivity vasculitis in adults*. En: <http://www.uptodate.com/contents/drug-induced-hypersensitivity-vasculitis>(fecha de consulta: 21 de Marzo de 2014).
53. Pichler WJ. *Drug hypersensitivity reactions: Classification and relationship to T cell activation*. En: *Drug hypersensitivity*. Pichler WJ (ed). Basel: Karger; 2007. p. 168-189.
54. Pichler, W. J., *Delayed drug hypersensitivity reactions*. Ann Intern Med, 2003. **139**(8): p. 683-93.
55. Pichler WJ. *Immune mechanism of drug hypersensitivity*. Immunol Allergy Clin North Am, 2004; **24**: p. 373-97.
56. Yawalkar N., *Drug-induced exanthems*. Toxicology, 2005; **209**: p. 131-4.

57. Revuz J, Valeyrie-Allanore L. *Reacciones medicamentosas*. En: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP (Ed). *Dermatología*, Volumen 1. Madrid: Elsevier España, Grafos S.A.; 2004. p. 333-54.
58. Bircher AJ. *Approach to the patient with a drug hypersensitivity reaction-Clinical perspectives*. En: Pichler WJ (Ed). *Drug Hypersensitivity*. Basel: Karger; 2007. p. 352-65.
59. Shiohara T, Inaoka M, Kano Y. *Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses*. *Allergol Int*, 2006; **55**: p. 1-8.
60. Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-allanore L, Halevy S, Davidovici BB, Mockenhaupt M, et al. *Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist?*. *Br J Dermatol*, 2007; **156**: p. 609-11.
61. Mockenhaupt M. *Severe drug- induced skin reactions: clinical pattern diagnostics and therapy*. *JDDC*, 2009; **7**: p. 142-60.
62. Wetter DA, Camilleri MJ., *Clinical, etiologic, and histopathologic features of Stevens-Johnson syndrome during an 8-year period at Mayo Clinic*. *Mayo Clin Proc*, 2010; **85**: p. 131-8.
63. Morel E, Escamochero S, Cabañas R, Díaz R, Fiandor A, Bellón T., *CD94/NKG2C is a killer effector molecule in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; **125**: p. 703-10.
64. Posadas SJ, Padial A, Torres MJ, Mayorga C, Leyva L, Sánchez E., *Delayed reactions to drugs show levels of perforin, granzyme B, and Fas-L to be related to disease severity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; **109**: p. 155-61.
65. Perazella MA, Markowitz GS., *Drug-induced acute interstitial nephritis*. *Nat Rev Nephrol*, 2010; **6**: p. 461-70.
66. Perazella MA. *Drug-induced nephropathy: an update*. *Expert Opin Drug Saf*, 2005; **4**: p. 689-706.
67. Praga M, González E., *Acute interstitial nephritis*. *Kidney Int*, 2010; **77**: p. 956-61.
68. Butany J, Ahn E, Luk A. *Drug-related cardiac pathology*. *J Clin Pathol*, 2009; **62**: p. 1074-84.
69. Al Ali AM, Straatman LP, Allard MF, Ignaszewski AP. *Eosinophilic myocarditis: case series and review of literature*. *Can J Cardiol*, 2006; **22**: p. 1233-7.
70. Castell JV, Castell M. *Reacciones alérgicas órgano-específicas a fármacos: el hígado como Diana*. En: Blanca M, Bendía E, Canto G, eds. *Reacciones alérgicas a fármacos. Avances y nuevas perspectivas*. Madrid: Ediciones Arán SL; 2007. p. 287-328.

71. Sidoroff A, Halevy S, Bavinck JNB, Vaillant L, Roujeau JC., *Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) —A clinical reaction pattern.* J Cutan Pathol, 2001; **28**: p. 113–9.
72. Britschgi M, Steiner UC, Schmid S, Depta JP, Senti G, Bircher A, et al., *T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis.* J Clin Invest, 2001; **107**: p. 1433-41.
73. Brahimi, N., E. Routier, et al., *A three-year-analysis of fixed drug eruptions in hospital settings in France.* Eur J Dermatol, 2010. **20**(4): p. 461-4.
74. Shiohara T, Mizukawa Y. *Fixed drug eruption.the dark side of activation of intradermal CD8+ T cells uniquely specialized to mediate protective immunity.* Chem Immunol Allergy, 2012; **97**: p. 106-21.
75. Cho YT, Lin JW, Chen YC, Chang CY, Hsiao CH, Chung WH et al., *Generalized bullous fixed drug eruption is distinct from Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis by immunohistopathological features.* J Am Acad Dermatol, 2014; **70**: p. 539-48.
76. Uetrecht, J. *Current trends in drug-induced autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2005. **4**(5): p. 309-14.
77. Gait, R. C., A. G. Affleck, et al., *Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody-positive polyarteritis nodosa secondary to minocycline treatment for acne vulgaris.* J Am Acad Dermatol , 2008. **58**(5 Suppl 1): S123-4.
78. Sheikhzadeh, A., U. Schafer, et al., *Drug-induced lupus erythematosus by amiodarone.* Arch Intern Med, 2002. **162**(7): p. 834-6.
79. Karch FE, Lasagna L. *Adverse drug reactions. A critical review.* JAMA, 1975; **234**: p. 1236-43.
80. Wang RIH, Terry LC. *Adverse drug reactions in a Veterans Administration Hospital.* J Clin Pharmacol, 1971; **11**: p. 14-8.
81. Borda IT, Slome D, Jick H. *Assessment of adverse reactions within a drug surveillance program.* JAMA, 1968; v**205**: p. 645-9.
82. Morales FJ, Carpi R. *Publications on adverse reactions to drugs in Spanish pediatric journals between 1980 and 1984.* An Esp Pediatr, 1989; **30**: p. 116-8.
83. Vallano, A., G. Cereza, et al., *Obstacles and solutions for spontaneous reporting of adverse drug reactions in the hospital.* Br J Clin Pharmacol, 2005. **60**(6): p. 653-8.
84. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). *Notificación de reacciones adversas a fármacos.* En: <https://www.notificaram.es> (fecha de consulta: 21de Marzo de 2014).

85. División de Farmacología. Instituto Catalán de Farmacología. Universidad Autónoma de Barcelona. *Notificación voluntaria de reacciones adversas a medicamentos*. Tarjeta amarilla. Informe Anual. Núm 3 Sept, 1986.
86. Centro de Farmacovigilancia de la Comunidad de Madrid. *Reacciones adversas a medicamentos*. Boletín informativo. Volumen I, núm 3. Diciembre 1993.
87. Ogilvie RI, Ruedy J. *Adverse drug reactions during hospitalization*. Can Med Assoc J, 1967; **97**: p. 1450-53.
88. Shapiro S, Slone D, Lewis GP, Jick H. *Fatal drug reactions among medical in patients*. JAMA, 1971; **216**: p. 467-74.
89. Irey MS. *Adverse drug reactions and death*. JAMA, 1976; **236**: p. 575-8.
90. Leone, R., L. Sottosanti, et al., *Drug-related deaths: an analysis of the Italian spontaneous reporting database*. Drug Saf, 2008. **31**(8): p. 703-13.
91. Clarkson, A. and I. Choonara, *Surveillance for fatal suspected adverse drug reactions in the UK*. Arch Dis Child, 2002. **87**(6): p. 462-6.
92. Bates, D. W., D. J. Cullen, et al., *Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. Implications for prevention. ADE Prevention Study Group*. JAMA, 1995. **274**(1): p. 29-34.
93. Classen, D. C., S. L. Pestotnik, et al., *Computerized surveillance of adverse drug events in hospital patients. 1991*. Qual Saf Health Care, 2005. **14**(3): p. 221-5; discussion 225-6.
94. Lazarou, J., B. H. Pomeranz, et al., *Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies*. JAMA, 1998. **279**(15): p. 1200-5.
95. Thong, B. Y., K. P. Leong, et al., *Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2003. **90**(3): p. 342-7.
96. Pirmohamed, M., S. James, et al., *Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients*. BMJ, 2004. **329**(7456): p. 15-9.
97. Einarson TR. *Drug-related hospital admissions*. Ann Pharmacother, 1993; **27**: p. 832-40.
98. Moore, N., D. Lecointre, et al., *Frequency and cost of serious adverse drug reactions in a department of general medicine*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **45**(3): p. 301-8.
99. Martínez-Mir I, García-López M, Palop V, Ferrer JM, Estañ L, Rubio E et al., *A prospective study of adverse drug reactions as a cause of admission to a pediatric hospital*. Br J Clin Pharmacol, 1996; **42**: p. 319-24.
100. Kidon, M. I. and Y. See, *Adverse drug reactions in Singaporean children*. Singapore Med J, 2004. **45**(12): p. 574-7.

101. Impicciatore, P., I. Choonara, et al., *Incidence of adverse drug reactions in pediatric in/out-patients: a systematic review and meta-analysis of prospective studies*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(1): p. 77-83.
102. Clavenna, A. and M. Bonati, *Adverse drug reactions in childhood: a review of prospective studies and safety alerts*. Arch Dis Child, 2009. **94**(9): p. 724-8.
103. Gamboa, P. M. *The epidemiology of drug allergy-related consultations in Spanish Allergology services: Alergologica-2005*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19 Suppl 2**: p. 45-50.
104. Gamboa Setién PM. Alergia a los medicamentos. En: SEAIC-Schering-Plough, eds. *Alergológica 2005. Factores epidemiológicos, clínicos y socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005*. 1ª Ed. Madrid: Luzán 5 SA; 2006 p.257-82.
105. Gaig P, Ferrer M, Muñoz-Lejarazu D, Lleonart D, García-Abujeta JL, Caballero T et al., *Prevalencia de alergia en la población adulta española*. Alergol Inmunol Clín, 2004; **19**: p. 68-74.
106. Gomes, E., M. F. Cardoso, et al. Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(10): p. 1597-601.
107. Miller, G. C., H. C. Britth, et al., *Adverse drug events in general practice patients in Australia*. Med J Aust, 2006. **184**(7): p. 321-4.
108. Campos A, Alamar R, Castelló JV, Enguïdanos M. Proyecto ORBA: 1983-1983. *Cambios en la prevalencia de asma, rinitis, urticaria y alergia medicamentosa en Valencia*. Alergol Inmunol Clín, 2002; **17**: p. 151-8.
109. Campos A, Castelló JV, Enguïdanos M, Alamar R. Proyecto ORBA 2004: *Tendencias en la prevalencia de Asma, Rinitis y Alergia Medicamentosa entre 1983, 1993, 2004 en Valencia*. Alergol Inmunol Clín, 2004; (Extraordinario 2): p. 404-5.
110. Panesar, S. S., S. Javad, et al., *The epidemiology of anaphylaxis in Europe: a systematic review*. Allergy, 2013. **68**(11): p. 1353-61.
111. Van der Klauw, M. M., J. H. Wilson, et al., *Drug-associated anaphylaxis: 20 years of reporting in The Netherlands (1974-1994) and review of the literature*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(12): p. 1355-63.
112. Renaudin, J. M., E. Beaudouin, et al., *Severe drug-induced anaphylaxis: analysis of 333 cases recorded by the Allergy Vigilance Network from 2002 to 2010*. Allergy, 2013. **68**(7): p. 929-37.
113. Ribeiro-Vaz, I., J. Marques, et al., *Drug-induced anaphylaxis: a decade review of reporting to the Portuguese Pharmacovigilance Authority*. Eur J Clin Pharmacol, 2013. **69**(3): p. 673-81.

114. Banerji, A., S. Rudders, et al., *Retrospective study of drug-induced anaphylaxis treated in the emergency department or hospital: patient characteristics, management, and 1-year follow-up.* J Allergy Clin Immunol Pract, 2014. **2**(1): p. 46-51.
115. Roujeau, J. C., J. C. Guillaume, et al., *Toxic epidermal necrolysis (Lyell syndrome). Incidence and drug etiology in France, 1981-1985.* Arch Dermatol, 1990. **126**(1): p. 37-42.
116. Schopf, E., A. Stuhmer, et al., *Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. An epidemiologic study from West Germany.* Arch Dermatol, 1991. **127**(6): p. 839-42.
117. Mockenhaupt, M., C. Viboud, et al., *Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: assessment of medication risks with emphasis on recently marketed drugs. The EuroSCAR-study.* J Invest Dermatol, 2008. **128**(1): p. 35-44.
118. Rare Diseases Task Force and Orpha News Europe. Orpha News: the newsletter of the rare diseases community. En: [www.orphanet.net/actor/EuropaNews/2006/060124.html](http://www.orphanet.net/actor/EuropaNews/2006/060124.html) (fecha consulta: 21 de Marzo de 2014).
119. Rzany, B., M. Mockenhaupt, et al., *Epidemiology of erythema exudativum multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis in Germany (1990-1992): structure and results of a population-based registry.* J Clin Epidemiol, 1996. **49**(7): p. 769-73.
120. Sidoroff, A., A. Dunant, et al, *Risk factors for acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP)-results of a multinational case-control study (EuroSCAR).* Br J Dermatol, 2007. **157**(5): p. 989-96.
121. Sullivan JR, Shear NH. *The drug hypersensitivity syndrome: what is the pathogenesis?* Arch Dermatol, 2001; **137**: p. 357-64.
122. Dewdney JM. *Immunology of the antibiotics.* En: Sela M, ed. *The Antigens 5.* New York: Academic Press; 1977. p. 73-245.
123. Weiss ME, Adkinson NF., *Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics.* Clin Allergy, 1988; **18**: p. 515-40.
124. García A, Prieto C., *Utilización de antiinfecciosos en España durante el periodo 1982-1987.* Inf Ter Segur Soc, 1988; **12**: p. 181-192.
125. Vickers MR, Assem ES. *Tests for penicillin allergy in man. I. Carrier effect on response to penicilloyl conjugates.* Immunology, 1974; **26**(2): p. 425-40.
126. Levine, B. B. and A. P. Redmond, *Minor haptenic determinant-specific reagins of penicillin hypersensitivity in man.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1969. **35**(5): p. 445-55.
127. Levine, B. B., A. P. Redmond, et al., *Penicillin allergy and the heterogenous immune responses of man to benzylpenicillin.* J Clin Invest, 1966. **45**(12): p. 1895-906.

128. Levine, B. B., A. P. Redmond, et al., *Prediction of penicillin allergy by immunological tests.* Ann N Y Acad Sci, 1967. **145**(2): p. 298-309.
129. Torres MJ, Mayorga C, Pamies R, Rodriguez JL, Juarez C, Romano A, Blanca M. *Immunologic response to different determinants of benzylpenicillin, amoxicillin, and ampicillin. Comparison between urticaria and anaphylactic shock.* Allergy, 1999; **54**(9):936-43.
130. Blanca M, Vega JM, García J, Miranda A, Carmona MJ, Juarez C, Terrados S, Fernández J. *New aspects of allergic reactions to beta-lactams: Cross- reactions and unique specificities.* Clin. Exp. Allergy, 1994; **24**: p. 407-15.
131. Atsumi T, Nishida K, Kinoshita Y, Shibata K, Horiuchi Y. *The heterogeneity of combining sites of the penicillin antibodies obtained from single rabbit.* J. Immunol, 1967; **99**: p. 1286-93.
132. De Haan, P., A. J. de Jonge, et al., *Three epitope-specific monoclonal antibodies against the hapten penicillin.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1985. **76**(1): p. 42-6.
133. Pham, N. H. and B. A. Baldo, *Beta-Lactam drug allergens: fine structural recognition patterns of cephalosporin-reactive IgE antibodies.* J Mol Recognit, 1996. **9**(4): p. 287-96.
134. Romano, A., D. Quarantino, et al., *A diagnostic protocol for evaluating nonimmediate reactions to aminopenicillins.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(6): p. 1186-90.
135. Blanca M, Fernández J, Miranda A, Terrados S, Torres MJ, Vega JM et al., *Cross-reactivity between penicillins and cephalosporins: clinical and immunologic studies.* J Allergy Clin Immunol, 1989; **83**: p. 381-5.
136. Moss R. B, McClelland E, Williams R.R, Hilman C, Rubio T, Adkinson N. F. *Evaluation of the Immunologic Cross-Reactivity of Aztreonam in Patients with Cystic Fibrosis Who Are Allergic to Penicillin and/or Cephalosporin Antibiotics.* Rev. Infect Dis, 1991; **13** (Suppl 7): S598-607.
137. Saxon, A., D. C. Adelman, et al., *Imipenem cross-reactivity with penicillin in humans.* J Allergy Clin Immunol, 1988. **82**(2): p. 213-7.
138. Romano, A., M. Viola, et al., *Brief communication: tolerability of meropenem in patients with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins.* Ann Intern Med, 2007. **146**(4): p. 266-9.
139. Atanaskovic-Markovic, M., F. Gaeta, et al., *Tolerability of meropenem in children with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins.* Allergy, 2008. **63**(2): p. 237-40.
140. Sanchez-Morillas, L., P. R. Perez-Ezquerria, et al., *Selective allergic reactions to clavulanic acid: a report of 9 cases.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(1): p. 177-9.
141. Bonadonna, P., M. Schiappoli, et al., *Delayed selective reaction to clavulanic acid: a case report.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2005. **15**(4): p. 302-4.

142. Raison-Peyron, N., D. Messaad, et al., *Selective immediate hypersensitivity to clavulanic acid*. Ann Pharmacother, 2003. **37**(7-8): p. 1146-7.
143. Torres, M. J., M. Blanca, et al., *Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics*. Allergy, 2003. **58**(10): p. 961-72.
144. Romano, A., M. Blanca, et al., *Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics*. Allergy, 2004. **59**(11): p. 1153-60.
145. Demoly, P., R. Kropf, et al., *Drug hypersensitivity: questionnaire. EAACI interest group on drug hypersensitivity*. Allergy, 1999. **54**(9): p. 999-1003.
146. Blanca, M., J. M. Vega, et al., *Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to beta-lactams*. Clin Exp Allergy, 1990. **20**(5): p. 475-81.
147. Torres, M. J., A. Romano, et al., *Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing*. Allergy, 2001. **56**(9): p. 850-6.
148. Sullivan, T. J., H. J. Wedner, et al., *Skin testing to detect penicillin allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1981. **68**(3): p. 171-80.
149. Green, G. R., A. H. Rosenblum, et al., *Evaluation of penicillin hypersensitivity: value of clinical history and skin testing with penicilloyl-polylysine and penicillin G. A cooperative prospective study of the penicillin study group of the American Academy of Allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1977. **60**(6): p.339-45.
150. Adkinson NF Jr, Thompson WL, Maddrey WC, Lichtenstein LM., *Routine use of penicillin skin testing on an inpatient service*. N Engl J Med, 1971; **285**(1): p. 22-4.
151. Finke, S. R. *Recent advances in the diagnosis of penicillin allergy. Results of study*. N Y State J Med, 1964. **64**(13): p. 1705-7.
152. Chandra, R. K., S. A. Joglekar, et al., *Penicillin allergy: anti-penicillin IgE antibodies and immediate hypersensitivity skin reactions employing major and minor determinants of penicillin*. Arch Dis Child, 1980. **55**(11): p. 857-60.
153. Solley, G. O., G. J. Gleich, et al., *Penicillin allergy: clinical experience with a battery of skin-test reagents*. J Allergy Clin Immunol, 1982. **69**(2): p. 238-44.
154. Pichichero, M. E. and D. M. Pichichero, *Diagnosis of penicillin, amoxicillin, and cephalosporin allergy: reliability of examination assessed by skin testing and oral challenge*. J Pediatr, 1998. **132**(1): p. 137-43.
155. Alvarez E, Ibáñez MD, Cuesta J. *Alergia a penicilina y otros betalactámicos*. En: Tratado de Alergología e Inmunología clínica. Tomo VII. Alergología Clínica V. Primera edición. SEAC. 1986; p. 211-36.
156. Van Dellen RG, Gleich GJ., *Penicillin skin tests as predictive and diagnostic aids in penicillin allergy*. Med Clin North Am, 1970; **54**(4): p. 997-1007.

157. Silviu-Dan, F., S. McPhillips, et al., *The frequency of skin test reactions to side-chain penicillin determinants*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **91**(3): p. 694-701.
158. Valyasevi, M. A. and R. G. Van Dellen, *Frequency of systematic reactions to penicillin skin tests*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(5): p. 363-5.
159. Bigby M, Jick S, Jick H, Arndt K. *Drug-induced cutaneous reactions: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program on 15.438 consecutive in patients, 1975-1982*. JAMA, 1986; **256**: p. 3358-63.
160. Terrados S, Blanca M, García J, Vega JM, Torres MJ, Carmona MJ et al., *Non-immediate reactions to betalactams: prevalence and role of the different penicillins*. Allergy, 1995; **50**: p. 563-7.
161. Romano A, Di Fonso M, Papa G, Pietroantonio F, Federico F, Fabrizi G et al., *Evaluation of adverse cutaneous reactions to aminopenicillins with emphasis on those manifested by maculopapular rashes*. Allergy, 1995; **50**: p. 113-8.
162. Patriarca F, D'Ambrosio C, Schiviano D, Larocca LM, Nuceri E, Milano A. *Clinical usefulness of patch and challenge test in the diagnosis of cell-mediated allergy to beta-lactams*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1999; **83**: p. 257-66.
163. Moller NE, Jeppesen K. *Patch testing with semisynthetic penicillins*. Contact Dermatitis, 1987; **16**: p. 227-8.
164. Hertl M, Geisel J, Boecker C, Merk HF. *Selective generation of CD8+ T-cell clones from the peripheral blood of patients with cutaneous reactions to beta-lactam antibiotics*. Br J Dermatol, 1993; **128**: p. 619-26.
165. Barboud A, Reichert-Penetrat S, Tréchet P, Jacquin-Petit MA, Ehlinger A, Noirez V et al. *The use of skin testing in the investigation of cutaneous adverse drug reactions*. Br J Dermatol, 1998; **139**: p. 49-58
166. Osawa J, Naito S, Aihara M, Kitamura K, Ikezawa Z, Nakajima H. *Evaluation of skin test reactions in patients with non-immediate type drug eruptions*. J Dermatol, 1990; **17**: p. 235-9.
167. Torres MJ, Sánchez-Sabaté E, Álvarez J, Mayorga C, Fernández J, Padial A et al. *Skin test evaluation in non-immediate allergic reactions to penicillins*. Allergy, 2004; **59**: p. 219-24.
168. Vega JM, Blanca M, Carmona MJ, García J, Claros A, Juárez C et al., *Delayed allergic reactions to betalactams*. Allergy, 1991; **46**: p. 154-7.
169. Schnyder B, Helbling A, Kappeler A, Pichler WJ. *Drug-induced papulovesicular exanthema*. Allergy, 1998; **53**: p. 817-8.
170. Romano, A., M. Viola, et al., *Diagnosing nonimmediate reactions to penicillins by in vivo tests*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(2): p. 169-74.

171. Blanca, M., M. J. Torres, et al., *Natural evolution of skin test sensitivity in patients allergic to beta-lactam antibiotics*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(5 Pt 1): p. 918-24.
172. Torres, M. J., C. Mayorga, et al., *Controlled administration of penicillin to patients with a positive history but negative skin and specific serum IgE tests*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(2): p. 270-6.
173. Aberer, W., A. Bircher, et al., *Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations*. Allergy, 2003. **58**(9): p. 854-63.
174. Wide, L. and L. Juhlin, *Detection of penicillin allergy of the immediate type by radioimmunoassay of reagins (IgE) to penicilloyl conjugates*. Clin Allergy, 1971. **1**(2): p. 171-7.
175. Edwards RG, Spackman DA, Dewdney JM. *Development and use of three new radioallergosorbent tests in the diagnosis of penicillin allergy*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1982; **68**: p. 352-7.
176. Bolzacchini E, Consonni V, Gramatica P, Meinardi S, Orlandi M, Rindone B et al. *Towards an in vitro test for the diagnosis of allergy to penicillins. Synthesis, characterization and use of betalactam and betalactam metabolite poly-L-lysines which recognize human IgE antibodies*. Bioconjugate Chemistry, 1999; **10**: p. 332-7.
177. Harle DG, Baldo BA. *Drugs as allergens: An immunoassay for detecting IgE antibodies to cephalosporins*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990; **92**: p. 439-44.
178. Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, Reche M, Moya MC, Rodríguez JL et al. *Clinical evaluation of Pharmacia CAP System% RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy*. Allergy, 2001; **56**: p. 862-70.
179. Blanca M, Mayorga C, Pérez E, Suau R, Juárez C, Vega JM et al. *Determination of IgE antibodies to the benzylpenicilloyl determinant. A comparison between poly-L-lysine and human serum albumin as carriers*. J Immunol Methods, 1992; **153**: p. 99-105.
180. Kraft D, Wide L. *Clinical patterns and results of radioallergosorbent test (RAST) and skin tests in penicillin allergy*. Br J Dermatol, 1976; **94**: p. 593-601.
181. Cuesta J, Alvarez Cuesta E, Cuevas M, Armentia A, Puyana J, Carrillo T. *Diagnosis of allergy to penicillin: seric detection of the specific IgE (modified RAST) vs skin test (ST)*. Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin., 1987; **2**(3): p. 252.
182. Sanz ML, Garcia BE, Prieto I, Tabar A, Oehling A. *Specific IgE determination in the diagnosis of beta-lactam allergy*. J Investig Allergol Clin Immunol, 1996 ; **6**(2): p. 89-93.
183. Kraft, D., A. Roth, et al. *Specific and total serum IgE measurements in the diagnosis of penicillin allergy. A long term follow-up study*. Clin Allergy, 1977. **7**(1): p. 21-8.
184. Posadas S, Juárez C, Torres MJ, de la Fuente J, García JJ, Blanca MM. *Seguimiento de los valores de RAST en sujetos con anticuerpos IgE específicos a beta-lactámicos*. Rev Esp Alergol Inmunol Clin, 1997; **12**: p. 7-8.

185. Kraft D, Berglund A, Rumpold H, Roth A, Ebner H. *Radioallergosorbent test with conjugates specific for 'minor' haptenic determinants in the diagnosis of IgE-mediated penicillin allergy in man.* Clin Allergy, 1981; **11**(6): p.579-87.
186. Garcia, J. J., M. Blanca, et al., *Determination of IgE antibodies to the benzylpenicilloyl determinant: a comparison of the sensitivity and specificity of three radio allergo sorbent test methods.* J Clin Lab Anal, 1997. **11**(5): p. 251-7.
187. Szczeklik, A. and D. D. Stevenson, *Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(5): p. 913-21; quiz 922.
188. Johansson, S. G., J. O. Hourihane, et al. *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* Allergy, 2001.**56**(9): p. 813-24.
189. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003.* J Allergy Clin Immunol, 2004; **113**: p. 832-6.
190. Anderson, J. A. and N. F. Adkinson, Jr. *Allergic reactions to drugs and biologic agents.* JAMA, 1987. **258**(20): p. 2891-9.
191. Szczeklik A, Nizankowska-Mogilnicka E, Sanak M. *Hypersensitivity to Aspirin and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs.* In: Adkinson, Busse, Bochner, Holgate, Simons&Lemanske, editors. Middleton's Allergy 7th Edition. Mosby Elsevier; 2009: p. 1227-43.
192. Stevenson DD, Sanchez-Borges M, Szczeklik A. *Classification of allergic and pseudoallergic reactions to drugs that inhibit cyclooxygenase enzymes.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2001; **87**(3): p. 177-80.
193. Kowalski ML, Makowska JS, Blanca M, et al., *Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) – classification, diagnosis and management: review of the EAACI/ENDA and GA2LEN/HANNA.* Allergy, 2011; **66**: p. 818-829.
194. Doña I, Blanca-Lopez N, Torres MJ, Garcia-Campos J, Garcia-Nuñez I, Gómez F, Salas M, Rondon C, Canto MG, Blanca M. *Drug hypersensitivity reactions: patterns of responses, drug involved and temporal variation in a large series of patients evaluated.* J Investigat Allergy Clin Immunol, 2012; **22**(5): p. 363-71.
195. Torres MJ, Barrionuevo E, Kowalski M, Blanca M. *Hypersensitivity Reactions to Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs.* Immunol Allergy Clin North Am, 2014; **34**(3): p. 507-524.
196. Setticone, R. A., H. P. Constantine, et al., *Aspirin intolerance and recurrent urticaria in normal adults and children. Epidemiology and review.* Allergy, 1980. **35**(2): p. 149-54.

197. Vally, H., M. L. Taylor, et al. *The prevalence of aspirin intolerant asthma (AIA) in Australian asthmatic patients.* Thorax, 2002. **57**(7): p. 569-74.
198. Kasper, L., K. Sladek, et al., *Prevalence of asthma with aspirin hypersensitivity in the adult population of Poland.* Allergy, 2003. **58**(10): p. 1064-6.
199. Jenkins, C., J. Costello, et al., *Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice.* BMJ, 2004. **328**(7437): p. 434.
200. Kim, J. E. and S. E. Kountakis, *The prevalence of Samter's triad in patients undergoing functional endoscopic sinus surgery.* Ear Nose Throat J, 2007. **86**(7): p. 396-9.
201. Dona, I., N. Blanca-Lopez, et al., *Characteristics of subjects experiencing hypersensitivity to non-steroidal anti-inflammatory drugs: patterns of response.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(1): p. 86-95.
202. Sanchez-Borges, M., A. Capriles-Hulett, et al., *NSAID-induced urticaria and angioedema: a reappraisal of its clinical management.* Am J Clin Dermatol, 2002. **3**(9): p. 599-607.
203. Erbagci Z. *Multiple NSAID intolerance in chronic idiopathic urticaria is correlated with delayed, pronounced and prolonged autoreactivity.* J Dermatol, 2004; **31**(5): p. 376-82.
204. Stevenson, D. D. *Aspirin and NSAID sensitivity.* Immunol Allergy Clin North Am, 2004. **24**(3): p. 491-505, vii.
205. Asero, R. *Multiple sensitivity to NSAID.* Allergy, 2000. **55**(9): p. 893-4.
206. Van der Klauw, M. M., B. H. Stricker, et al., *A population based case-cohort study of drug-induced anaphylaxis.* Br J Clin Pharmacol, 1993. **35**(4): p. 400-8.
207. Berkes, E. A. *Anaphylactic and anaphylactoid reactions to aspirin and other NSAIDs.* Clin Rev Allergy Immunol, 2003. **24**(2): p. 137-48.
208. Kemp, S. F., R. F. Lockey, et al., *Anaphylaxis. A review of 266 cases.* Arch Intern Med, 1995. **155**(16): p. 1749-54.
209. Mullins, R. J., *Anaphylaxis: risk factors for recurrence.* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(8): p. 1033-40.
210. Cianferoni, A., E. Novembre, et al., *Clinical features of acute anaphylaxis in patients admitted to a university hospital: an 11-year retrospective review (1985-1996).* Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **87**(1): p. 27-32.
211. Levy, M. B. and J. N. Fink, *Anaphylaxis to celecoxib.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **87**(1): p. 72-3.
212. Canto, M. G., I. Andreu, et al., *Selective immediate hypersensitivity reactions to NSAIDs.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009. **9**(4): p. 293-7.

213. Asero, R. *Oral aspirin challenges in patients with a history of intolerance to single non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(6): p. 713-6.
214. Layton, D., V. Marshall, et al., *Serious skin reactions and selective COX-2 inhibitors: a case series from prescription-event monitoring in England*. Drug Saf, 2006. **29**(8): p. 687-96.
215. Mockenhaupt, M., J. P. Kelly, et al., *The risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs: a multinational perspective*. J Rheumatol, 2003. **30**(10): p. 2234-40.
216. Farooque, S. P. and T. H. Lee, *Aspirin-sensitive respiratory disease*. Annu Rev Physiol, 2009. **71**: p. 465-87.
217. Sousa, A. R., A. Parikh, et al., *Leukotriene-receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells in aspirin-sensitive rhinosinusitis*. N Engl J Med, 2002. **347**(19): p. 1493-9.
218. Celik G, Bavbek S, Misirligil Z, Melli M. *Release of cysteinyl leukotrienes with aspirin stimulation and the effect of prostaglandin E(2) on this release from peripheral blood leucocytes in aspirin-induced asthmatic patients*. Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, 2001; **31**(10): p. 1615-22.
219. Sestini, P., L. Armetti, et al., *Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin-sensitive asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(2): p. 572-5.
220. Corrigan, C. J., R. L. Napoli, et al., *Reduced expression of the prostaglandin E2 receptor E-prostanoid 2 on bronchial mucosal leukocytes in patients with aspirin-sensitive asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1636-46.
221. Wang, X. S., A. Y. Wu, et al., *PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leukotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease*. Allergy, 2007. **62**(6): p. 620-7.
222. Colom NRORJQEJFLLP. *Reacciones adversas a los AINE: alergia, intolerancia*. In: González APHIJD, editor. Tratado Alergología. Madrid: Ergón; 2007. p. 1461-81.
223. Szczeklik, A. *The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma*. Eur Respir J, 1990. **3**(5): p. 588-93.
224. Kim, S. H. and H. S. Park, *Genetic markers for differentiating aspirin-hypersensitivity*. Yonsei Med J, 2006. **47**(1): p. 15-21.
225. Mastalerz, L., M. Setkowicz, et al., *Hypersensitivity to aspirin: common eicosanoid alterations in urticaria and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(4): p. 771-5.
226. Setkowicz, M., L. Mastalerz, et al., *Clinical course and urinary eicosanoids in patients with aspirin-induced urticaria followed up for 4 years*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 174-8.

227. Asero, R. *Predictive value of autologous plasma skin test for multiple nonsteroidal anti-inflammatory drug intolerance.* Int Arch Allergy Immunol, 2007. **144**(3): p. 226-30.
228. Asero, R. *Risk factors for acetaminophen and nimesulide intolerance in patients with NSAID-induced skin disorders.* Ann Allergy Asthma Immunol, 1999. **82**(6): p. 554-8.
229. Asero R. *Intolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs might precede by years the onset of chronic urticaria.* The Journal of allergy and clinical immunology, 2003; **111**(5): p. 1095-8.
230. Cornejo-Garcia, J. A., L. R. Jagemann, et al., *Genetic variants of the arachidonic acid pathway in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced acute urticaria.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(12): p. 1772-81.
231. Palikhe, N. S., S. H. Kim, et al., *Association of thromboxane A2 receptor (TBXA2R) gene polymorphism in patients with aspirin-intolerant acute urticaria.* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(2): p. 179-85.
232. Himly, M., B. Jahn-Schmid, et al., *IgE-mediated immediate-type hypersensitivity to the pyrazolone drug propyphenazone.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 882-8.
233. Schuster, C. and B. Wuthrich, *Anaphylactic drug reaction to celecoxib and sulfamethoxazole: cross reactivity or coincidence?* Allergy, 2003. **58**(10): p. 1072.
234. Fontaine C, Bousquet PJ, Demoly P., *Anaphylactic shock caused by a selective allergy to celecoxib, with no allergy to rofecoxib or sulfamethoxazole.* J Allergy Clin Immunol, 2005; **115**(3): p. 633-4.
235. Posadas, S. J. and W. J. Pichler, *Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts.* Clin Exp Allergy, 2007. **37**(7): p. 989-99.
236. Blanca-Lopez, N., J. T. M, et al. *Value of the clinical history in the diagnosis of urticaria/angioedema induced by NSAIDs with cross-intolerance.* Clin Exp Allergy, 2012. **43**(1): p. 85-91.
237. Yoshimine, F., T. Hasegawa, et al., *Contribution of aspirin-intolerant asthma to near fatal asthma based on a questionnaire survey in Niigata Prefecture, Japan.* Respirology, 2005. **10**(4): p. 477-84.
238. Szczeklik, A. and E. Nizankowska, *Clinical features and diagnosis of aspirin induced asthma.* Thorax, 2000. **55 Suppl 2**: S42-4.
239. Berges-Gimeno, M. P., R. A. Simon, et al., *Long-term treatment with aspirin desensitization in asthmatic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(1): p. 180-6.
240. Grzelewska-Rzymowska, I., M. Szmidt, et al., *Urticaria/angioedema-type sensitivity to aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Diagnostic value of anamnesis and challenge test with acetylsalicylic acid.* J Investig Allergol Clin Immunol, 1992. **2**(4): p. 191-5.

241. Kowalski, M. L., B. Bienkiewicz, et al., *Diagnosis of pyrazolone drug sensitivity: clinical history versus skin testing and in vitro testing*. Allergy Asthma Proc, 1999. **20**(6): p. 347-52.
242. Ophaswongse, S. and H. Maibach, *Topical nonsteroidal antiinflammatory drugs: allergic and photoallergic contact dermatitis and phototoxicity*. Contact Dermatitis, 1993. **29**(2): p. 57-64.
243. Del Pozo, M. D., T. Lobera, et al., *Selective hypersensitivity to diclofenac*. Allergy, 2000. **55**(4): p. 412-3.
244. Brandao FM, Goossens A, Tosti A. *Topical drugs*. En: Rycroft RJG, Menné T, Frosch PJ, Lepoittevin, eds. Textbook of Contact Dermatitis. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 689-23.
245. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antepará I, Urrutia I, Jauregui I, et al. *Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients*. Allergy, 2003; **58**: p. 312-7.
246. Gómez E, Blanca-López N, Torres MJ, Requena G, Rondon C, Canto G et al. *Immunoglobulin E-mediated immediate allergic reactions to dipyrone: value of basophil activation test in the identification of patients*. Clin Exp Allergy, 2009; **39**: p. 1217-24.
247. Whittam LR, Wakelin SH, Barker JN. *Generalized pustular psoriasis or drug-induced toxic pustuloderma? The use of patch testing*. Clin Exp Dermatol, 2000; **25**: p. 122-4.
248. Zedlitz S, Linzbach L, Kauffmann R, Boehncke WH. *Reproducible identification of the causative drug of a fix drug eruption by oral provocation and lesional patch testing*. Contact Dermatitis, 2002; **46**: p. 352-53.
249. Naisbitt, D. J., M. Pirmohamed, et al., *Immunopharmacology of hypersensitivity reactions to drugs*. Curr Allergy Asthma Rep, 2003. **3**(1): p. 22-9.
250. Alfirevic, A. and M. Pirmohamed, *Drug-induced hypersensitivity reactions and pharmacogenomics: past, present and future*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(4): p. 497-9.
251. Gueant, J. L., R. M. Gueant-Rodriguez, et al., *Pharmacogenetic determinants of immediate and delayed reactions of drug hypersensitivity*. Curr Pharm Des, 2008. **14**(27): p. 2770-7.
252. Qiao, H. L., J. Yang, et al., *Specific serum IgE levels and FcepsilonRIbeta genetic polymorphism in patients with penicillins allergy*. Allergy, 2004. **59**(12): p. 1326-32.
253. Bursztejn, A. C., A. Romano, et al., *Allergy to betalactams and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) gene polymorphisms*. Allergy, 2013. **68**(8): p. 1076-80.

254. Romano A, De Santis A, et al., *Delayed hypersensitivity to aminopenicillins is related to major histocompatibility complex genes*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1998; 80(5): p. 433-7.
255. Kim, S. H., Y. M. Ye, et al., *Genetic mechanism of aspirin-induced urticaria/angioedema*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2006. 6(4): p. 266-70.
256. Kim SH, Choi JH et al., *The human leucocyte antigen-DRB1\*1302-DQB1\*0609-DPB1\*0201 haplotype may be a strong genetic marker for aspirin-induced urticaria*. Clin Exp Allergy, 2005; 35(3): p. 339-44.
257. Bae, J. S., S. H. Kim, et al., *Significant association of FcepsilonRIalpha promoter polymorphisms with aspirin-intolerant chronic urticaria*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(2): p. 449-56.
258. Choi, J. H., S. H. Kim, et al., *Polymorphisms of high-affinity IgE receptor and histamine-related genes in patients with ASA-induced urticaria/angioedema*. J Korean Med, 2005. Sci 20(3): p. 367-72.
259. Vidal, C., L. Porras-Hurtado, et al., *Association of thromboxane A1 synthase (TBXAS1) gene polymorphism with acute urticaria induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. J Allergy Clin Immunol, 2013. 132(4): p. 989-91.
260. Song, Y. S., E. M. Yang, et al., *Effect of genetic polymorphism of ALOX15 on aspirin-exacerbated respiratory disease*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. 159(2): p. 157-61.
261. Marsh, D. G., J. D. Neely, et al., *Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations*. Science, 1994. 264 (5162): p. 1152-6.
262. Rosenwasser, L. J., D. J. Klemm, et al., *Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy*. Clin Exp Allergy, 1995. 25 Suppl 2: p. 74-8; discussion 95-6.
263. Hershey, G. K., M. F. Friedrich, et al., *The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor*. N Engl J Med, 1997. 337(24): p. 1720-5.
264. Qiao HL, Yang J, Zhang YW, *Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Ralpha in patients with penicillins allergy*. Allergy, 2005; 60(8): p. 1053-9.
265. Huang, C. Z., J. Yang, et al., *Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4Ralpha Q576R and I75V in patients with penicillin allergy*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. 65(9): p. 895-902.
266. Kerdine S, Lebrec H, et al., *Interleukin-4 plays a dominant role in Th1- or Th2-like responses during the primary immune response to the hapten penicillin*. Mol Immunol, 1996; 33(1): p. 71-7.

267. Brugnolo, F., F. Annunziato, et al., *Highly Th2-skewed cytokine profile of beta-lactam-specific T cells from nonatopic subjects with adverse drug reactions*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 1053-9.
268. Apter, A. J., H. Schelleman, et al., *Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(1): p. 152-8.
269. Guglielmi, L., C. Fontaine, et al., *IL-10 promoter and IL4-Ralpha gene SNPs are associated with immediate beta-lactam allergy in atopic women*. Allergy, 2006. **61**(8): p. 921-7.
270. Qiao, H. L., Q. Wen, et al., *Association of IL-10 level and IL-10 promoter SNPs with specific antibodies in penicillin-allergic patients*. Eur J Clin Pharmacol, 2007. **63**(3): p. 263-9.
271. Mäkelä MJ, Kanehiro A, et al., *IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; **97**(11): p. 6007-12.
272. Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 271-83.
273. Gueant-Rodriguez, R. M., A. Romano, et al., *Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics*. Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(10): p. 713-9.
274. Gueant-Rodriguez, R. M., J. L. Gueant, et al., *Association of tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population*. Pharmacogenomics J, 2008. **8**(2): p. 162-8.
275. Jung, V., A. Rashidbaigi, et al., *Human chromosomes 6 and 21 are required for sensitivity to human interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(12): p. 4151-5.
276. Soh, J., R. J. Donnelly, et al., *Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor*. Cell, 1994. **76**(5): p. 793-802.
277. Trent, J. M., S. Olson, et al., *Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7809-13.
278. Le Coniat, M., C. Alcaide-Loridan, et al., *Human interferon gamma receptor 1 (IFNGR1) gene maps to chromosome region 6q23-6q24*. Hum Genet, 1989. **84**(1): p. 92-4.
279. Itoh, S., H. Harada, et al., *Assignment of the human interferon regulatory factor-1 (IRF1) gene to chromosome 5q23-q31*. Genomics, 1991. **10**(4): p. 1097-9.
280. Nakao, F., K. Ihara, et al., *Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(3): p. 499-504.

281. Khani-Hanjani A, Lacailla D, et al., *Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis*. Lancet, 2000; **356**(9232): p. 820-5.
282. Constantin, A., F. Navaux, et al., *Interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis*. Lancet, 2001. **358**(9298): p. 2051-2.
283. Tanaka, Y., H. Nakashima, et al., *Association of the interferon-gamma receptor variant (Val14Met) with systemic lupus erythematosus*. Immunogenetics, 1999. **49**(4): p. 266-71.
284. Gao N, Qiao HL et al., *Relationships between specific serum IgE, IgG, IFN-gamma level and IFN-gamma, IFNR1 polymorphisms in patients with penicillin allergy*. Eur J Clin Pharmacol, 2008; **64**(10): p. 971-7.
285. Kruse, S., J. Kuehr, et al., *Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(1): p. 117-22.
286. Lee, C. C., W. Y. Lin, et al., *Association of interleukin-18 gene polymorphism with asthma in Chinese patients*. J Clin Lab Anal, 2008. **22**(1): p. 39-44.
287. Osawa K, Etoh T, et al., *Relationship between Kaposi's varicelliform eruption in Japanese patients with atopic dermatitis treated with tacrolimus ointment and genetic polymorphisms in the IL-18 gene promoter region*. J Dermatol, 2007; **34**(8): p. 531-6.
288. Ming, L., Q. Wen, et al., *Interleukin-18 and IL18 -607A/C and -137G/C gene polymorphisms in patients with penicillin allergy*. J Int Med Res, 2011. **39**(2): p. 388-98.
289. Cornejo-Garcia, J. A., R. M. Gueant-Rodriguez, et al., *Biological and genetic determinants of atopy are predictors of immediate-type allergy to betalactams, in Spain*. Allergy, 2013. **67**(9): p. 1181-5.
290. Christie, P. E., P. Tagari, et al., *Urinary leukotriene E4 after lysine-aspirin inhalation in asthmatic subjects*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(6): p. 1531-4.
291. Smith, C. M., R. J. Hawksworth, et al., *Urinary leukotriene E4 in bronchial asthma*. Eur Respir J, 1992. **5**(6): p. 693-9.
292. Holgate, S. T. and A. P. Sampson, *Antileukotriene therapy. Future directions*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): S147-53.
293. Drazen, J. M., E. Israel, et al., *Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway*. N Engl J Med, 1999. **340**(3): p. 197-206.
294. Dekker, J. W., E. Nizankowska, et al., *Aspirin-induced asthma and HLA-DRB1 and HLA-DPB1 genotypes*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(5): p. 574-7.

295. Choi JH, Lee KW, et al., *HLA association in aspirin-intolerant asthma: DPB1\*0301 as a strong marker in a Korean population*. J Allergy Clin Immunol, 2004; **113**: 562-564.
296. Sanak, M., H. U. Simon, et al., *Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma*. Lancet, 1997. **350**(9091): p. 1599-600.
297. Kawagishi, Y., H. Mita, et al., *Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(6): p. 936-42.
298. Van Sambeek, R., D. D. Stevenson, et al., *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**(1 Pt 1): p. 72-6.
299. Choi, J. H., H. S. Park, et al., *Leukotriene-related gene polymorphisms in ASA-intolerant asthma: an association with a haplotype of 5-lipoxygenase*. Hum Genet, 2004. **114**(4): p. 337-44.
300. Sayers, I., S. Barton, et al., *Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leukotriene C4 synthase gene (LTC4S) in asthma*. Thorax, 2003. **58**(5): p. 417-24.
301. In K. H., K. Asano, et al., *Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription*. J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 1130-7.
302. Kim, S. H., J. S. Bae, et al., *Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: a positive association with airway hyperresponsiveness*. Allergy, 2005. **60**(6): p. 760-5.
303. Kim SH, Park HS, et al., *A strong association of three genetic variants of CYSLTR1 with ASA-intolerant asthma phenotype*. J Allergy Clin Immunol, 2005; **115**: s134.
304. Park, J. S., H. S. Chang, et al., *Association analysis of cysteinyl-leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics*. Pharmacogenet Genomics, 2005. **15**(7): p. 483-92.
305. Jinnai, N., T. Sakagami, et al., *Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: a candidate gene approach*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24): p. 3203-17.
306. Kim, S. H., J. H. Choi, et al., *Association of thromboxane A2 receptor gene polymorphism with the phenotype of acetyl salicylic acid-intolerant asthma*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(5): p. 585-90.
307. Kim SH, Bae JS, et al., *Genetic polymorphism of FcεR16-109T>C is associated with a susceptibility to aspirin-intolerant asthma*. J Asthma Allergy Immunol, 2005; **25**: s248.
308. Akahoshi, M., K. Obara, et al., *Functional promoter polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma*. Hum Genet, 2005. **117**(1): p. 16-26.

309. Bradley, D. T. and S. E. Kountakis, *Role of interleukins and transforming growth factor-beta in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis*. Laryngoscope, 2005. **115**(4): p. 684-6.
310. Watelet, J. B., C. Claeys, et al., *Transforming growth factor beta1 in nasal remodeling: differences between chronic rhinosinusitis and nasal polyposis*. Am J Rhinol, 2004. **18**(5): p. 267-72.
311. Lee, Y. M., S. S. Kim, et al., *Eosinophil inflammation of nasal polyp tissue: relationships with matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta1*. J Korean Med Sci, 2003. **18**(1): p. 97-102.
312. Nagpal, K., S. Sharma, et al., *TGFbeta1 haplotypes and asthma in Indian populations*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(3): p. 527-33.
313. Pulleyn, L. J., R. Newton, et al., *TGFbeta1 allele association with asthma severity*. Hum Genet, 2001. **109**(6): p. 623-7.
314. Seung-Hyun Kim, Hae-Sim Park, et al., *Association between a TGFb1 promoter polymorphism and rhinosinusitis in aspirin-intolerant asthmatic patients*. Respiratory Medicine, 2007. **101**: p. 490-495.
315. Kim SH, Yang EM, et al., *Combined effect of IL-10 and TGF-beta1 promoter polymorphisms as a risk factor for aspirin-intolerant asthma and rhinosinusitis*. Allergy, 2009; **64**(8): p. 1221-1225.
316. Fuss, I. J., M. Boirivant, et al., *The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 900-8.
317. Hobbs, K., J. Negri, et al., *Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1958-62.
318. Kim, S. H., Y. M. Ye, et al., *Association of TNF-alpha genetic polymorphism with HLA DPB1\*0301*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(10): p. 1247-53.
319. Kim BS, Park SM, et al., *Effect of single nucleotide polymorphisms within the interleukin-4 promoter on aspirin intolerance in asthmatics and interleukin-4 promoter activity*. Pharmacogenet Genomics, 2010; **20**(12): p. 748-758.
320. Kim, S. H., J. H. Choi, et al., *The human leucocyte antigen-DRB1\*1302-DQB1\*0609-DPB1\*0201 haplotype may be a strong genetic marker for aspirin-induced urticaria*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(3): p. 339-44.
321. Mastalerz, L., M. Setkowicz, et al., *Hypersensitivity to aspirin: common eicosanoid alterations in urticaria and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(4): p. 771-5.
322. Torres-Galvan, M. J., N. Ortega, et al., *LTC4-synthase A-444C polymorphism: lack of association with NSAID-induced isolated periorbital angioedema in a Spanish population*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **87**(6): p. 506-10.

323. Kim, S. H., J. H. Choi, et al., *Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with aspirin-intolerant urticaria and aspirin-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population*. J Korean Med Sci, 2005. **20**(6): p. 926-31.
324. Bae JS, Kim SH, et al., *Significant association of FcεR1α promoter polymorphism with aspirin-intolerant chronic urticaria*. J Asthma Allergy Immunol, 2005; **25**: s429.
325. Minshall, E. M., D. Y. Leung, et al., *Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997; **17**(3): p. 326-33.
326. Ohno, I., Y. Nitta, et al., *Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996; **15**(3): p. 404-9.
327. Redington, A. E., J. Madden, et al., *Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 642-7.
328. Ivanovic, V., A. Melman, et al., *Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer*. Nat Med, 1995. **1**(4): p. 282-4.
329. Grainger, D. J., P. R. Kemp, et al., *The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 74-9.
330. Park HJ, Ye YM, et al., *Association between a TGFbeta1 promoter polymorphism and the phenotype of aspirin-intolerant chronic urticaria in a Korean population*. J Clin Pharm Ther, 2008; **33**(6): p. 691-7.
331. Salhi, A., V. Rodrigues, Jr., et al., *Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6139-48.
332. Chatterjee, R., J. Batra, et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms and atopic asthma in North Indians*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(7): p. 914-9.
333. Palikhe NS, Kim SH, et al., *Association of interleukin 10 promoter polymorphism at -819 T>C with aspirin-induced urticaria in a Korean population*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011; **107**(6): p. 544-546.
334. Kim, S. H., J. K. Son, et al., *A functional promoter polymorphism of the human IL18 gene is associated with aspirin-induced urticaria*. Br J Dermatol, 2011. **165**(5): p. 976-84.
335. Dreborg S, Backman A, Basomba A, Bousquet J, Dieges P, Malling HJ. *Pruebas cutáneas utilizadas en el diagnóstico de la alergia tipo I*. Allergy, 1989; **44** (Suppl 10).

336. Lumry WR, Mathison DA, Stevenson DD. *Aspirin in chronic urticaria and/or angioedema: studies of sensitivity and desensitization*. J Allergy Clin Immunol, 1982; **69**: p. 135-43.
337. *Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. Allergy, 1989. **44 Suppl 10**: p. 1-59.
338. Newton, C.R., et al., *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucl. Acids. Res., 1989. **17**(7): p. 2503-2516.
339. *PCR application manual*. 2<sup>nd</sup> ed, ed. R.M. Diagnostics. 1999.
340. Patton S, S.S., *Draft Best Practice Guidelines for Laboratory Internal Quality Control*. European Molecular Genetics Quality Network, 2002.
341. Wacholder, S., et al., *Assessing the Probability That a Positive Report is False: An Approach for Molecular Epidemiology Studies*. J. Natl. Cancer Inst., 2004. **96**(6): p. 434-442.
342. Shi, Y. Y. and L. He, *SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci*. Cell Res, 2005. **15**(2): p. 97-8.
343. Khalilzadeh, O., et al., *Graves' ophthalmopathy and gene polymorphisms in interleukin-1alpha, interleukin-1beta, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist*. Clin Experiment Ophthalmol, 2009. **37**(6): p. 614-9.
344. Rezaei, N., et al., *Proinflammatory cytokine gene single nucleotide polymorphisms in common variable immunodeficiency*. Clin Exp Immunol, 2009. **155**(1): p. 21-7.
345. Alayli, G., et al., *T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(8): p. 1299-305.
346. Sarial, S., et al., *IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2008. **7**(1): p. 37-40.
347. Pociot, F., et al., *Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes-evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood*. Autoimmunity, 1994. **19**(3): p. 169-78.
348. Nakki, A., S. T. Kouhia, et al., *Allelic variants of IL1R1 gene associate with severe hand osteoarthritis*. BMC Med Genet, 2010. **11**: 50.
349. Adjers, K., T. Pessi, et al., *Epistatic effect of IL1A and IL4RA genes on the risk of atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 445-7.
350. Karjalainen J, Hulkkonen J, Pessi T, Huhtala H, Nieminen MM, Aroma A, Klaukka T, Hurme M. *The IL1A genotype associates with atopy in non asthmatic adults*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**: p. 429-34.

351. T Pessi, J Karjalainen, J Hulkkonen, M M Nieminen, M Hurme. *A common IL-1 complex haplotype is associated with an increased risk of atopy.* J Med Genet, 2003; **40**: e66.
352. Padron-Morales, J., C. Sanz, et al. *Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2013. **23**(7): 487-94.
353. Williams, T., et al., *Two regions within the human IL-2 gene promoter are important for inducible IL-2 expression.* J Immunol, 1988. **141**(2): p. 662-666.
354. Christensen, U., et al., *Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders.* Eur J Hum Genet, 2006. **14**(2): p. 227-35.
355. Hoffmann, S.C., et al., *Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes.* Transplantation, 2001. **72**(8): p. 1444-50.
356. Nieters A, Linseisen J, et al., *Association of polymorphisms in Th1, Th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg.* Clin Exp Allergy 2004; **34**: p. 346– 353.
357. Matesanz F, Fedetz M, et al., *Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression.* J Neuroimmunol, 2004; **148**: p. 212– 217.
358. Hadjur, S., et al., *IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: The role of Th2 cells, Gata3 and PU.1.* Immunology Letters, 2009. **122**(1): p. 37-43.
359. Yang, J., H. L. Qiao, et al., *Polymorphisms of IL-13 and IL-4-IL-13-SNPs in patients with penicillin allergies.* Eur J Clin Pharmacol, 2005. **61**(11): p. 803-9.
360. Qiao HL, Liu JH, et al., *Relationships between skin test, specific IgE and levels of cytokines in patients with penicillin allergy.* Int J Clin Pract, 2005; **59**(8): p. 895-9.
361. Isidoro-Garcia, M., et al., *[IL4RA gene polymorphism (Q576R) is associated with higher total IgE levels in Spanish patients with family history of atopy].* Med Clin (Barc), 2005. **124**(6): p. 211-2.
362. Liu X, Beaty TH, et al., *Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study.* J Allergy Clin Immunol. 2003; **112**(2): p. 382-8.
363. Teixeira, L. K., B. P. Fonseca, et al, *The role of interferon-gamma on immune and allergic responses.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 137-44.
364. Cookson W, *The alliance of genes and environment in asthma and allergy.* Nature, 1999. **402**: B5-B11.

365. Pravica V, et al., *In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphisms in the human IFN-gamma gene.* Eur J Immunogenet, 1999. **26**: p. 1-3.
366. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta.* Annual Review of Immunology, 1998. **16**: p. 137-161.
367. Mann, S.K. and J.A. Hadwiger, *Up the down staircase. Signal Transduction and Gene Activation in Development: a UCLA Symposium sponsored by Amgen, Steamboat Springs, CO, USA, March 31-April 7, 1990.* New Biol, 1990. **2**(7): p. 601-4.
368. Awad, M.R., et al., *genotypic variation in the transforming growth factor-[beta]1 gene: Association with Transforming Growth Factor-[beta]1 Production, Fibrotic Lung Disease, and Graft Fibrosis after Lung Transplantation.* Transplantation, 1998. **66**(8): p. 1014-1020.
369. Sharma, S., et al., *Variants in TGFB1, Dust Mite Exposure, and Disease Severity in Children with Asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2009. **179**(5): p. 356-362.
370. Judith, C.W.M., et al., *Analysis of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma.* The Journal of allergy and clinical immunology, 2006. **117**(1): p. 92-96.
371. Yang, X. X., F. X. Li, et al., *Association of TGF-beta1, IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma in a Chinese population.* Asian Pac J Allergy Immunol, 2011. **29**(3): p. 273-277.
372. Eskdale, J., et al., *Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence.* Immunogenetics, 1997; **46**(2): p. 120-128.
373. Kim, S. H., G. Y. Hur, et al., *Pharmacogenetics of aspirin-intolerant asthma.* Pharmacogenomics, 2008. **9**(1): p. 85-91.
374. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. *Cytokine gene polymorphism in human disease: on-linedatabases, supplement 2.* Genes Immun, 2002; **3**: p. 313-330.
375. Sekigawa, T., A. Tajima, et al., *Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin-intolerant asthma.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(7): p. 972-81.
376. Mahdavian, S., et al., *Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms among Iranian Patients with Asthma.* Journal of Clinical Immunology, 2009. **29**(1): p. 57-62.
377. Karjalainen, J., V-P. Joki-Erkkilä, J. Hulkkonen, T. Pessi, M. M. Nieminen, A. Aromaa, T. Klaukka, M. Hurme, *The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults.* Allergy, 2003. **58**(5): p. 393-396.
378. Mfuna Endam L, Cormier C, et al., *Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **136**(2): p. 187-92.

379. Erbek, S.S., et al., *Proinflammatory Cytokine Single Nucleotide Polymorphisms in Nasal Polyposis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **133**(7): p. 705-709.
380. Trajkov, D., J. Mirkovska-Stojkovikj, et al., *Association of cytokine gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in Macedonians*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2009. **8**(1): p. 31-42.
381. Movahedi, M., et al., *IL-10, TGF-B1, IL-2, IL-12, and IFN-G Cytokine Gene Polymorphisms in Asthma*. Journal of Asthma, 2008. **45**(9): p. 790 - 794.
382. Reichert, S., H. K. Machulla, et al., *Interleukin-2 -330 and 166 gene polymorphisms in relation to aggressive or chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria*. J Periodontal Res, 2009. **44**(5): p. 628-35.
383. Scarel-Caminaga, R. M., P. C. Trevilatto, et al., *Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(7): p. 587-91.
384. Pawlik, A., M. Kurzawski, et al., *IL1beta+3953 exon 5 and IL-2 -330 promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(2): p. 159-64.
385. Basehore, M.J., et al., *A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004; **114**(1): p. 80-87.
386. Michael, K., et al., *A complete screening of the IL4 gene: Novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2003. **112**(5): p. 893-898.
387. Isidoro-Garcia, M., et al., *Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study*. Clin Mol Allergy, 2005. **3**: p. 15.
388. Amirzargar, A.A., et al., *Polymorphisms in IL4 and iLARA confer susceptibility to asthma*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19**(6): p. 433-8.
389. Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. *Relationship between polymorphisms in IL4 and asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2013; **23**(4): p. 242-7.
390. Liu Y, Zhuo A, Liu W, Xu S, Li S. *The -33 C/T polymorphism in the interleukin 4 gene is associated with asthma risk: a meta-analysis*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2014; **24** (2): p. 114-121.
391. Ricciardolo, F. L., V. Sorbello, et al. *TNF-alpha, IL-4R-alpha and IL-4 polymorphisms in mild to severe asthma from Italian Caucasians*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013. **26**(1): p. 75-84.

392. Liang, W., Z. Zhou, et al. [Association study of bronchial asthma with polymorphisms of IL-4 and IL-4R receptor genes]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2014. **31**(1): p. 97-100.
393. Liu S, Li T, Liu J. Interleukin-4 rs2243250 polymorphism is associated with asthma among Caucasians and related to atopic asthma. Cytokine, 2012; 59(2): p. 364-369.
394. De Guia RM, Ramos JD. The -590C/TIL4 single-nucleotide polymorphism as a genetic factor of atopic allergy. Int J Mol Epidemiol Genet, 2010; **1**(1): p. 67-73.
395. Park, S. M., J. S. Park, et al., *Unraveling the genetic basis of aspirin hypersensitivity in asthma beyond arachidonate pathways*. Allergy Asthma Immunol, 2013. **5**(5): p. 258-76.
396. Zhang ML, Ni PH, et al., *Association of susceptibility to chronic rhinosinusitis with genetic polymorphisms of IL-4 and IL-10*. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2012; **47**(3): p. 212-7.
397. Yea SS, Yang YI, et al., *Interleukin-4 C-590T polymorphism is associated with protection against nasal polyps in a Korean population*. Am J Rhinol, 2006; **20**(5): p. 550-3.
398. Park SK, Heo KW, et al., *Expression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in nasal polyps associated with interleukin-4 promoter polymorphism -590*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006; **135**(6): p. 928-32.
399. Rezaei, N., A. Aghamohammadi, et al., *Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency*. Immunobiology, 2010. **215**(1): p. 81-7.
400. Hussein, Y. M., A. S. El-Shal, et al., *Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population*. Cytokine, 2013. **61**(3): p. 849-55.
401. Anovazzi, G., Y. J. Kim, et al., *Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population*. J Periodontol, 2010. **81**(3): p. 392-402.
402. Cui, T., J. Wu, et al. *Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [alpha] genes and allergic asthma*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(7): p. 888-92.
403. Taga, T., et al., *Interleukin-6 trigger the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-581.
404. Fishman, D., et al., *The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis*. The Journal of Clinical Investigation, 1998; **102**(7): p. 1369-1376.
405. Jeon, J. Y., H. A. Kim, et al., *Interleukin 6 gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in Koreans*. J Rheumato, 2010; **37**(11): p. 2251-8.

406. Kristiansen, O.P., et al., *Association of a functional 17 beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females.* Hum. Mol. Genet., 2003; **12**(10): p. 1101-1110.
407. Phillips, C.M., et al., *Additive effect of polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF-alpha genes and plasma fatty acid level modulate risk for the metabolic syndrome and its components.* J Clin Endocrinol Metab, 2010; **95**(3): p. 1386-94.
408. Rasmussen L, Delabio R, Horiguchi L, et al., *Association between interleukin 6 gene haplotype and Alzheimer's disease: a Brazilian case-control study.* J Alzheimers Dis, 2013; **36**(4): p. 733-8.
409. Arman A, Coker A, Sarioz O, Inanc N, Direskeneli H. *Lack of association between IL-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population.* Rheumatol Int, 2012; **32**(7): p. 2199-201.
410. Kosugi, E. M., C. M. de Camargo-Kosugi, et al., *Interleukin-6 -174 G/C promoter gene polymorphism in nasal polyposis and asthma.* Rhinology, 2013; **51**(1): p. 70-76.
411. Nasiri, R., M. Movahedi, et al., *Association of interleukin 6 single nucleotide polymorphisms with allergic rhinitis.* Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2014 May.
412. Kosugi EM, de Camargo-Kosugi CM, Weckx LL, Guerreiro-da-Silva ID, Gregorio LC. *Interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism and nasal polyposis.* Rhinology, 2009; **47**(4):p. 400-404.
413. M Gharagozlou, E Farhadi, et al., *Association Between the Interleukin 6 Genotype at Position -174 and Atopic Dermatitis.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2013; **23**(2): p. 89-93.
414. Papassotiropoulos, A., et al., *A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease.* Ann Neurol, 1999; **45**(5): p. 666-668.
415. Taga K., Tosato G. *IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production.* J Immunol, 1992; **148**: p. 1143-1148.
416. Hussein, Y. M., S. S. Alzahrani, et al., *Association of serum cytokines levels, interleukin 10 -1082G/A and interferon-gamma +874T/A polymorphisms with atopic asthma children from Saudi Arabia.* Cell Immunol, 2014; **289**(1-2): p. 21-6.
417. Zheng, X. Y., W. J. Guan, et al., *Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis.* Lung, 2014; **192**(1): p. 65-73.
418. Hakimizadeh, E., M. K. Arababadi, et al., *Association of -592 region of IL-10 polymorphisms with asthma in south-eastern Iranian patients.* Clin Lab, 2012; **58**(3-4): p. 267-71.
419. Zedan M., Settin A., et al., *Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha-308 and interleukin-10-1082 among asthmatic Egyptian children.* Allergy Asthma Proc, 2008; **29**(3): p. 268-273.

420. Hunninghake GM, Soto-Quiro's ME, Lasky-Su J, Avila L, Ly NP, Liang C, et al., *Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations*. J Allergy Clin Immunol, 2008; **122**: p. 93–98.
421. Seifart C, Dempfle A, Plagens A, Seifart U, Clostermann U, Müller B et al., *TNF-alpha-, TNF-beta-, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Tissue Antigens, 2005; **65**: p. 93–100.
422. Demeo DL, Campbell EJ, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG et al., *IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008; **38**: p. 114–120.
423. H. Lyon, C. Lange, et al., *IL10 Gene Polymorphisms Are Associated With Asthma Phenotypes in Children*. Genet Epidemiol, 2004; **26**(2): p. 155–165.
424. Hirota, T., Y. Suzuki, et al., *Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2005; **116**(4): p. 789-95.
425. Randolph, A.G., et al., *The IL12B gene is associated with asthma*. Am J Hum Genet, 2004; **75**(4): p. 709-15.
426. Muller-Berghaus, J., et al., *Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype*. Genes Immun, 2004; **5**(5): p. 431-434.
427. Morahan, G., D. Huang, et al., *Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children*. Lancet, 2002; **360**(9331): p. 455-9.
428. Khoo SK, Hayden CM, et al., *Associations of the IL12B promoter polymorphism in longitudinal data from asthmatic patients 7 to 42 years of age*. J Allergy Clin Immunol, 2004; **113**(3): p. 475-481.
429. E Tug, U Ozbey, T Tug, H Yuce. *Relationship Between the IL-12B Promoter Polymorphism and Allergic Rhinitis, Familial Asthma, Serum Total IgE, and Eosinophil Level in Asthma Patients*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009; **19**(1): p. 21-26.
430. Noguchi E, Yokouchi Y, et al., *Identification of missense mutation in the IL12B gene: lack of association between IL12B polymorphisms and asthma and allergic rhinitis in the Japanese population*. Genes Immun, 2001; **2**(7): p. 401-3.
431. Hall MA, McGlinn E, et al., *Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease*. Genes Immun, 2000; **1**: p. 219-24.
432. Li, Y., B. Wu, et al., *Polymorphisms of STAT-6, STAT-4 and IFN-gamma genes and the risk of asthma in Chinese population*. Respir Med, 2007; **101**(9): p. 1977-81.
433. Pravica, V., et al., *A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-[gamma] gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-[gamma] production*. Human Immunology, 2000; **61**(9): p. 863-866.

434. Hussein, Y.M., et al., *Interferon gamma gene polymorphism as a biochemical marker in Egyptian atopic patients.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2009; **19**(4): p. 292-8.
435. Hussein, Y. M., S. S. Alzahrani, et al. *Association of serum cytokines levels, interleukin 10 -1082G/A and interferon-gamma +874T/A polymorphisms with atopic asthma children from Saudi Arabia.* Cell Immunol, 2014; **289**(1-2): p. 21-6.
436. Huang HR, Zhong YQ, Wu JF. *The association between IFN- $\gamma$  and IL-4 genetic polymorphisms and childhood susceptibility to bronchial asthma.* Gene, 2012; **494**(1): p. 96-101.
437. Kumar A, Ghosh B. *A single nucleotide polymorphism (A  $\rightarrow$  G) in intron 3 of IFN $\gamma$  gene is associated with asthma.* Genes Immun, 2008; **9**(4):p. 294-301.
438. Sumiyoshi, K., A. Nakao, et al., *Transforming growth factor-beta1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.* Clin Exp Allergy, 2002; **32**(2): p. 309-14.
439. Matsui, K. and A. Nishikawa. *Percutaneous application of peptidoglycan from Staphylococcus aureus induces an increase in mast cell numbers in the dermis of mice.* Clin Exp Allergy, 2005; **35**(3): p. 382-7.
440. Chakir, J., J. Shannon, et al., *Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression.* J Allergy Clin Immunol, 2003; **111**(6): p. 1293-8.
441. Sagara H, Okada T, et al., *Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2002; **110**: p. 249–54.
442. Aubert JD, Dalal BI, et al., *Transforming growth factor b1 gene expression in human airways.* Thorax, 1994; **49**: p. 225–32.
443. Che Z, Zhu X, et al., *The association between the C-509T and T869C polymorphisms of TGF- $\beta$ 1 gene and the risk of asthma: a meta-analysis.* Hum Immunol, 2014 Feb; **75**(2): p. 141-50.
444. Zhang, Y., J. Zhang, et al., *Polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of asthma: A meta-analysis.* Respirology, 2010. **15**(4): p. 643-650.
445. Liebhart J, Polak M, et al., *The G/G genotype of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) single nucleotide (+915G/C) polymorphism coincident with other host and environmental factors is associated with irreversible bronchoconstriction in asthmatics.* Int J Immunogenet, 2008; **35**(6): p. 417-22.
446. Chiang CH, Chuang CH, et al., *Genetic polymorphism of polymorphism of transforming growth factor  $\beta$ 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  is associated with asthma and modulates the severity of asthma.* Respir Care, 2013; **58**(8): p. 1343-1350.

447. Awad MR, El-Gamel A, et al., *Genotypic variation in the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene: association with transforming growth factor- $\beta$ 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation.* Transplantation, 1998; **66**: p. 1014–20.
448. Watanabe Y, Kinoshita A, et al., *A catalog of 106 singlenucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- $\beta$ 1 and its signaling pathway.* J Hum Genet, 2002; **47**: p. 478–83.
449. Okayama, Y. and T. Kawakami. *Development, migration, and survival of mast cells.* Immunol Res, 2006; **34**(2): p. 97-115.
450. Grainger DJ, Heathcote K, et al., *Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type  $\beta$ 1.* Hum Mol Genet, 1999; **8**: p. 93–7.
451. Ryan, J. J., M. Kashyap, et al., *Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease.* Crit Rev Immunol, 2007; **27**(1): p. 15-32.
452. Movahedi, M., et al., *IL-10, TGF- $\beta$ 1, IL-2, IL-12, and IFN- $\gamma$  Cytokine Gene Polymorphisms in Asthma.* Journal of Asthma, 2008; **45**(9): p. 790 - 794.
453. Halasz, A., E. Cserhati, et al., *Role of TNF- $\alpha$  and its 55 and 75 kDa receptors in bronchial hyperreactivity.* Respir Med, 2002; **96**(4): p. 262-7.
454. Thomas P.S., *Tumour necrosis factor- $\alpha$ : the role of this multifunctional cytokine in asthma.* Immunol Cell Biol, 2001; **79**(2): p. 132-40.
455. Bradding P, Roberts JA, et al., *Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1994; **10**(5):p. 471-80.
456. Jones, B. L., B. K. Graham, et al., *Genetic variation in the TNFA promoter region and TNFA gene expression in subjects with asthma.* J Asthma, 2013; **50**(6): p. 541-7.
457. Zhang Y, Zhang J, et al., *The -308 G/A polymorphism in TNF- $\alpha$  gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis.* J Clin Immunol, 2011; **31**(2): p. 174-85.
458. Jiffri, E. H. and N. A. Elhawary, *The impact of common tumor necrosis factor haplotypes on the development of asthma in children: an Egyptian model.* Genet Test Mol Biomarkers, 2011; **15**(5): p. 293-9.
459. Batikhan, H., M. K. Gokcan, et al. *Association of the tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A polymorphism with nasal polyposis.* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2010; **267**(6): p. 903-8.
460. Erbek, S. S., E. Yurtcu, et al., *Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007; **133**(7): p. 705-9.

461. Castro-Giner, F., M. Kogevinas, et al., *TNFA -308G>A in two international population-based cohorts and risk of asthma*. Eur Respir J, 2008; **32**(2): p. 350-61.
462. Wilson, A. G., F. S. di Giovine, et al., *Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product*. Hum Mol Genet, 1992; **1**(5): p. 353.
463. Hajeer, A. H. and I. V. Hutchinson, *Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease*. Hum Immunol, 2001; **62**(11): p. 1191-1199.
464. Wilson, A. G., J. A. Symons, et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997; **94**(7): p. 3195-9.
465. Shiau, M.Y., et al., *TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients*. Tissue Antigens, 2003; **61**(5): p. 393-7.
466. Choi, J. H., S. H. Kim, et al., *Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with aspirin-induced urticaria*. J Clin Pharm Ther, 2009; **34**(2): p. 231-8.
467. Wu H, Romieu I, et al., *Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma*. Environ Health Perspect, 2007; **115**(4): p. 616-22.
468. Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population*. Hum Immunol, 2009; **70**(4): p. 251-6.
469. Romano A, Guéant-Rodriguez RM, et al., *Cross reactivity among drugs: clinical problems*. Toxicology, 2005; **209**(2): p. 169-79.
470. Blanca, M., E. Perez, et al., *Angioedema and IgE antibodies to aspirin: a case report*. Ann Allergy, 1989; **62**(4): p. 295-298.
471. Bousquet PJ, Demoly P, Romano A et al., *Pharmacovigilance of drug allergy and hypersensitivity using the ENDA-DAHD database and the GALEN platform. The Galenda project*. Allergy, 2009; **64**(2): p. 194–203.

