



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE LAS CIENCIAS MÉDICAS

TÍTULO:

ASOCIACIÓN DE LA FRECUENCIA E INTENSIDAD DE LOS SÍNTOMAS  
NASALES Y LA OBSTRUCCIÓN NASAL CON LA CANTIDAD DE EOSINÓFILOS  
Y LA FRECUENCIA DE APOPTOSIS DE EOSINÓFILOS EN MUCOSA NASAL  
EN PACIENTES CON RINITIS ALÉRGICA PERSISTENTE EXPUESTOS Y NO  
EXPUESTOS A TABAQUISMO

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BERTHA BEATRIZ MONTAÑO VELAZQUEZ

TUTOR : DRA. KATHRINE JUAREGUI RENAUD  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN OTONEUROLOGIA,  
CMN SIGLO XXI, IMSS

MEXICO, D. F.

ENERO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL**

Dr. Mario Humberto Vargas Becerra  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Respiratorias, Hospital de  
Pediatria, CMN SXXI, IMSS.

Dr. Armando Pérez Torres  
Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

## **COLABORADORES**

Dr. Francisco Javier García Vázquez  
Laboratorio de Patología Molecular, Departamento de Anatomía Patológica,  
Instituto Nacional de Pediatría, S.S.

Dra. María Dolores Mogica Martínez  
Dr. Ramón Campillo Navarrete  
Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, UMAE Antonio Fraga Mouret, CMN La  
Raza, IMSS.

Química Lilia Flores González  
Laboratorio Clínico, Hospital General Regional con UMAA No. 2 Villa Coapa,  
IMSS.

## INDICE

	Página
RESUMEN	4
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	9
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	10
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	37

## RESUMEN

**Contexto.** En México se estima que la rinitis alérgica afecta aproximadamente al 5% de los niños, la mitad con exposición a humo de tabaco. Estudios en adultos muestran que el humo de tabaco puede exacerbar la respuesta alérgica nasal y causar cambios en la resistencia nasal. Sin embargo, son escasos los estudios que documentan la interacción del humo de tabaco con los síntomas nasales, la resistencia nasal y el número de eosinófilos y apoptosis de eosinófilos en la mucosa nasal de niños con rinitis alérgica persistente.

**Objetivos.**

1. Identificar y comparar la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) y de la resistencia nasal por rinomanometría;
2. Identificar y comparar el número de eosinófilos (inmunohistoquímica) y de apoptosis de eosinófilos (inmunohistoquímica Fas, caspasa-3, Bcl-2 y TUNEL) en la mucosa nasal;
3. Medir la asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la obstrucción nasal con el número de eosinófilos y la frecuencia de su apoptosis en la mucosa nasal.

**Material y Métodos.** Diseño transversal comparativo. Aceptaron participar con consentimiento informado, 50 pacientes con diagnóstico de primera vez de rinitis alérgica persistente: 25 con exposición reciente a humo de tabaco y 25 sin exposición. A todos: se les obtuvieron muestras de orina en dos días consecutivos para determinación de cotinina ajustada a la concentración de creatinina; se les administraron los cuestionarios: 1. Encuesta tabaquismo en jóvenes (versión corta validada en español); 2. Cuestionario *Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood* (versión corta) y 3. Cuestionario de severidad de síntomas nasales (validado en español); se les realizó rinomanometría anterior (Rhinospir Pro, Sibelmed, Barcelona) y se les obtuvo muestra de la mucosa nasal mediante raspado (Rhinoprobe Arlington Scientific Inc, Arlinton, Tx). La cuenta de eosinófilos en mucosa nasal se evaluó por morfología e inmunohistoquímica (IHQ) con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína básica mayor de eosinófilos (MBP), clona BMK13, diluido 1:25 (Chemicon International), y se determinó la presencia de apoptosis de eosinófilos con IHQ para caspasa 3, Fas, Bcl-2 y por TUNEL. El análisis estadístico se realizó de acuerdo con la distribución de datos, con un nivel de significancia de 0.05, se utilizaron las siguientes pruebas: “t” de Student para muestras independientes, “U” Mann-Whitney, “t” para proporciones, r de Pearson, ANOVA y ANCoVA.

**Resultados.** Los grupos fueron similares en la edad, el peso, el índice de masa corporal, la relación hombre/mujer, el tiempo de evolución, el número de alérgenos positivos en la prueba de prick cutánea, la frecuencia de los síntomas nasales y el total de síntomas, que fue de 1 a 10 (mediana de 5) en los expuestos y de 1 a 8 (mediana de 5) en los no expuestos ( $p > 0.05$ ). La rinomanometría mostró mayor resistencia nasal en los expuestos que en los no expuestos ( $p \leq 0.01$ ). Se observó tendencia al incremento de eosinófilos en los expuestos comparados con los no expuestos ( $p > 0.05$ ), pero al comparar a los fumadores activos se observó diferencia entre los pacientes fumadores activos comparados con los no expuestos ( $p < 0.05$ ). Esta diferencia tuvo influencia del índice de masa corporal ( $p < 0.05$ ), y con diferencia de la edad entre los subgrupos ( $16.4 \pm 2.5$  versus  $13.5 \pm 2.6$ ) ( $p < 0.05$ ). La frecuencia de apoptosis de eosinófilos en la mucosa nasal de los pacientes expuestos y de los no expuestos fue similar (8% versus 4%;  $p > 0.05$ ).

**Conclusión.** En niños y adolescentes con rinitis alérgica persistente, la exposición a humo de tabaco puede asociarse a incremento de la resistencia nasal, independientemente de los síntomas nasales. Aquellos con exposición activa, pueden tener aumento del número de eosinófilos en la mucosa nasal, sin disminución de la frecuencia de apoptosis.

## ANTECEDENTES

### Rinitis Alérgica

La rinitis alérgica es un proceso inflamatorio de la mucosa nasal mediado por la inmunoglobulina IgE en respuesta a uno o más alérgenos, que se caracteriza por la presencia de estornudos, prurito nasal, obstrucción nasal y rinorrea (1,2). Se clasifica en intermitente o persistente, de acuerdo a la temporalidad de las manifestaciones clínicas (3): es intermitente cuando se manifiesta en menos de 4 días a la semana y menos de 4 semanas, en tanto que es persistente si se manifiesta por más de 4 días a la semana durante todo el mes, con persistencia de las manifestaciones más de 9 meses al año. A su vez se clasifica en leve y moderada-severa. Afecta aproximadamente al 10 a 20% de la población (3-5) y en cerca del 80% de los casos se manifiesta antes de los 20 años de edad (6).

En la fisiopatogenia de la rinitis alérgica participa un componente genético de manera importante, el cual consiste en la tendencia a desarrollar una respuesta inmune en la que participan la IgE, los mastocitos y linfocitos Th2. En sujetos susceptibles la exposición a proteínas fecales de ácaros, cucarachas, pelo de gato, perro, pólenes y otros lleva a la presentación del alérgeno por células presentadoras de antígeno a los linfocitos T CD4+, los cuales liberan interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 entre otras citocinas TH2. Estas citocinas promueven la producción de IgE específicas para estos alérgenos. Las células plasmáticas producen IgE, mientras que las células cebadas y eosinófilos (y otras células) captan IgE. Una vez que el paciente se ha sensibilizado a los alérgenos, la subsecuente exposición, activa una cascada de eventos que dan como resultado a los síntomas de la rinitis alérgica. La respuesta alérgica en la rinitis alérgica puede ser dividida en dos fases: una fase inmediata o temprana que se desarrolla en minutos luego de la exposición al alérgeno y los estornudos, el prurito y la rinorrea son los síntomas característicos y puede ocurrir algún grado de congestión nasal, y una fase tardía en la que la congestión nasal tiende a predominar y los mediadores liberados por los eosinófilos tales como la proteína básica mayor, proteína catiónica de los eosinófilos y leucotrienos provocan daño al epitelio, llevando a la enfermedad alérgica crónica (7-13) (Figura 1).

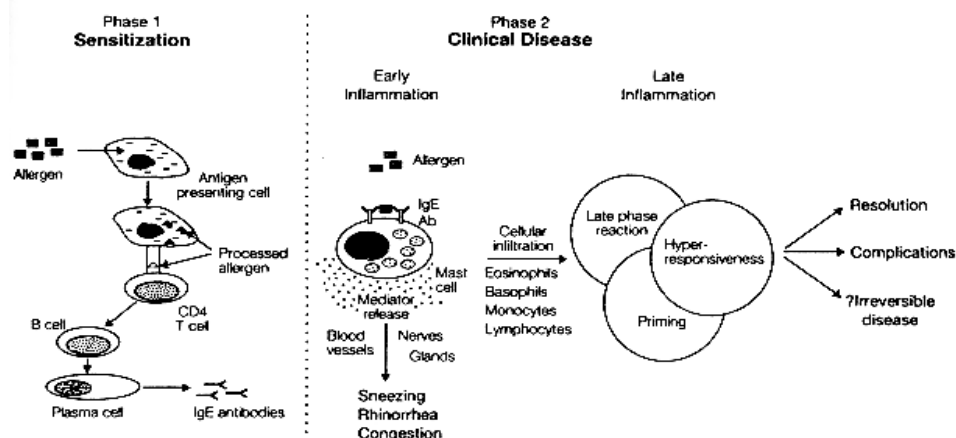


Figura 1. Fisiopatología de la rinitis alérgica (13).

Para efectuar el diagnóstico de la rinitis alérgica se consideran la historia clínica, las pruebas cutáneas, IgE específica en suero que permite identificar alérgenos específicos, la eosinofilia y la presencia de eosinófilos en moco nasal con métodos de obtención como el raspado con cureta ya validado en niños con rinitis alérgica (14-17). En los pacientes con rinitis alérgica intermitente los alérgenos principales suelen ser pólenes, mientras que en los pacientes con rinitis alérgica persistente suelen ser polvos y ácaros (17-19) y de éstos los alérgenos más frecuentes identificados en pacientes que habitan en la región norte de la zona metropolitana de la ciudad de México son *Dermatophagoides sp*, polvo casero, gato, perro y otros (19,20). Otra prueba complementaria para evaluar la obstrucción nasal es la rinomanometría anterior activa, considerada la más adecuada para este grupo de pacientes (21). Para evaluar la frecuencia y la intensidad de los síntomas nasales se han diseñado diferentes instrumentos (22-24), entre los cuales se encuentra un cuestionario validado en niños mexicanos (22), y el cuestionario del *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) para evaluar la prevalencia, severidad y calidad de vida y otras características clínicas de los pacientes con rinitis alérgica u otras enfermedades alérgicas validado en México (23, 24).

La rinitis alérgica es una condición común que afecta a todas las edades, con un pico en la adolescencia (6). Los síntomas clásicos son congestión nasal, prurito, estornudos y rinorrea y que puede condicionarles alteraciones del sueño y fatiga (2).

### **Exposición a humo de tabaco**

El humo de tabaco puede incrementar los síntomas nasales como son la obstrucción nasal y la resistencia nasal en adultos sin rinitis alérgica y la exposición pasiva puede incrementar los síntomas de obstrucción nasal en niños con rinitis alérgica (25). En la respuesta alérgica se ha identificado que se prolonga la vida media de los eosinófilos además de una mayor producción de éstos (26), en los que se ha sugerido que se debe a factores como la producción de factores de supervivencia como la IL-5 (27), factores de crecimiento como IL-4 (28), mediadores inflamatorios como los cisteinil-leucotrienos (29), y el humo de tabaco entre otros (30-35).

La exposición a humo de tabaco puede ser activa o pasiva y se estima que el 40% de los niños en el mundo están expuestos a humo de tabaco en sus casas y una cuarta parte de los fumadores han consumido su primer cigarro antes de los 10 años de edad (36) que coincide con los resultados de encuestas realizadas en México (37, 38). En la identificación de la exposición a humo de tabaco puede utilizarse la medición de sus metabolitos y cuestionarios. De los más de 4,700 compuestos identificados en el humo de tabaco, la nicotina es uno de los principales productos, se absorbe por el tracto respiratorio, la mucosa oral y la piel, se metaboliza en su mayor parte en el hígado y el resto en pulmón y riñones (39, 40). La medición de la cotinina en orina permite evaluar de manera confiable la exposición a humo de tabaco; una concentración  $\geq 21.8$  ng de cotinina por

miligramo de creatinina permite identificar que los sujetos están expuestos al humo del tabaco (41).

### **Tabaco y alergia**

En niños sin enfermedad aparente que se exponen a humo de tabaco se han observado síntomas nasales e infecciones de vías aéreas de repetición, con la consecuencia de ausentismo escolar y deterioro de la calidad de vida (42-44). En niños con rinitis alérgica y asma, la exposición pasiva a humo de tabaco disminuye la respuesta al tratamiento médico y a la inmunoterapia sublingual (45). Se ha documentado en sujetos sanos que la exposición a humo de tabaco produce aumento en la frecuencia de síntomas nasales (*circa* 30%) y la resistencia nasal (*circa* 25%)(46), mientras que en pacientes con enfermedad alérgica nasal produce aumento en la severidad de los síntomas (47-50). El humo de tabaco afecta la fisiología nasal e influye en los problemas respiratorios en niños. Evidencia de la literatura apoya que el humo de tabaco afecta la vía respiratoria con el reclutamiento y la activación de células inflamatorias, las cuales pueden exacerbar la respuesta nasal alérgica (47) y causar cambios en la resistencia nasal (50-55). Los niños sin enfermedad aparente que son expuestos al humo de tabaco tienen aumento en el número de eosinófilos tanto en la mucosa nasal como en sangre, a diferencia de los no expuestos (35). También se ha sugerido que este aumento en la cantidad de eosinófilos puede asociarse a una mayor severidad de los síntomas nasales en pacientes con rinitis alérgica. Congruente con el hallazgo experimental en expuestos a humo de cigarro diluido (6 cigarrillos durante una hora/día por 14 días), en los que se produjo reactividad de la vía aérea, asociada a un aumento de eosinófilos en la mucosa (26).

### **Apoptosis**

Se ha propuesto que en los pacientes con enfermedad alérgica como el asma, existe inhibición o disminución de la apoptosis de los eosinófilos, y que esto puede explicar, entre otros factores, el aumento en el número de eosinófilos con el subsecuente incremento de la respuesta alérgica. La apoptosis es un mecanismo para mantener la homeostasis de las células y tejidos, que puede ocurrir o no, dependiendo del momento ontogénico tisular y también tiene su participación en varias enfermedades debido a un incremento o disminución del número de células en apoptosis. Se identifican dos vías por las cuales se activa este proceso, la vía extrínseca y la vía intrínseca. En la vía extrínseca, tipo I o ligando de muerte, intervienen receptores celulares de la familia de TNFR (TNFR1, DR5/DR4 y Fas CD95/APO-1) que desencadenan la activación de caspasas. Estas últimas actúan a nivel del citoesqueleto y las proteínas nucleares para inducir apoptosis. La vía intrínseca, tipo II o mitocondrial, comienza por la permeabilización de la membrana mitocondrial, y está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. Ésta se divide en dos tipos: antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-2) y proapoptóticas (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, Bik) (56-58) (Figura 2). Se ha identificado que la apoptosis en los eosinófilos humanos está mediada por la activación tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca, a través de las caspasas 3, 8 y 9 (59). Morfológicamente se observa condensación del núcleo y fragmentación, formación



de cuerpos apoptóticos que luego son digeridos por macrófagos y previenen la liberación del contenido intracelular a los tejidos adyacentes.

Existen diversas técnicas para identificar la presencia de apoptosis como TUNEL (terminal-deoxinucleotidyl-transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling), la determinación de anexina V, y de proteínas de superficie como receptor Fas (CD95/APO-1) y la unión de su ligando (FasL) representan la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Las caspasas como la caspasa 3 representan la confluencia de la activación de las dos vías de la apoptosis y Bcl-2 (antiapoptótica) que representa a la vía intrínseca que impide la liberación del citocromo c y a su vez inhibe la apoptosis (60, 61). Algunas variables participan en la frecuencia de apoptosis de los eosinófilos, incluyendo reguladores internos como la expresión de genes como Bcl-2 (antiapoptótico) (62) y CD95 (Fas/APO-1) (proapoptótico) (63), producción de factores de sobrevivencia como la IL-5 (antiapoptótico) (27), factores de crecimiento como IL-4 (antiapoptótico) (28), mediadores inflamatorios como los cistenoil leucotrienos (proapoptóticos)(29) y factores externos como la nicotina y cotinina (antiapoptóticos) (64).

En la mucosa bronquial de pacientes con asma se ha identificado aumento de la vida media de diferentes tipos de células inflamatorias (eosinófilos, linfocitos y macrófagos), con disminución de la apoptosis y aumento en la severidad de los síntomas (65-68). En pacientes con poliposis nasal con hipersensibilidad a la aspirina (69) o con dermatitis de origen alérgico (70) también se ha observado aumento del número de eosinófilos relacionado a disminución de la apoptosis (71). En pacientes con rinitis alérgica estacional, la exposición aguda al alérgeno se ha asociado a un aumento en el número de eosinófilos apoptóticos (72). En habitantes de la ciudad de México se ha observado que los pacientes con rinitis alérgica persistente, comparados con sujetos sin enfermedad, tienen aumento del número de eosinófilos en la mucosa nasal y disminución de la apoptosis (73). Por lo tanto, en pacientes con enfermedades alérgicas la disminución de la apoptosis de células inflamatorias se ha relacionado con aumento de las mismas y mayor severidad de los síntomas.

Aunque todavía no se conoce adecuadamente como es que disminuye la apoptosis de los eosinófilos en enfermedades alérgicas crónicas, se han propuesto varios mecanismos. Estudios *in vitro* han mostrado que los eosinófilos pueden tener "resistencia a CD95" o alteración en la unión con su ligando. Esta molécula es un receptor apoptótico (Fas CD95/APO-1) y su alteración se asocia a expansión celular no deseada (64, 74). En tejidos de pólipo nasal se ha observado que la infiltración con eosinófilos se asocia a resistencia a Fas (CD95/APO-1)(69). Se ha sugerido que esta resistencia podría estar favorecida por la mayor concentración de óxido nítrico en los tejidos con inflamación alérgica (75). Por otra parte, en eosinófilos sanguíneos de pacientes con asma severa se ha observado aumento en la expresión de Bcl-2 asociada a disminución de la apoptosis de los mismos (76,77).

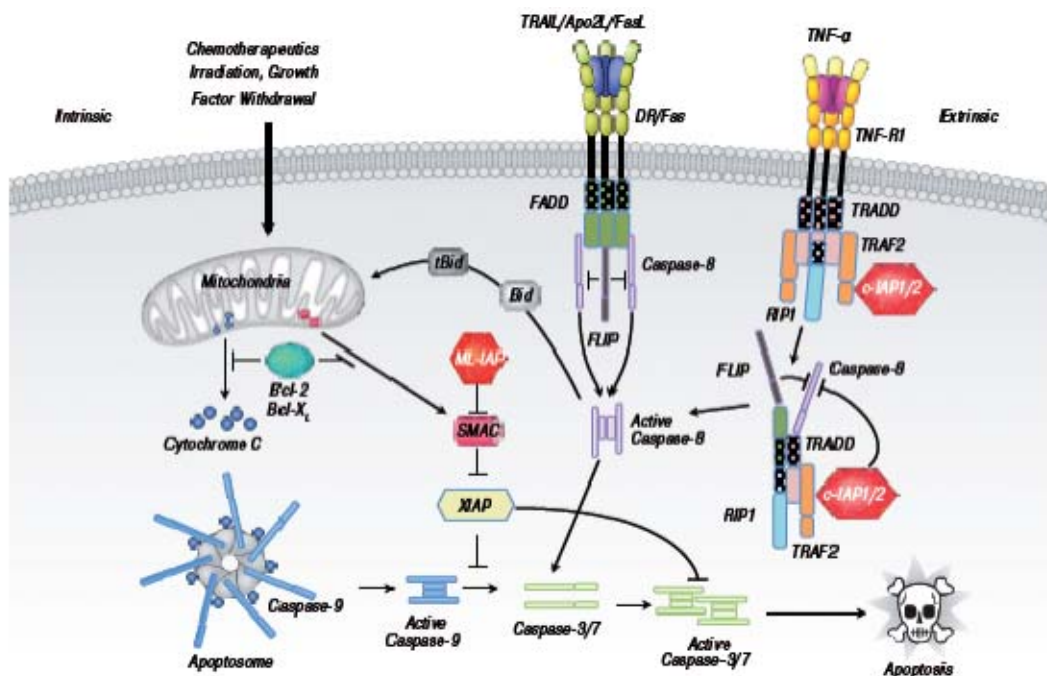


Figura 2. Vías de la apoptosis (58).

### Apoptosis y tabaquismo

En cultivo de células humanas de diversos tejidos se ha documentado que la nicotina y la cotinina inhiben la apoptosis (77). El efecto de la nicotina puede estar mediado por receptores colinérgicos nicotínicos convencionales y no convencionales. La nicotina estimula la expresión de Bcl-2 a través de la fosforilación de residuos de serina, por activación de factores de crecimiento que inhiben la apoptosis (77). También se ha identificado que la exposición crónica a humo de tabaco se asocia a una expresión aberrante de Fas (CD95/APO-1) en linfocitos de seres humanos, lo que impide la inducción de la apoptosis (64,74).

### JUSTIFICACION

El humo de tabaco exacerba la respuesta alérgica (50) e incrementa las manifestaciones clínicas de los síntomas nasales, como la obstrucción nasal (25). La resistencia nasal es la medición objetiva de la obstrucción nasal, la cual puede cambiar por la presencia del humo de tabaco (46-49). Los mecanismos por los que se produce la obstrucción nasal ante el humo de tabaco aún no son bien conocidos.

Las enfermedades alérgicas, como el asma, se caracterizan por aumento del número de eosinófilos (60). Se ha propuesto que el incremento de eosinófilos se podría deber a un aumento en la supervivencia o una disminución en la frecuencia de muerte por apoptosis (59). Esta última propuesta podría explicarse por disrupción de la apoptosis, tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca (59-64). La

exposición a productos del humo del tabaco como la cotinina y nicotina en cultivos celulares se ha relacionado con inhibición de la apoptosis (77, 122). Sin embargo, aún se desconoce la interacción de estos factores en pacientes con rinitis alérgica.

En este estudio se propuso identificar la posible relación de la exposición del humo de tabaco con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, con el número de eosinófilos y con la frecuencia de su apoptosis.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACION**

En pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica persistente habitantes del Noreste de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, de 10 a 19 años de edad, expuestos (activo o pasivo) y no expuestos de manera habitual a humo de tabaco:

1. ¿Cuál es la diferencia en la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) y la resistencia nasal por rinomanometría entre los expuestos (pasivo o activo) y los no expuestos?
2. ¿Cuál es la diferencia en la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en la mucosa nasal entre los expuestos (pasivo o activo) y los no expuestos?
3. ¿Cuál es la asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal, en los expuestos (pasivo o activo) y los no expuestos?

## **HIPOTESIS**

En pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica persistente, de 10 a 19 años de edad, expuestos y no expuestos a humo de tabaco:

1. La frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) es 30% mayor y de resistencia nasal 25% mayor en los expuestos que en los no expuestos.
2. La cantidad de eosinófilos es mayor y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal es diferente en los expuestos que en los no expuestos.
3. La frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la resistencia nasal se asocian a la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en la mucosa nasal.

## **OBJETIVOS**

En pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica persistente habitantes del Noreste de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, de 10 a 19 años de edad, expuestos (activo o pasivo) y no expuestos de manera habitual a humo de tabaco:

1. Identificar y comparar la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) y la resistencia nasal por rinomanometría.
2. Identificar y comparar la cantidad de eosinófilos (inmunohistoquímica) y de apoptosis de eosinófilos (inmunohistoquímica Fas, caspasa-3, Bcl-2 y TUNEL) en la mucosa nasal.
3. Medir la asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en la mucosa nasal.

## **TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio clínico.

Diseño transversal y comparativo.

## **MATERIAL Y METODOS**

I. Sujetos participantes.

Después de la autorización del protocolo de estudio por las Comisiones Institucionales de Investigación Científica y de Ética en Investigación, con el consentimiento informado de los padres y el asentimiento de los pacientes (Anexos 1a y 1b), aceptaron participar en el estudio 60 niños y adolescentes con diagnóstico por primera vez de rinitis alérgica persistente. Todos acudieron para su atención por primera vez, al Servicio de Alergia e Inmunología Clínica de la Unidad Médica de Alta Especialidad “Antonio Fraga Mouret” en el Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. El cálculo del tamaño de muestra se efectuó para estimar la diferencia entre dos medias, con alfa de 0.05, potencia del 80% y diferencia del 25% para la resistencia y 30% para los síntomas (52).

El muestreo de pacientes se efectuó de forma consecutiva, para todos los pacientes que reunieron los criterios de selección. Ninguno mostró evidencia de infección, sinusitis, otitis media, pólipos nasales, anormalidades anatómicas, enfermedades sistémicas, enfermedad pulmonar incluyendo asma, rinitis alérgica estacional, rinitis vasomotora; en el caso de las mujeres en ningún caso hubo

embarazo y, en su caso, la participación no fue durante la menstruación. En la historia clínica y por interrogatorio se verificó que durante los 3 meses previos a la participación en el estudio, ningún paciente hubiera recibido inmunoterapia o tratamiento con corticosteroides (nasales o sistémicos), cromolín, anti-inflamatorios ni antileucotrienos.

No se incluyeron en el estudio a 10 pacientes que mostraron incongruencia entre la información sobre exposición a humo de tabaco que proporcionaron mediante cuestionario y la concentración urinaria de cotinina/ creatinina.

Las características generales de los 50 participantes se describen a continuación:

- 25 pacientes con exposición reciente a tabaco, confirmada por la concentración urinaria de cotinina/creatinina, con edad de 10 a 19 años, 14 hombres y 11 mujeres; con respuesta positiva en pruebas cutáneas a 1 a 8 alérgenos (mediana de 3) (Tabla 1). En 17 de estos pacientes se identificaron los diagnósticos concomitantes de rinitis alérgica persistente, conjuntivitis y dermatitis, en 6 de ellos se identificaron rinitis alérgica persistente y conjuntivitis y en 2 se identificó sólo rinitis alérgica persistente,

- 25 pacientes sin exposición reciente a humo de tabaco, confirmada por la concentración de cotinina/ creatinina en orina, con edad de 10 a 18 años, 16 hombres y 9 mujeres; con respuesta positiva en pruebas cutáneas a 1 a 8 alérgenos (mediana de 2) (Tabla 1). En 3 pacientes se identificaron los diagnósticos concomitantes de rinitis alérgica persistente, conjuntivitis y dermatitis, en 13 se identificaron rinitis alérgica persistente y conjuntivitis, y en 9 se identificó sólo rinitis alérgica persistente.

Tabla 1. Características de los 50 pacientes y de las pruebas cutáneas para un panel de 36 alérgenos inhalables en pacientes con rinitis alérgica persistente.

	Exposición a humo de tabaco (n =25)	No exposición a humo de tabaco (n = 25)
Características de los pacientes	n (D.E.)	n (D.E.)
Edad (años)	14(3)	13 (2.6)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 (4.4)	20.6 (3.2)
Masculino/ femenino razón	1.2/1	1.7/1
Duración de la rinitis (años)	5.6 (4)	3.52 (2)
Alergenos	n (%)	n (%)
<i>Dermatophagoides sp</i>	21 (84%)	23 (87%)
Polvo casero	4 (16%)	6 (24%)
Cucaracha	3 (12%)	6 (24%)
Gato	4 (16%)	3 (12%)
<i>Fraxinus angustifolia</i>	3 (12%)	4 (16%)
<i>Lolium persistente</i>	2 (8%)	4 (16%)
<i>Cynodon dactylon</i>	1 (4%)	5 (20%)
<i>Ligustrum vulgare</i>	1 (4%)	2 (8%)
Plumas	2 (8%)	0 (0%)
<i>Schinus molle</i>	1 (4%)	0 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0 (0%)	2 (8%)
<i>Candida albicans</i>	0 (0%)	1 (4%)
<i>Holcus halepense</i>	0 (0%)	1 (4%)

IMC. Índice de masa corporal. Promedio

D.E. Desviación Estándar. Frecuencia

%. Porcentaje.

Una respuesta positiva a polen se asoció siempre a una respuesta positiva a otros alérgenos.

## II. Descripción General del Estudio

Después de la estandarización de los procedimientos, dos médicos alergólogos seleccionaron a los candidatos a participar y les efectuaron las pruebas complementarias necesarias para el diagnóstico diferencial pertinente en cada caso. A todos se les efectuaron pruebas cutáneas de alergia con un panel de 36 alérgenos inhalables (AllerStand, Ciudad de México, México), de acuerdo a la Guías IRC, 1994 (Anexo 2) (3,4). Una vez confirmado el diagnóstico, se invitó a los pacientes que reunieron los criterios de selección a participar en el estudio. Entonces se registraron las características demográficas y clínicas de los pacientes que decidieron participar. A continuación se les administraron los siguientes cuestionarios:

1. El "Cuestionario de frecuencia e intensidad de los síntomas nasales en niños con rinitis alérgica persistente", validado en español (Anexo 3) (22, 78).
2. El "Cuestionario modificado de la Encuesta sobre Tabaquismo en Jóvenes", en su versión corta validada en español (Anexo 4) (79,80).
3. El cuestionario del "*Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood*", validado en español (Anexo 5) (23, 81).

En el mismo día en que se administraron los cuestionarios, se recolectó una primera muestra de orina y durante las siguientes 24 horas se recolectó una segunda muestra. Las dos muestras fueron codificadas y congeladas a -70 °C. Una vez que se completo la recolección de muestras de todos los participantes, se realizó la determinación en bloque de la concentración de cotinina en orina, mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia competitiva de fase sólida para cotinina (Metabolites of Nicotine; DPC, La Garenne-Colobes, France; Inmunolite 1000;DPC, Los Angeles CA, USA), y de concentración de creatinina en orina por el método colorimétrico de Jaffe (Clinical Chemistry IL Test tm Spinreact; Sant Esteve de Bas, Spain; Express Plus, Bayer; Tarrytown NY, USA). Con los resultados de estas pruebas se determinó la concentración urinaria de cotinina ajustada a la concentración de creatinina ([cotinina]/[creatinina]). El punto de corte para determinar la exposición o no exposición al humo de tabaco fue de  $\geq 21.8$  ng/mg (41).

Un investigador, cegado a las respuestas obtenidas en los cuestionarios, realizó la rinomanometría anterior (Rhinospir ProPF 2001, Sibelmed, España) a todos los participantes. El mismo investigador obtuvo una muestra de la mucosa nasal del cornete inferior, mediante raspado con cureta, (Rhinoprobe Arlington Scientific Inc, Arlinton, Tx). Las muestras de mucosa nasal se colocaron en portaobjetos (Superfrost plus, Shandon, Pittsburg) y se fijaron con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al completar la recolección de muestras se efectuó la evaluación morfológica del epitelio de la mucosa nasal para identificar a los eosinófilos por morfología e inmunohistoquímica, así como para identificar la frecuencia de apoptosis, mediante inmunohistoquímica para Fas, Bcl-2 y caspasa 3, así como TUNEL.

### III. Procedimientos

#### *Cuestionarios*

A cada participante se le administraron de manera directa, siempre sin observadores ni acompañantes y por entrevista guiada por cuestionario, en el siguiente orden: 1. Cuestionario de frecuencia e intensidad de los síntomas nasales, 2. Cuestionario modificado de la Encuesta sobre Tabaquismo en Jóvenes y 3. Cuestionario del “*International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*”.

El cuestionario de frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (22, 78), permite identificar la presencia de obstrucción nasal, estornudos, prurito y rinorrea. La severidad de cada síntoma se califica como ausente (0), leve (1), moderado (2), o severo (3). La puntuación total del cuestionario se calcula como la suma de la puntuación de cada síntoma, con un máximo posible de 12 puntos. En un estudio previo se aplicó este cuestionario en 25 niños con rinitis alérgica persistente de la misma Institución de Salud, observando un coeficiente de correlación intraclase de 0.93 (IC 95%, 0.85-0.97), con repetibilidad de 96% y un coeficiente de repetibilidad de 2 puntos.

El cuestionario modificado de la Encuesta sobre Tabaquismo en Jóvenes (79,80), mostró una consistencia mayor al 95% en adolescentes de 13 y 15 años de edad en un estudio realizado en México, incluida la Ciudad de México. En preparación para el presente estudio, se administraron las 13 preguntas sobre el consumo de tabaco y la convivencia con fumadores a 25 niños con rinitis alérgica persistente, de 10 a 19 años de edad (15 hombres y 10 mujeres), en quienes se identificó adecuadamente la exposición a humo de tabaco en el 100% de los expuestos, en congruencia con la concentración de cotinina/ creatinina en orina.

En lo referente al cuestionario del “*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*” (ISAAC), ha sido validado en niños con rinitis alérgica, con una especificidad de 77.5% a 97.6%, sensibilidad de 2.5% a 42.7% y valor predictivo positivo de 63%, en estudios previos fue administrado a niños y adolescentes mexicanos con enfermedades alérgicas, para identificar las características de la enfermedad (23, 81).

#### *Rinomanometría anterior*

Previa calibración del aparato, con el paciente en posición sedente, en un sillón para exploración otorrinolaringológica sin inclinación agregada, con el tronco y la cabeza erguidos, se realizó rinomanometría anterior activa con el rinomanómetro Rhinospir Pro (Sibelmed, Barcelona). Después de 30 minutos de aclimatización a la sala de exploración, con temperatura constante a través del año de 26° C y humedad de 60%. Al paciente se le indicó que cerrara los labios y respirara a través de la nariz sin hablar, toser o deglutir, sin aplicar descongestionantes nasales. Después de un registro basal de 30 segundos, se midió la presión de cada fosa nasal, con un catéter conectado a la presión del transductor, mientras se efectuaba el registro del flujo del aire en la fosa nasal contralateral, mediante un



neumotacografo. Todas las mediciones se realizaron a una presión de referencia de 150 Pa, de acuerdo a las guías de recomendación del International Committee on Standardization of Rhinomanometry. La presión se registró en Pa.s/cm<sup>3</sup> y el análisis se efectuó por computadora, considerando el ciclo nasal para identificar la fosa nasal con baja o alta resistencia (82).

Antes de comenzar el estudio, el procedimiento se aplicó a 20 niños con rinitis alérgica persistente, de 10 a 19 años de edad (10 hombres y 10 mujeres), observando un registro óptimo en el 90% de los casos.

#### *Determinación de cotinina en orina*

Previo instrucción a cada paciente, se obtuvieron muestras de 20 ml en frasco estéril. Las muestras se congelaron a -20° C hasta su análisis. Una vez descongeladas previa calibración, se efectuó inmunoensayo por quimioluminiscencia competitiva de fase sólida para cotinina (Metabolites of Nicotine; DPC, La Garenne-Colobes, France) (Inmunolite 1000; DPC, Los Angeles CA, USA) y por el método de colorimétrico de Jaffé para creatinina (Clinical Chemistry IL Test tm Spinreact; Sant Esteve de Bas, Spain) (Express Plus, Bayer, Tarrytown NY, USA). Los resultados se registraron en ng/mg.

Para la determinación de cotinina en orina se realizó en el Laboratorio de Aplicación de Isótopos y Metrología, S.A. de C.V., con la técnica de quimioluminiscencia en el equipo (Inmunolite 1000; DPC, Los Angeles Cal, NJ, USA) previa calibración. Las muestras se procesaron en bloque con el kit (Metabolites of Nicotine; DPC, La Garenne-Colobes, France). Se elaboraron las curvas estándar de cotinina y de los controles positivo y negativo. La técnica utiliza una fase sólida que consiste en una esfera de poliestireno recubierta con anticuerpos policlonales de conejo anti-cotinina, a la cual se agregaron 20 µl de orina del paciente, y se incubaron junto con la enzima de fosfatasa alcalina. Luego se lavó y se centrifugó. Nuevamente se incubó con el sustrato quimioluminiscente, y la enzima para que realice su actividad catalítica. La señal emitida de la reacción se mide en un fotomultiplicador. La lectura de la cotinina se realizó con referencia a la curva estándar en ng/ml.

La estandarización de la determinación de cotinina y creatinina en orina se efectuó en 28 pacientes con rinitis alérgica expuestos y no expuestos a humo de tabaco, de 10 a 19 años de edad (13 hombres y 15 mujeres). La concentración de cotinina en orina con un punto de corte para determinar la exposición/no exposición a humo de tabaco de >21.8 ng/mg (41) fue consistente con las respuestas a las 13 preguntas que identifican el consumo de tabaco y la convivencia con fumadores del cuestionario modificado de la Encuesta sobre Tabaquismo en Jóvenes (79,80). La creatinina presentó un coeficiente de variación interna de 1%.

#### *Obtención y procesamiento de muestras de la mucosa nasal*

Una vez que se describió el procedimiento al paciente, en posición sedente sobre un sillón para exploración otorrinolaringológica, con el tronco y la cabeza erguidos, se efectuó limpieza suave de las cavidades nasales. Bajo visión directa, con

iluminación con lámpara frontal y espéculo, se efectuó raspado con cureta de la mucosa nasal de la parte media del cornete inferior (Rhinoprobe, Arlington Scientific Inc, Arlington, Texas): se colocó la cureta sobre la mucosa de la porción media del cornete inferior y con presión suave de la punta se deslizó hacia el exterior, 2 o 3 mm en dos ocasiones.

Previo a la obtención de muestras para el estudio, en 53 voluntarios de 10 a 19 años de edad (22 hombres y 31 mujeres), 30 sin enfermedad de nariz y senos paranasales y 23 con antecedente de rinitis alérgica persistente, se obtuvieron células de la mucosa nasal por raspado y se cuantificó el número de células viables por el método de exclusión de azul de tripano en una cámara de Neubauer, con la obtención de un total de 255 000 a 1 357 500 células por mililitro.

El procesamiento de las muestras, se efectuó con dos técnicas: la primera realizando directamente un frotis y la segunda mediante citología de base líquida. En lo referente al frotis, cada muestra obtenida se transfirió a un portaobjetos (Superfrost plus, Shandon, Pittsburg), se dejó secar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos y posteriormente se fijó con acetona a 4°C durante 10 minutos.

En cuanto a la citología de base líquida, las muestras obtenidas de los pacientes fueron colocadas en 1 ml de medio de conservación (Liqui-PREP TM de la Marca Productos Biológicos de México), se realizó una agitación con Vortex por 30 segundos, posteriormente se realizó un centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 500 µl, de esta solución (botón celular) obtenida, se toman 100 µl y se le añaden 30 µl de la solución encapsuladora (Liqui-PREP TM), se mezclaron por pipeteo y de la mezcla final se colocaron 30 µl en portaobjetos electrocargados Superfrost plus (Shandon, Inc; Pittsburg, PA), se dejaron secar a 60 °C por 10 minutos y posteriormente se fijaron en acetona a 4°C durante 10 minutos, se dejaron secar nuevamente para la evaporación total de la acetona y se almacenaron para realizar las técnicas de inmunocitoquímica y TUNEL.

#### *Cuantificación de eosinófilos y de la apoptosis de eosinófilos*

Las mediciones se efectuaron en el Laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Pediatría. Para la determinación de la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos, se realizó la inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína básica mayor de eosinófilos (MBP), clona BMK13, 1:25 (Chemicon International) y tinción simultánea para apoptosis inmunohistoquímica con anticuerpo anti-caspasa-3 (caspase-3 rabbit policlonal, catalogo CP229A, dilución 1:100, Biocare Medical, LLC, CA USA), Fas (CD95, rabbit policlonal, dilución 1:25, Marca Abcam) y anti-Bcl-2 (Oncoprotein, mouse monoclonal, clona 100/D5, dilución 1:50, Biocare Medical, CA USA), luego kit TUNEL de apoptosis in situ (Takara, Shiga, Japon). Las muestras teñidas fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia y campo claro (Olympus, BX51, Japan) con el objetivo de 40X en 12 campos calibrados al azar. Se efectuó la evaluación morfológica del epitelio de la mucosa nasal para identificar a los eosinófilos por

morfología (Wright) e inmunohistoquímica así como para apoptosis. Se expresó la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de eosinófilos apoptóticos por mm<sup>2</sup> contando las células positivas se identificaron como eosinófilos por dos observadores previa estandarización (FJGV y SG) y sin conocer si las muestras pertenecían al grupo de expuestos o no expuestos. Antes de comenzar el estudio se estandarizaron las mediciones por inmunohistoquímica en 75 muestras de mucosa nasal de sujetos sin enfermedad de nariz ni senos para-nasales.

En cuanto a la lectura de laminillas, en 50 muestras de mucosa nasal, el coeficiente de correlación intraclase de las mediciones efectuadas por 2 observadores independientes, en dos ocasiones fue de ri: 0.98.

Los frotis se hidrataron a partir de alcohol absoluto anhidro hasta agua destilada, se bloqueo la actividad de peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.9% medio acuoso, terminada esta se incubó a temperatura ambiente por 90 minutos con el anticuerpo monoclonal de raton anti-proteína básica mayor de eosinófilos (MBP), clona BMK13, 1:25 (Chemicon International), se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado y con el complejo Estreptavidina/Peroxidasa por 30 minutos c/u del kit comercial Mouse/Rabbit Imunodetector with HRP DAB, catalogo BSB0005 (BIOSB Inc. Santa Barbara CA. USA), se visualizó la reacción monitoreando al microscopio con el sustrato 3,3'-deaminobencidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalogo (Dako Corporation, Carpinteria Calif. USA). Al final se realizó un lavado con agua destilada, se fotografiaron y se continuó con la segunda reacción. En todo el proceso se realizaron lavados con PBS por 4 minutos entre cada reacción. Una vez que se fotografiaron las muestras, se realizo un lavado con TBS y se continuó con la segunda reacción de inmunohistoquímica.

Se realizó el desenmascaramiento de epítopes por el método de microondas/olla de presión durante 5 minutos con la solución de citratos (mmuno/DNA retriever with citrate, marca BIO SB, Cat. BSB 0021), se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se continuó con lavados con agua destilada durante 30 segundos, posteriormente con TBST por 4 minutos, se incubo por 45 minutos con alguno de los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-caspasa-3 (caspase-3 rabbit policlonal, catalogo CP229A, dilución 1-100, Biocare Medical, LLC, CA USA), Fas (CD95, rabbit policlonal, dilución 1:25, Marca Abcam) y anti-Bcl-2 (Oncoprotein, mouse monoclonal, clona 100/D5, dilución 1:50, Biocare Medical, CA USA), simultáneamente, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado y con el complejo Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina por 30 minutos c/u del kit comercial Super Sensitive IHQ Detección system Cat HK331 (BioGenex Laboratories, CA USA), se visualizo la reacción monitoreando al microscopio con el sustrato Nueva fucsina (New Fuchsin Substrate Pack, cat HK183-5k, BioGenex Laboratories, CA USA). Al final se realizó un lavado con agua destilada, contratinción con hematoxilina de Gill y diferenciación con NH<sub>4</sub>OH 0.37 M. Lavado en dos ocasiones con agua destilada, deshidratación con alcoholes de gradación creciente hasta alcohol absoluto. Secado a temperatura ambiente, montaje con cubreobjetos, resina Entellan y fotografía. Dobles o triples tinciones simultáneamente.

Para identificar la apoptosis en los eosinófilos, en las muestras con proceso de citología base líquida, se utilizó con el kit TUNEL de apoptosis in situ (Takara, Shiga, Japon), y se realizó la técnica de ICQ para la detección de eosinófilos mediante el anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína básica mayor de eosinófilos (MBP), clona BMK13, 1:25 (Chemicon International) como ya se describió anteriormente, posteriormente se lavó con agua destilada, se aplicaron 10 µg/ml proteinasa K a temperatura ambiente por 15 minutos, se realizó un lavado con TBS, se boqueó la actividad de peroxidasa endógena aplicando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.9% medio acuoso por 5 minutos, se realizó un lavado con TBS. Se aplicaron a cada muestra 50 µl de la reacción (Enzyrna Tdt 5 µl y Buffer 45 µl, preparado) y se incubó a 37°C por 1 hora 40 minutos en el equipo Microprobe (Fisher Scientific Cat. 15-188-30). Terminada la reacción se lavó 3 veces con TBS por 4 minutos. Terminada esta reacción se aplicaron 70 µl de anti FITC/ AP a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavó 3 veces con TBS por 4 minutos. Después se visualizó la reacción con el sustrato Nueva fucsina (New Fuchsin Substrate Pack, cat HK183-5k, BioGenex Laboratories, CA USA), por 7 minutos. Al final se lavó con agua destilada, se realizó la contratinción con Hematoxilina de Gill, lavado con agua corriente 2 veces por 5 minutos y deshidratación con alcoholes de gradación creciente hasta alcohol absoluto, se cubrió con cubreobjetos y resina acuosa, para su posterior análisis al microscopio.

#### IV. Procesamiento de Datos

Los resultados de cada una de las determinaciones se registraron en la hoja de recolección de datos. Después se concentró la información en una hoja de cálculo (Excel 2000, Microsoft, Palo Alto) para efectuar su análisis estadístico mediante el programa computado CSS (Statsof, Tulsa).

#### V. Aspectos Estadísticos.

El análisis estadístico se realizó de acuerdo con la distribución de datos, que fue corroborada con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significancia estadística de 0.05. Se utilizaron las pruebas siguientes, que se acotan en el apartado de Resultados: “t” de Student para muestras independientes, “U” Mann-Whitney, “t” para proporciones, r de Pearson, ANOVA y ANCoVA.

## RESULTADOS

La edad, tiempo de evolución clínica de la rinitis, peso, índice de masa corporal, relación hombre/mujer o el número de alérgenos positivos identificados con las pruebas de prick cutáneas fueron similares en el grupo de expuestos y de no expuestos a humo de tabaco ( $p>0.1$ ).

El grupo de participantes expuestos a humo de tabaco, estuvieron expuestos durante los 2 días anteriores a su evaluación, 12 informaron tanto tabaquismo activo como pasivo y 13 solo tabaquismo pasivo. Entre ellos once de los participantes fueron expuestos a tabaco durante su primer año de vida.

La frecuencia de tener rinitis alérgica persistente asociada con otras enfermedades alérgicas fue más alta en pacientes expuestos a humo de tabaco (92%) que en los pacientes sin exposición (64%) (prueba de t para proporciones,  $p\leq 0.05$ ).

La frecuencia de los síntomas nasales y la puntuación total de los síntomas nasales fue similar en los dos grupos, para el grupo de expuestos, de 1 a 10 (mediana de 5) y para el grupo de no expuestos, 1 a 8 (mediana de 5) (Fig. 3) (t para proporciones y prueba de U-Mann-Whitney,  $p\geq 0.05$ ). Sin embargo, se observó correlación entre la puntuación total del cuestionario y la edad de los pacientes (r de Pearson = 0.38,  $p< 0.01$ ).

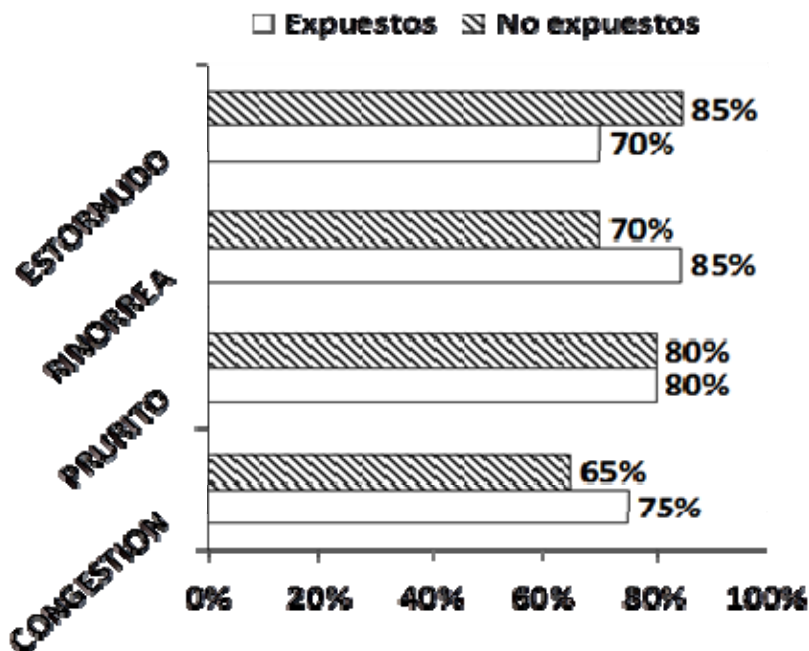


Figura 3. Frecuencia de síntomas nasales registrados en 50 pacientes con rinitis alérgica persistente: 25 con y 25 sin exposición a humo de tabaco.

Tabla 2. Resultados de la rinomanometría de 25 pacientes con rinitis alérgica persistente con y 25 sin exposición a humo de tabaco.

Medición	Expuestos a humo de tabaco	No expuestos a humo de tabaco
	(n = 25)	(n = 25)
	Promedio (D.E.)	Promedio (D.E.)
<i>Rinomanometría anterior activa</i>		
Resistencia total (Pa.s/cm <sup>3</sup> )	0.338 (0.145)	0.247 (0.067)
Pasaje con resistencia alta (Pa.s/cm <sup>3</sup> )	0.896 (0.519)	0.694 (0.282)
Pasaje con resistencia baja (Pa.s/cm <sup>3</sup> )	0.534 (0.184)	0.416 (0.149)
<i>Eosinófilos</i>		
Número de eosinófilos por mm <sup>2</sup>	22 (33)	12.4 (14)
Eosinófilos apoptóticos	0 a 4 %	0 a 8 %

D.E. Desviación Estándar.

%. Porcentaje

La rinomanometría mostró mayor resistencia nasal en los pacientes con rinitis alérgica expuestos a humo de tabaco que en los pacientes sin exposición a humo de tabaco (prueba t,  $p \leq 0.01$ ) (Tabla 2).

En los registros unilaterales, de los pasajes con resistencia alta/ baja, se identificó que en los pacientes expuestos a humo de tabaco el pasaje con resistencia baja tuvo valores más altos en los pacientes con exposición a humo de tabaco que en aquellos sin exposición (t-test,  $p \leq 0.05$ ) (Tabla 2 y Figura 4). Esta diferencia no se presentó en el pasaje con resistencia alta, con una variabilidad más amplia en las mediciones en los dos grupos en estudio (Tabla 2).

El análisis de correlación no mostró asociación entre la resistencia total, la resistencia de los pasajes con resistencia alta/ baja y los síntomas nasales, las características de los pacientes o el número de alérgenos positivos ( $r$  de Pearson,  $p > 0.05$ ). Tampoco se observó influencia de las características generales de los pacientes (ANCoVA,  $p \geq 0.05$ ); ni de la exposición a humo de tabaco durante el primer año de vida, el total de síntomas ni la resistencia nasal.

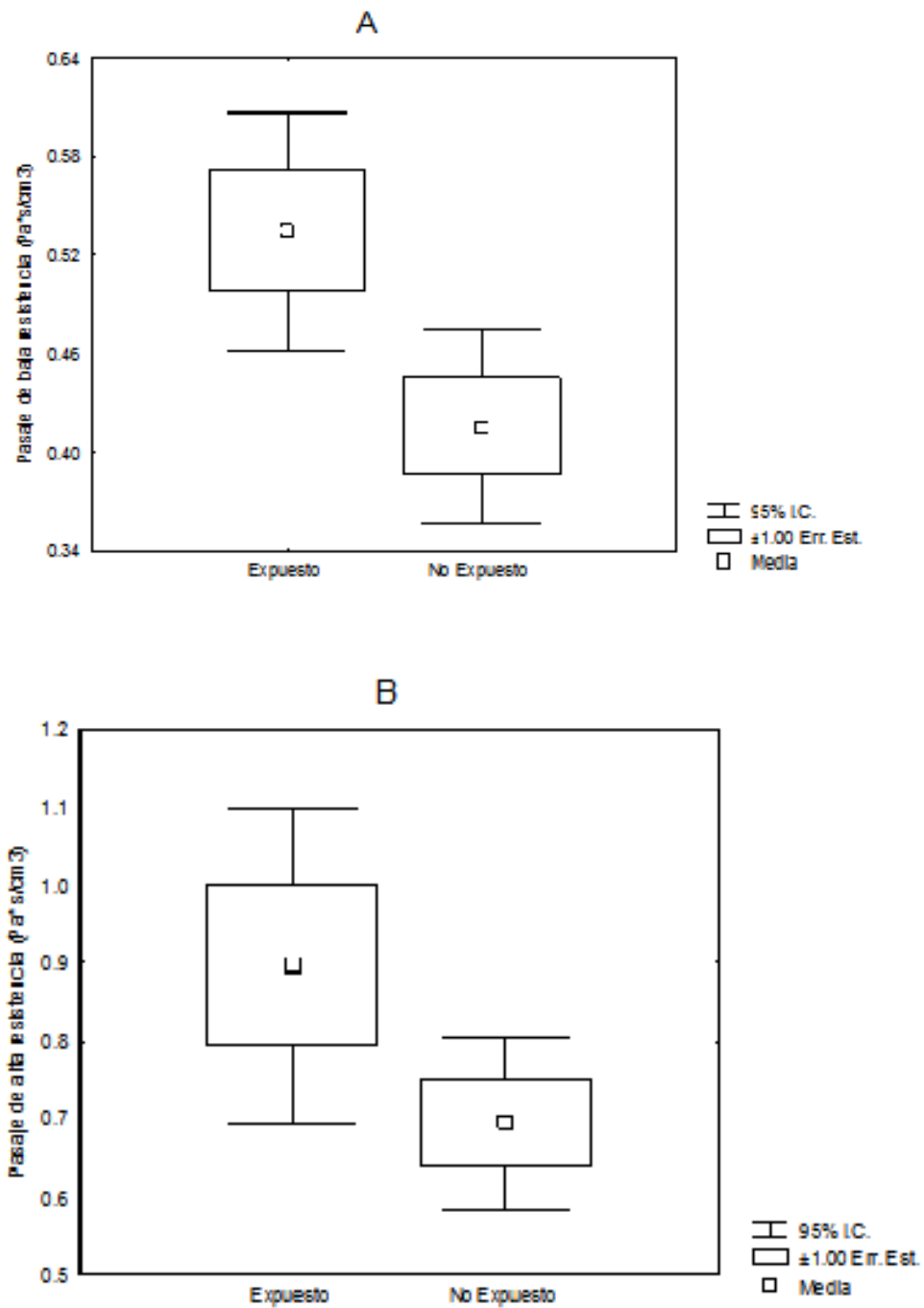


Figura 4. Media, Intervalo de Confianza de la media al 95% y Error estándar de la media de la resistencia en el pasaje resistencia alta (A) y baja (B) de 50 pacientes con rinitis alérgica persistente, 25 con exposición a humo de tabaco y 25 sin exposición.

El número de eosinófilos en mucosa nasal de los pacientes fue variable y estuvo asociado al índice de masa corporal en el total de pacientes ( $r$  de Pearson = 0.31,  $p < 0.05$ ). Se observó una tendencia a un mayor número de eosinófilos en los pacientes expuestos comparados con los no expuestos, pero sin diferencia estadística (prueba  $t$ ,  $p > 0.05$ ). Sin embargo, al comparar a los pacientes expuestos a humo de tabaco por ser fumadores activos con los pacientes sin exposición y aquellos con exposición pasiva se observó diferencia estadística (ANOVA,  $p = 0.05$ ) (Figura 5), que fue debida a la diferencia entre los pacientes expuestos por ser fumadores activos comparados con los no expuestos (LSD,  $p < 0.05$ ), sin diferencia entre estos con los expuestos a humo de tabaco de manera pasiva (Figura 6).

La diferencia observada entre los expuestos de manera activa y los no expuestos mostró influencia del índice de masa corporal (ANCOVA,  $p < 0.05$ ), con diferencia de la edad entre los dos grupos ( $16.4 \pm 2.5$  versus  $13.5 \pm 2.6$ ) (prueba  $t$ ,  $p < 0.05$ ).

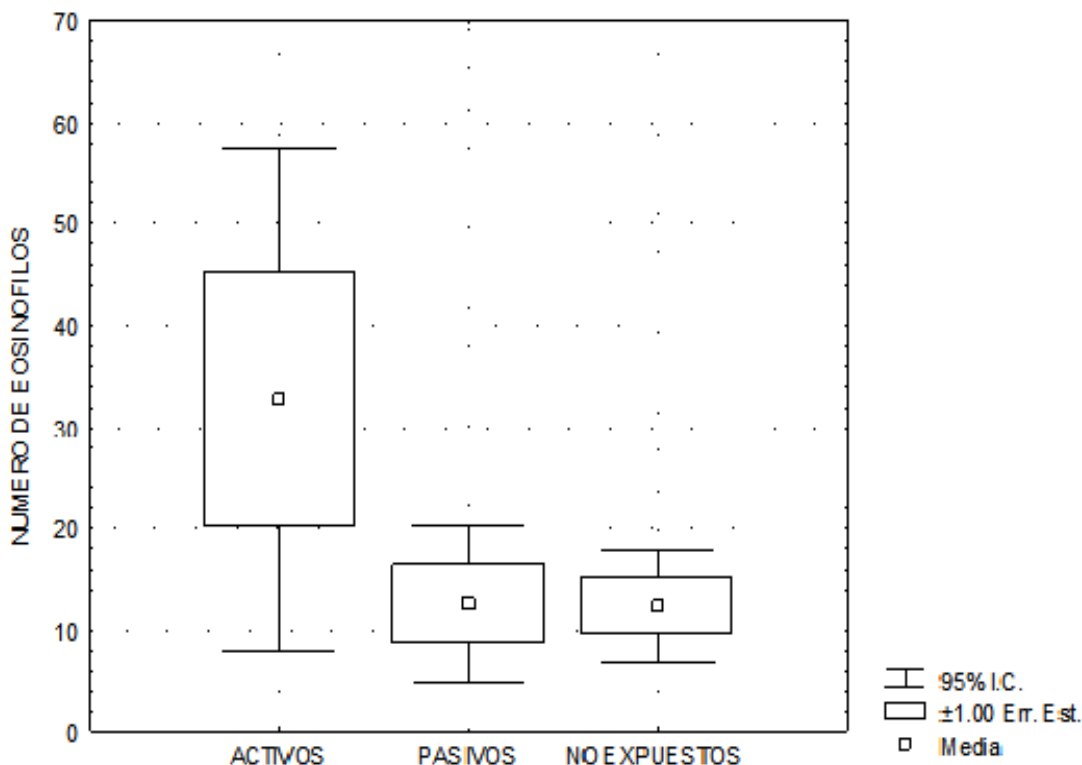
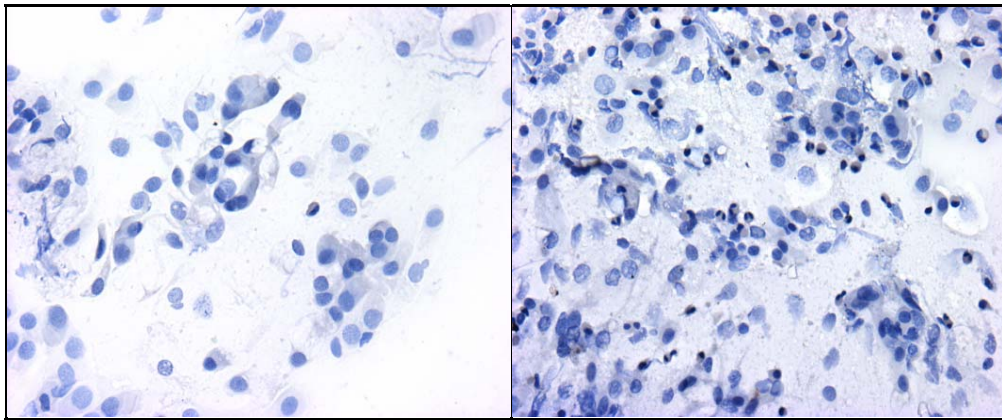


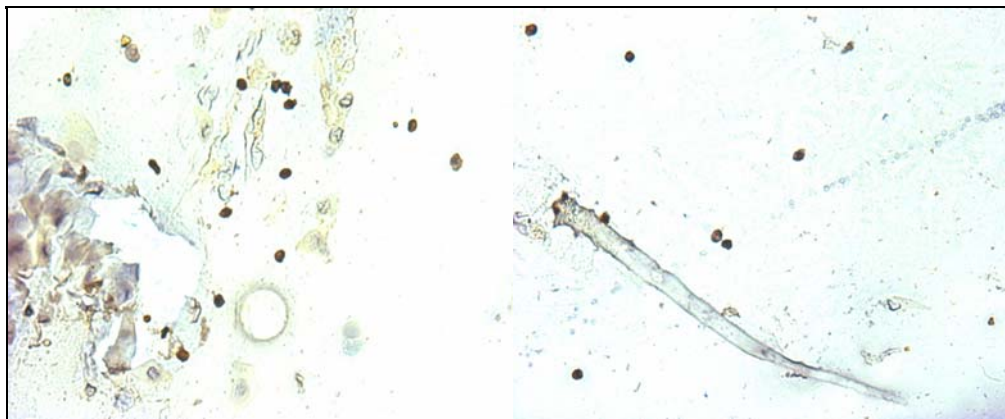
Figura 5. Número de eosinófilos en mucosa nasal en pacientes con rinitis alérgica persistente expuestos activos, expuestos pasivos y no expuestos a humo de tabaco.



En ambos grupos, los expuestos y los no expuestos a humo de tabaco, la frecuencia de apoptosis fue baja: en un paciente del grupo de expuestos (4%) y en dos pacientes del grupo de no expuestos (8%). Para corroborar este resultado, después de la identificación con Fas, Bcl-2 y caspasa 3, se efectuó TUNEL para detectar los deoxinucleotidil terminales como marcador de apoptosis (Figura 7).



*Figura 6. Inmunohistoquímica: Presencia de eosinófilos a 40X, a: sujeto no expuesto y b: sujeto expuesto.*



*Figura 7. TUNEL: Presencia de apoptosis de eosinófilos a 40X, a: sujeto no expuesto y b: sujeto expuesto.*

## DISCUSION

Los resultados de este estudio muestran que en niños y jóvenes con rinitis alérgica persistente, la exposición a humo de tabaco puede incrementar la resistencia nasal, independientemente de que el paciente refiera mayor o menor frecuencia/severidad de los síntomas nasales. Además quienes son fumadores activos, comparados con los no expuestos a humo de tabaco, pueden presentar mayor número de eosinófilos en la mucosa nasal, sin asociación a la frecuencia con que se observe apoptosis.

El hallazgo de una mayor frecuencia de enfermedades alérgicas concurrentes en los pacientes expuestos a humo de tabaco que en los no expuestos, observada en este estudio, es consistente con la evidencia epidemiológica de la relación entre la exposición a humo de tabaco y la incidencia de enfermedades atópicas en pacientes con asma (83, 84) y de dermatitis atópica (85-87).

En este estudio, no se encontraron diferencias de los síntomas nasales en los expuestos y los no expuestos a humo de tabaco. Lo que puede estar relacionado a la evidencia de que los niños y adolescentes con rinitis persistente no suelen reportar los síntomas nasales y pueden tener dificultad para expresar por si mismos sus manifestaciones clínicas (88, 89); mientras que los adultos identifican mejor sus síntomas, que suelen asociarse a los resultados de métodos objetivos de evaluación (90, 91). Por este motivo, se esperaría que los pacientes de mayor edad puedan identificar de manera más objetiva sus síntomas nasales, como se observó en la correlación positiva entre las respuestas al Cuestionario de síntomas nasales y la edad de los pacientes que participaron en este estudio, independientemente de ser expuestos o no expuestos a humo de tabaco.

Los mecanismos que influyen en el aumento de la resistencia nasal no son bien conocidos. Se ha propuesto que un incremento en la resistencia nasal ocurre a través de la congestión vascular y es mediada por la activación de neuronas con fibras C (92). Esta hipótesis es consistente con el hecho de que la exposición a humo de tabaco incrementa la respuesta inflamatoria nasal (35,93) la cual induce congestión vascular. También, se ha sugerido que los pacientes con rinitis alérgica pueden ser más susceptibles a estos cambios (55,94).

La inflamación de la mucosa nasal afecta significativamente la fisiología nasal. Al aumentar la resistencia nasal, se altera el paso del aire por la nariz en reposo y durante el sueño, lo que a su vez se asocia a respiración oral y alteraciones del sueño. Young et al, (95) identificaron que los sujetos con congestión nasal por alergia, tienen 1.8 veces más probabilidad de tener alteraciones respiratorias de moderadas a severas durante el sueño. En el presente estudio, no se evaluaron las consecuencias clínicas de la exposición a humo de tabaco, sólo los síntomas nasales. Sin embargo, los resultados señalan la pertinencia de realizar estudios para identificar su posible asociación a respiración oral, alteraciones del sueño y calidad de vida.

La disociación entre los registros de rinomanometría y los síntomas nasales es consistente con estudios previos que sustentan que la resistencia nasal al flujo de aire y la sensación del flujo nasal son dos aspectos separados que no están directamente relacionados (96).

En lo referente al número de eosinófilos en la mucosa nasal, la evidencia de una cuenta mayor en los expuestos por ser fumadores activos, que en los no expuestos a humo de tabaco, podría tener influencia tanto por el tiempo de la exposición como por la concentración de componentes de tabaco en sujetos con exposición activa. En el caso de los expuestos en forma pasiva, la exposición a humo de tabaco durante los 2 días previos a la obtención de la muestra de la mucosa nasal, podría no haber sido suficiente para observar un aumento del número de eosinófilos en la mucosa nasal, como se observó en los expuestos de manera activa, como se ha observado en estudios previos (97, 98). Lo que sugiere que, en el caso de la exposición pasiva, se requiere de una exposición más prolongada y continúa al humo de tabaco para que los cambios sean observables en un plazo breve (70, 99, 100). En sujetos sanos expuestos a 2 cigarros, se ha identificado que entre la primera y segunda hora no hay diferencia en la cantidad de eosinófilos en esputo, mientras que en sangre disminuyen (97). En un estudio cruzado, realizado en 16 fumadores, luego de periodos de exposición a 8 cigarros y de no exposición a humo de tabaco de 4 horas, se obtuvieron muestras de lavado bronquioalveolar y en sangre, en donde no se identificaron diferencias significativas en el número de eosinófilos en el lavado bronquioalveolar en ambos periodos, pero en sangre el número de eosinófilos disminuyó luego de la exposición aguda a tabaco (98). En estudios en animales se ha identificado, luego de la exposición repetitiva y prolongada a humo de tabaco, un aumento en el número de eosinófilos. En ratones expuestos a humo de tabaco desde el nacimiento hasta las 6 semanas, se identificó un incremento en la cantidad de eosinófilos en sangre a lo largo del tiempo ante la exposición al humo de tabaco (99). En ratones sensibilizados con ovoalbúmina y expuestos a humo de tabaco por 1 mes, se identificó incremento en el número de eosinófilos en el tejido pulmonar, y ante la presencia de TLR-9 agonista disminuyó la reactividad, la inflamación y la remodelación de la vía aérea (100). En ratones expuestos a seis cigarrillos por 1 hora por día durante 14 días consecutivos, se identificó eosinofilia en el lavado bronquioalveolar después de los 14 días de exposición pero no después de los 3 o 7 días de exposición a tabaco, sugiriendo la participación de PAF que se libera ante la exposición a tabaco en su fase temprana en los tejidos de la vía aérea y provoque la atracción de eosinófilos por inducción de la quimiotaxis a estos tejidos (26). Esto sugiere que la exposición aguda a tabaco causa hiperreactividad de la vía aérea con resolución de la misma en pocas horas y no es suficiente para provocar aumento de eosinófilos (101-102).

En el caso de los fumadores activos, se observó mayor cantidad de eosinófilos en la mucosa nasal. Esto puede deberse a la mayor concentración a los productos del humo de tabaco como la nicotina que ocurre ante la exposición activa y que es menor con la exposición pasiva (103), como se documentó en este estudio, mediante la concentración de cotinina ajustada a la concentración de creatinina,

que fue mayor en los expuestos activos que en los expuestos pasivos. Lo que podría haber provocado una mayor migración de eosinófilos en la mucosa nasal, como se ha identificado en sujetos sin enfermedad alérgica fumadores y nunca fumadores, en los que se obtuvieron muestras de sangre después de la suspensión del tabaco y en fumadores continuos a las 2, 6, 12 y 26 semanas después, identificaron que la cantidad de eosinófilos se relacionó con el tipo y la cantidad de cigarrillos siendo mayor en los intensos que en los leves (104).

Los resultados sugieren la pertinencia de corroborar el efecto en la cantidad de eosinófilos en la mucosa nasal, de acuerdo a la cantidad y no solo la calidad de la exposición.

Un hallazgo adicional fue observar que la diferencia en el número de eosinófilos que se observó en los pacientes expuestos de manera activa, tuvo influencia del índice de masa corporal, por lo que no descartamos la posibilidad de que la liberación de sustancias pro-inflamatorias, además de ser pacientes de mayor edad. Aunque existen pocos estudios relacionados con el índice de masa corporal y la rinitis alérgica, sus resultados son no concluyentes o controvertidos por asociaciones negativas (102-108), en pacientes con asma se ha observado que los individuos que presentan un mayor índice de masa corporal tienen mayor severidad del asma por la liberación de adipocinas, citocinas y mediadores inflamatorios secretados por el tejido adiposo como IgE específica (109), IL-6, leptina, adiponectina e IL-10 (110-111). Además de un incremento de IL-5, eotaxina y TNF  $\alpha$  (112). Estas sustancias inducen el reclutamiento de los eosinófilos en la vía aérea, además de la liberación tras la exposición a humo de tabaco (113-119), por lo que no descartamos su posible participación.

Se ha identificado que el humo de tabaco tiene una actividad pro o anti-inflamatoria y también un efecto antiapoptótico o proapoptótico. En sujetos con enfermedad alérgica la cantidad de eosinófilos puede estar influida por este mecanismo, sin embargo, los resultados aún son controversiales (120-122). Se ha identificado que en pacientes con enfermedades alérgicas como el asma el número de eosinófilos se encuentra aumentado, y posiblemente una disminución en la frecuencia de apoptosis está asociada a un aumento en la severidad de los síntomas (76-79), aunque aún no se conoce el mecanismo. En este estudio identificamos una menor frecuencia de apoptosis en los pacientes con rinitis alérgica, como se ha descrito previamente y con una tendencia menor en el grupo de expuestos a humo de tabaco, por lo que es posible que en la rinitis alérgica de igual manera exista una disminución de la apoptosis de los eosinófilos y participe entre otros factores, la exposición a humo de tabaco como se ha documentado que la cotinina y la nicotina inhiben la apoptosis (96) por lo que es necesario corroborar este hallazgo posiblemente con un mayor número de pacientes.

Las principales limitaciones de este estudio son las siguientes: (i) es un estudio transversal que no puede sustentar relación causal y (ii) el tamaño de la muestra solo permite identificar las asociaciones más fuertes, sin denegar que asociaciones más débiles puedan existir. Sin embargo, los hallazgos apoyan la necesidad de diseñar estudios para investigar las posibles consecuencias de la exposición ambiental a humo de tabaco en pacientes jóvenes con rinitis alérgica perenne y sus implicaciones clínicas.

## **CONCLUSIONES**

En pacientes jóvenes con rinitis alérgica persistente:

- La exposición a humo de tabaco se relaciona a un incremento en la resistencia nasal, independientemente de la frecuencia/severidad de los síntomas nasales que informen los pacientes.
- Los fumadores activos pueden tener mayor número de eosinófilos en la mucosa nasal que los pacientes sin exposición a humo de tabaco, sin que exista asociación con la frecuencia de apoptosis de eosinófilos.

**FINANCIAMIENTO:**

El estudio se efectuó con el Apoyo financiero del Fondo de Investigación en Salud del IMSS 2006/1 A)/I/015 y el Apoyo Integral para la Formación de Doctores en Ciencias 2006, CONACyT- UNAM.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1 Bush RK. Etiopathogenesis and management of perennial allergic rhinitis: a state of the art review. *Treat Respir Med* 2004;3:45-57.
- 2 Skoner DP. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S2-8.
- 3 Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop Group, World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-334.
- 4 Mygind N, Anggard A, Druce H. Definition, classification, and terminology. In: Mygind N, Weeke B, editors. *Allergic and vasomotor rhinitis*. Copenhagen: Muunksgaard 1985:15.
- 5 Meltzer EO. The prevalence and medical and economic impact of allergic rhinitis in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S805-28.
- 6 Wright AL, Holberg CJ, Martínez FD, Halonel M, Morgan W, Taussing LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics* 1994;94:895-901.
- 7 Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5ta Ed. Elsevier España: Madrid, 2004:563.
- 8 Haberal I, Corey JP. The role of leukotrienes in nasal allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:274-9.
- 9 Borish L. The role of leukotrienes in upper and lower airway inflammation and the implications for treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:16-22.
- 10 O'Byrne PM, Wood L. Interleukin-5 and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1999;29:573-5.
- 11 Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Meier C, Taeumer T, Buhl R. A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis: correlation with plasma interleukin-5. *Clin Exp Allergy* 2003;33:475-82.
- 12 Lopez Velazquez B, Bastida Segura DL, Escárcega Barbosa D, et al. Determinación de interleucinas e IgG4 en pacientes con rinitis alérgica, con y sin inmunoterapia. *Rev Alergia Mex* 2004;5:139-44.
- 13 Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 1991;325:860-9.
- 14 Lin R, Nahal A, Lee M, Menikoff H. Cytologic distinctions between clinical groups using curette-probe compare to cytology brush. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2001;86:226-31.
- 15 Jirapongsananuruk O, Vichyanond P. Nasal cytology in the diagnosis of allergic rhinitis in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80:165-70.
- 16 Lin RY, Clarin E, Lee M, Menikoff H, Nahal A. Patterns of nasal eosinophilia in allergy clinic patients as determined by swab and curette sampling. *Allergy Asthma Proc* 1997;18:221-6.
- 17 Lund V. Allergic rhinitis-making the correct diagnosis. *Clin Exp Allergy* 1998;28:S25-8.
- 18 Escalante DA, Mercado OV, Sienna-Monge JLL. *Rinosinusitis alérgica*. Temas de pediatría: Alergia e Inmunología. México:McGraw-Hill, 1997:141-54.

- 19 Bañuelos-Arias AC, Montaño-Velázquez BB, Campillo Navarrete MR, et al. Pruebas cutáneas, IgE sérica específica e IgE total en el diagnóstico de pacientes con rinitis alérgica perenne. *Rev Alergia Mex* 2003;4:147-53.
- 20 Montaño-Velázquez BB, Jáuregui-Renaud K, Bañuelos-Arias AC, et al. Vitamin E effects on nasal symptoms and serum specific IgE in patients with perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;96:45-50.
- 21 Passali D, Mezzedimi C, Passali CG, Bellussi L. Monitoring methods of nasal pathology. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999;49:S199-202.
- 22 Montaño-Velázquez BB, Jáuregui-Renaud K, Campillo-Navarrete MR, et al. Evaluation of a questionnaire for measuring nasal symptoms in subjects with allergic rhinitis (in Spanish). *Rev Alergia Mex* 2003;1 :17-21.
- 23 Tatio-Cano MI, Sanín-Aguirre LH, Gonzalez V, Ruiz-Velasco S, Romieu I. Prevalencia de asma, rinitis y eczema en escolares de la ciudad de Cuernavaca México. *Salud Publica Mex* 1997;39:497-506.
- 24 International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Coordinating Committee. Manual for the ISAAC. Bochum (FRG): ISAAC Coordinating Committee, 1992.
- 25 De S, Fenton JE, Jones AS, Clarke RW. Passive smoking, allergic rhinitis and nasal obstruction in children. *J Laryngol Otol* 2005;119:955-957.
- 26 Matsumoto K, Aizawa H, Inoue H, et al. Eosinophilic airway inflammation induced by repeated exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J* 1998;12:387-94.
- 27 Yamaguchi Y, Suda T, Ohta S, et al. Analysis of the survival of mature human eosinophils: Interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood* 1991;78:2542-7.
- 28 Brown M, Hu-Li J, Paul WE. IL-4/B cell stimulatory factor 1 stimulates T cell growth by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol* 1988;141:504-11.
- 29 Lee E, Robertson T, Smith J, Kilfeather S. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1881-6.
- 30 El Nawawy A, Soliman AT, el-Azzouni O, Amer el-S, Demian S, el-Sayed M. Effect of passive smoking on frequency of respiratory illnesses and serum immunoglobulin-E (IgE) and interleukin-4 (IL-4) concentrations in exposed children. *J Trop Pediatr* 1996;42:166-9.
- 31 Cozen W, Diaz-Sanchez D, James Gaudermann W, et al. Th1 and Th2 cytokines and IgE levels in identical twins with varying levels of cigarette consumption. *J Clin Immunol* 2004;24:617-22.
- 32 Fauler J, Frolich JC. Cigarette smoking stimulates cysteinyl leucotriene production in man. *Eur J Clin Invest* 1997;27:43-7.
- 33 Saareks V, Ylitalo P, Alanko J, Mucha I, Riutta A. Effects of smoking cessation and nicotine substitution on systemic eicosanoid production in man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;263:556-6.
- 34 Ronchetti R, Macri F, Ciofetta G, et al. Increased serum IgE and increased prevalence of eosinophilia in 9 year old children of smoking parents. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:400-7.
- 35 Vinke JG, KleinJan A, Severijnen WFM, Fokkens WJ. Passive smoking causes an "allergic" cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999;51:73-813.



- 36 World Health Organization. Tobacco Free Initiative. The Tobacco Atlas 2002. Available at [http://www.who.int/tobacco/resources/publications/tobacco\\_atlas/en/](http://www.who.int/tobacco/resources/publications/tobacco_atlas/en/). Accesado en enero 30, 2011.
- 37 Secretaria de Salud. Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (ENA-2008). México 2008.
- 38 Reynales-Shigematsu LM, Valdés-Salgado R, Rodríguez-Bolaños R, Lazcano-Ponce E, Hernández-Ávila M. Encuesta de Tabaquismo en Jóvenes en México. Análisis descriptivo 2003, 2005, 2006, 2008. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2009.
- 39 Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, Jones RT3rd, Jones RT, Osman AL. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983;34:604-11.
- 40 Scherer G, Conze C, von Meyerinck L, Sorsa M, Adlkofer F. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 1990;62:459-66.
- 41 Olivieri M, Bodini A, Peroni DG, et al. Passive smoking in asthmatic children. Effect of a "smoke-free house" measured by urinary cotinine levels. *Allergy Asthma Proc* 2006;27:350-353.
- 42 Pauli G, Bessot JC, Quoix E. Effect of the environment on the development of respiratory allergies. *Rev Pneumol Clin* 1989;45:231-6.
- 43 Bjorksten B. The environmental influence on childhood asthma. *Allergy* 1999;54:17-23.
- 44 Senna G, Dama A, Crivellaro M, Gani F, Mezzelani P. Epidemiology of allergic respiratory diseases: many questions, few answers. *Recenti Prog Med* 1997;88:303-8.
- 45 Marogna M, Massolo A, Colombo F, Isella P, Bruno M, Falagiani P. Children passive smoking jeopardises the efficacy of standard anti-allergic pharmacological therapy, while sublingual immunotherapy withstands. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2011; 39:60-7.
- 46 Willes SR, Fitzgerald TK, Bascom R. Nasal inhalation challenge studies with sidestream tobacco smoke. *Arch Environmental Health* 1992;47:223-30.
- 47 Gold DR. Environmental tobacco smoke, indoor allergens, and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2000;108:S643-51.
- 48 Chan-Yeung M, Dimich-Ward H. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Respirology* 2003;8:131-9.
- 49 Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:429-436.
- 50 Bascom R, Kulle T, Kagey-Sobotka A, Proud D. Upper respiratory tract environmental tobacco smoke sensitivity. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1304-11.
- 51 Dessi P, Sambuc R, Moulin G, Ledoray V, Cannoni M. Effect of heavy smoking on nasal resistance. *Acta Otolaryngol* 1994;114:305-10.
- 52 Willes SR, Fitzgerald TK, Permutt T, Proud D, Haley NJ, Bascom R. Acute respiratory response to prolonged, moderate levels of sidestream tobacco smoke. *J Toxicol Environ Health A* 1998;53:193-209.
- 53 Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733-743.
- 54 Welch MJ, Meltzer EO, Orgel HA, Kemp JP. Assessment of the correlation of rhinometry with the symptoms and signs of allergic rhinitis in children. *Ann Allergy* 1985;55:577-579.

- 55 Bascom R, Kesavanathan J, Permutt T, Fitzgerald TK, Sauder L, Swift DL. Tobacco smoke upper respiratory response relationships in healthy nonsmokers. *Fund Appl Toxicology* 1996;29:86-93.
- 56 Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991;65:1097-8.
- 57 Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:243-51.
- 58 De Almagro, DV. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 2012;34:200-11.
- 59 Al-Rabia MW, Blaylock MG, Sexton DW, Walsh G. Membrane receptor-mediated apoptosis and caspase activation in the differentiated EoL-1 eosinophilic cell line. *J Leukoc Biol* 2004;75:1-11.
- 60 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770.
- 61 Nicholson DW. Apoptosis. Baiting death inhibitors (regulation of caspases). *Nature* 2001;410:33-4.
- 62 Ochiai K, Kagami M, Matsumura R, Thmioka H. IL-5 but not interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1997;107:198-204.
- 63 Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, et al. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 1995;96:2924-31.
- 64 Suzuki N, Wakisaka S, Takeba Y, Mihara S, Sakane T. Effects of cigarette smoking on Fas/Fas ligand expression of human lymphocytes. *Cellular Immunology* 1999;192:48-53.
- 65 Woolley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AF, Twaddell SH, Woolley MJ. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:237-43.
- 66 Duncan CJ, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J* 2003;22:484-90.
- 67 Walsh GM. Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Brit J Hematol* 2000;111:61-7.
- 68 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:563-73.
- 69 Kowalski ML, Grzegorzczak J, Pawliczak R, Kornatowski T, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Decreased apoptosis and distinct profile of infiltrating cells in the nasal polyps of patients with aspirin hypersensitivity. *Allergy* 2002;57:403-500.
- 70 Matsukura M, Yamada H, Yodate T, Tezuka T, Chihara J. Steroid-induced changes of eosinophils in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:51-4.
- 71 Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol* 1997;158:3902-8.
- 72 Foresi A, Teodoro C, Leone C, et al. Eosinophil apoptosis in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and with asymptomatic and symptomatic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:411-6.
- 73 Pastrana-Gonzalez V, Montaña-Velázquez BB, Huerta-Yeppez S, et al. Disminución de la apoptosis en la mucosa nasal de pacientes con rinitis alérgica persistente. *Rev Alergia Mex* 2005;52:146-50.

- 74 Hebestreit H, Yousefi S, Balatti I, et al. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils. *Eur J Immunol* 1996;26:1775-80.
- 75 Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995;16:128-130.
- 76 An-Soo J, Inseon-S C, Soong L, et al. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000;55:370-4.
- 77 Mai H, May WS, Gao F, Jin Z, Dengs X. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:1886-91.
- 78 Corren J, Harris AG, Aaronson D, Beaucher W, et al. Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:781-788.
- 79 Warren CW. Tobacco use among youth: a cross country. *Tob Control* 2002;11:252-70.
- 80 Lazcano-Ponce E, Hernández-Avila M. La epidemia de tabaquismo. *Epidemiología, factores de riesgo y medidas de prevención. Salud Publica Mex* 2002;44:51-2.
- 81 Braun-Fahrlander C, Wuthrich B, Gassner M, et al. Validation of a rhinitis symptom questionnaire (ISAAC core questions) in a population of Swiss school children visiting the school health services. SCARPOL-team. Swiss Study on childhood Allergy and Respiratory Symptom with respect to Air Pollution and Climate. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood. Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:75-82.
- 82 Cole P. Rhinomanometry 1988: Practice and trends. *Laryngoscope* 1989;99:311-5.
- 83 Polosa R, Knoke JD, Russo C, Piccillo G, Caponnetto P. Cigarette smoking is associated with a great risk of incident asthma in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1428-1434.
- 84 Demir AU, Celikel S, Karakaya G, Kalyoncu AF. Asthma and allergic diseases in school children from 1992 to 2007 with incidence data. *J Asthma* 2010;47, 1128-1135.
- 85 Morales-Suárez-Varela M, García-Marcos L, Kogan MD, et al. Parents' smoking habit and prevalence of atopic eczema in 6-7 and 13-14 year-old schoolchildren in Spain. ISAAC phase III. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2008;36,336-342.
- 86 Lee CH, Chuang HY, Hong CH, et al. Lifetime exposure to cigarette smoking and the development of adult-onset atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol* 2010. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10116.x.
- 87 Virkkula P, Liukkonen K, Suomalainen A, Aronen E, Kirjavainen T, Pitkranta A. Parental smoking, nasal resistance and rhinitis in children. *Acta Paediatrica* 2011; 100: 1234–1238. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02240.x
- 88 Priftis KN, Drigopoulosb K, Sakalidoua A, Trigaa M, Kallib V, Nicolaidouc P. Subjective and objective nasal obstruction assessment in children with chronic rhinitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:501-505.
- 89 Watson WT, Roberts JR, Becker AB, Gendreau-Reid LF, Simons FE. Nasal patency in children with allergic rhinitis: correlation of objective and subjective assessments. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74:237-40.
- 90 Ciprandi G, Mora F, Cassano M, Gallina AM, Mora R. Visual analog scale (VAS) and nasal obstruction in persistent allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:527-9.
- 91 Marseglia GL, Cirillo I, Klersy C, Caimmi D, Caimmi S, Castellazzi AM, Ciprandi G. Clinical assessment of nasal decongestion test by VAS in adolescents. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20:187-91.
- 92 Lundblad L, Lundberg JM. Capsaicin sensitive sensory neurons mediate the response to nasal irritation induced by the vapour phase of cigarette smoke. *Toxicology* 1984;33,1-7.

- 93 Diaz-Sanchez D, Rumold R, Gong H. Challenge with environmental tobacco smoke exacerbates allergic airway disease in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118, 441-446.
- 94 Tanou K, Koutsokera A, Kiropoulos TS, et al. Inflammatory and oxidative stress biomarkers in allergic rhinitis: the effect of smoking. *Clin Exp Allergy* 2009;39,345-353.
- 95 Young T., Finn L., Kim H. Nasal obstruction as a risk factor for sleep-disordered breathing. The University of Wisconsin Sleep and Respiratory Research Group. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99,S757-762.
- 96 Tomkinson A, Eccles R. Comparison of the relative abilities of acoustic rhinometry, rhinomanometry, and the visual analogue scale in detecting change in the nasal cavity in a healthy adult population. *Am J Rhinol* 1996;10,161-165.
- 97 Van der Vaart H, Postma D, Timens W, et al. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respiratory research* 2005;6:22. Doi:10.1186/1465-9921-6-22.
- 98 LommatzschM, BratkeK, KnappeT, BierA, DreschlerK, KuepperM, StollP, Julius P, VirchowJC. Acute effects of tobacco smoke on human airway dendritic cells in vivo. *European Respir J* 2010;35:1130-1136. doi: 10.1183/09031936.00090109.
- 99 Seymour BWP, Friebertshauser KE, Peake JL, Pinkerton DE, Coffman RL, Gershwin LJ. Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. *Developmental Immunology* 2002;9:47-54.
- 100 Song DJ, Min MG, Miller M, Cho JY, Yum HY, Broide DH. Toll-like receptor-9 agonist inhibits airway inflammation, remodeling and hyperreactivity in mice exposed to chronic environmental tobacco smoke and allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:285-96.
- 101 Hulberth WV, Mclean T, Hogg JC. The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:7-11.
- 102Dusser DJ, Kjkovic TD, Borson DB, Nadel JA. Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pig: possible role of free radicals. *J Clin Invest* 1989;84:900-906.
- 103Matt, GE, Bernert JT, Hovell MF. Measuring Secondhand Smoke Exposure in Children: An Ecological Measurement Approach. *J Pediatr Psychol* 2008;33:156-175.
- 104Juel E, Jensen B, Pedersen E, Narvestadt RD. Blood eosinophil and monocyte counts are related to smoking and lung function. *Respiratory Medicine* 1998;92, 63-69.
- 105Bedolla-Barajas M, Cuevas-Ríos G, García-Barboza E, Barrera-Zepeda AT, Morales-Romero J. Prevalencia y factores asociados a la rinitis alérgica en escolares de ciudad Guzmán, México. *Rev Invest Clin* 2010;63:244-51.
- 106Nagel G, Koenig W, Rapp K, Wabitsch M, Zoellner I, Weiland SK. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in German schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20:81-8.
- 107Bråbäck L, Hjern A, Rasmussenemail F. Body mass index, asthma and allergic rhinoconjunctivitis in Swedish conscripts—a national cohort study over three decades. *Respiratory Medicine* 2005;99:1010-1014.
- 108Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, et al. Obesity and the prevalence of allergic diseases in schoolchildren. *Pediatric Allergy Immunology* 2008;19:527-34.
- 109Fitzpatrick S, Joks R, Silverberg JE. Obesity is associated with increased asthma severity and exacerbations, and increased serum immunoglobulin E in inner-city adults. *Clinical Exp Allergy* 2012;42:747-759.

- 110 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-1808.
- 111 Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-30.
- 112 Shore SA. Obesity and asthma: cause for concern. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:230-6.
- 113 Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol* 2010;159:617-625.
- 114 Weiss ST. Obesity: insight into the origins of asthma. *Nat Immunol* 2005;6:537-9.
- 115 Tanni SE, Nilva RG, Pelegrino NRG, Angeleli AYO, Camila Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflammation* 2010;7:29.
- 116 Li YT, He B, Wang YZ. Exposure to cigarette smoke upregulates AP-1 activity and induces TNF-alpha overexpression in mouse lungs. *Inhalation Toxicology* 2009;21:641-7.
- 117 Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Widner M, Kunkel SL. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol* 1995;154:5411-7.
- 118 Rumold, R, Jyrala M, Diaz-Sanchez D. Secondhand Smoke Induces Allergic Sensitization in Mice. *J Immunology* 2001;167:4765-4770.
- 119 Krisiukeniene A, Babusyte A, Stravinskaite K, Lotvall J, Sakalauskas R, Sitkauskiene B. Smoking affects eotaxin levels in asthma patients. *J Asthma* 2009;46:470-6.
- 120 Aoshiba K, Tamaoki J, Nagai A: Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1392-L1401.
- 121 Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000 Jul;106(1 Pt 1):77-83.
- 122 Jeffery PK, Reid LM: The effect of tobacco smoke, with or without phenylmethyloxadiazole (PMO), on rat bronchial epithelium: a light and electron microscopic study. *J Pathol* 1981;133:341-359.

**ANEXO 1a. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION CLINICA PARA MENORES DE EDAD.HOSPITAL CENTRO MEDICO “LA RAZA”.**

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_.

Por medio del presente autorizo que mi (parentesco) \_\_\_\_\_ nombre: \_\_\_\_\_ participe en el proyecto de investigación titulado “Asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal en pacientes con rinitis alérgica persistente expuestos y no expuestos a tabaquismo” que tiene como objetivo identificarla asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal, en los expuestos (pasivo y activo) y no expuestos a tabaquismo, con registro ante la Comisión Nacional de Investigación con el número 2005-785-107. El estudio consistirá de la aplicación de un cuestionario para evaluar las características de su enfermedad, la gravedad de sus síntomas nasales, un cuestionario de exposición de factores ambientales, una evaluación con un aparato que se coloca sobre la nariz, un raspado dentro de la nariz y la obtención de dos muestras de orina.

Se me ha explicado que la participación de mi (parentesco) \_\_\_\_\_ consistirá en la aplicación de un cuestionario para evaluar las características de su enfermedad, de la gravedad de los síntomas en una sola ocasión, un cuestionario para evaluar la exposición de factores ambientales, la medición con un aparato por la nariz del grado de la nariz tapada y un pequeño raspado de la nariz para obtener células (que aunque no se ha documentado alguna complicación en niños con rinitis alérgica, podría existir una remota posibilidad de un escaso sangrado en la nariz, por lo cual se realizarán las medidas necesarias para su prevención y tratamiento), y dos muestras de orina.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de su participación en éste estudio, aunque no se han registrado efectos que dañen la nariz con los estudios que se realizarán, aún así, estaré pendiente y en contacto con el investigador Dra. B. Montaña V. (52784848 clave 5591159248) y Dra. K. Jáuregui R. (radiocalizador 51290602) ante la presencia de cualquier molestia.

El investigador principal se ha comprometido a darme la información oportuna sobre cualquier procedimiento, para responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirar a mi representado (a) del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibe del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridad de que no se identificará a mi representado (a) en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a la permanencia de mi representado (a) en el mismo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma  
Responsable o Tutor del paciente

\_\_\_\_\_  
Dra. B. Beatriz Montaña Velázquez  
Investigador principal

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo

**ANEXO 1b. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION CLINICA PARA ADULTOS. HOSPITAL CENTRO MEDICO “LA RAZA”.**

Lugar y fecha \_\_\_\_\_.

Por medio de la presente acepto participar, nombre: \_\_\_\_\_ en el proyecto de investigación titulado *“Asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal en pacientes con rinitis alérgica persistente expuestos y no expuestos a tabaquismo”* que tiene como objetivo identificarla asociación de la frecuencia e intensidad de los síntomas nasales (obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos) y la obstrucción nasal con la cantidad de eosinófilos y la frecuencia de apoptosis de eosinófilos en mucosa nasal en los expuestos (pasivo y activo) y no expuestos a tabaquismo, con registro ante la Comisión Nacional de Investigación Científica con el número 2005-785-107. El estudio consistirá de la aplicación de un cuestionario para evaluar las características de su enfermedad, la gravedad de sus síntomas nasales, un cuestionario de exposición de factores ambientales, una evaluación con un aparato que se coloca sobre la nariz, un raspado dentro de la nariz y la obtención de dos muestras de orina.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en la aplicación de un cuestionario para evaluar las características de mi enfermedad, de la gravedad de los síntomas en una sola ocasión, un cuestionario para evaluar la exposición de factores ambientales, la medición con un aparato por la nariz del grado de la nariz tapada, un pequeño raspado de la nariz para obtener células (que aunque no se ha documentado alguna complicación en niños con rinitis alérgica, podría existir una remota posibilidad de un escaso sangrado en la nariz, por lo cual se realizarán las medidas necesarias para su prevención y tratamiento) y dos muestras de orina.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en éste estudio, aunque no se han registrado efectos que dañen la nariz con los estudios que se realizarán, aún así, estaré pendiente y en contacto con el investigador Dra. B. Montaña V. (52784848 clave 5591159248) y Dra. K. Jáuregui R. (radiocalizador 51290602) ante la presencia de cualquier molestia.

El investigador principal se ha comprometido a darme la información oportuna sobre cualquier procedimiento, para responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma  
del paciente

\_\_\_\_\_  
Dra. B. Beatriz Montaña Velázquez  
Investigador principal

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo

**ANEXO 2. DIAGNOSTICO DE RINITIS ALERGICA PERSISTENTE**

Nombre	_____	Edad	_____
No. de filiación	_____	Sexo	_____
Evolución de la enfermedad	_____	Peso	_____
		Talla	_____

Evaluación diagnóstica de rinitis alérgica persistente del Servicio de Alergia e Inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS.

1. Historia clínica:
  - a. Interrogatorio: Presencia de obstrucción nasal, prurito, rinorrea y estornudos; prurito ótico, en paladar y faringe.
  - b. Exploración física: Presencia de ojeras alérgicas, líneas de Dennie-Morgan, salud alérgico, cornetes hipertróficos, edematosos o azulados, mucosa nasal pálida, congestiva, secreción hialina. Puede existir hipertrofia adenoamigdalina y tejido linfoide de la orofaringe.
2. Clasificación de rinitis alérgica Persistente o Intermitente (OMS).
  - a. Persistente: los síntomas se presentan: a) por más de 4 días a la semana y b) o todo el mes. Además se subdivide en leve o moderada-severa según la afección de la calidad de vida del paciente, es leve si no hay a) alteraciones del sueño, b) deterioro de las actividades diarias, horas libres o deportes, c) deterioro en la escuela o el trabajo y d) síntomas molestos; es moderada-severa si están presentes uno o más de los síntomas anteriores<sup>4,5</sup>.
  - b. Intermitente: los síntomas se presentan a) por menos de 4 días a la semana y b) por menos de 4 semanas y también se subdivide en leve o moderada-severa.
3. Laboratorio: eosinófilos en moco nasal >10%, eosinofilia en la biometría hemática >10%, puede encontrarse aumento en la concentración de IgE total como punto de corte en menores de 12 años de >100 UI/mL y en mayores de 12 años de > 200 UI/mL. Otros exámenes que se realizan son para excluir parasitosis como: examen general de orina y coproparasitoscópico x 3.
4. Exámenes de gabinete como radiografía de senos paranasales para descartar proceso infeccioso crónico de dicha región y de tórax.
5. Pruebas cutáneas: Se realiza con el método de punción (prick) utilizando un panel de alergenos (cuadro 1). Se aplican los alergenos en el antebrazo con soluciones glicerizadas al 50% a una concentración de 1:20 p/v y como testigo positivo de histamina 0.1 mL a la dilución de 1:1,000 y un control negativo con 0.1 mL de solución de Evans, ambos testigos en soluciones glicerizadas al 50%. La prueba cutánea se considera positiva si el diámetro de la pápula formada es igual o mayor al diámetro del control de la histamina. El diámetro promedio de la pápula formada a los 15 minutos de aplicado el alérgeno se calcula con la fórmula (A+B)/2. Se considerará como persistente si los alergenos positivos incluyen principalmente a: polvo casero, Dermatophagoides pt, gato, perro, plumas, algodón, cucaracha y hongos.



Cuadro 1. Panel de alérgenos

Pólenes	Hongos	Inhalables
<i>Ulmus</i>	<i>Aspergillus f</i>	Polvo casero
<i>Amaranthus pt</i>	<i>Alternaria a</i>	<i>Dermatophagoides sp</i>
<i>Ambrosia e</i>	<i>Absidia</i>	Gato
<i>Ambrosia t</i>	<i>Candida a</i>	Perro
<i>Artemisa v</i>	<i>Cephalosporium</i>	Plumas
<i>Capriola d</i>	<i>Fusarium</i>	Algodón
<i>Cosmos b</i>	<i>Helmintosporium</i>	
<i>Chenopodium a</i>	<i>Hormodendrium</i>	
<i>Fraxinus a</i>	<i>Mucor</i>	
<i>Helianthus a</i>	<i>Monilia</i>	
<i>Holcus h</i>	<i>Penicilium</i>	
<i>Ligustrum v</i>		
<i>Lolium p</i>		
<i>Zea m</i>		
<i>Plantago l</i>		
<i>Rumex</i>		
<i>Salsola p</i>		
<i>Schinus m</i>		

TESTIGOS:

HISTAMINA: \_\_\_\_\_ EVANS: \_\_\_\_\_

DERMOGRAFISMO: (+) (-)

R=PROMEDIO DE LA ROCHA EN mm

E=PROMEDIO DEL ERITEMA EN mm

RT=PROMEDIO DE LA REACCION TARDIA, ROCHA EN m

**ANEXO 3. INSTRUMENTO DE MEDICION DE SINTOMAS NASALES**

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
 No. de filiación \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
 Evolución de la enfermedad \_\_\_\_\_  
 Domicilio \_\_\_\_\_  
 Teléfono \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Leer con atención las preguntas que se señalan a continuación, interrogue los síntomas que se presentan en el día de la realización de la entrevista, señalando con una "X" en el cuadro correspondiente la respuesta.

	<b>Severidad</b>			
Síntomas	0 Ninguna	1 Leve	2 Moderada	3 Severa
¿Dificultad para respirar a través de la nariz?*	<i>Ninguna</i>	<i>Leve</i>	<i>Difícil</i>	<i>Muy difícil o imposible</i>
¿Con qué frecuencia tiene comezón en la nariz?	<i>Ninguna</i>	<i>Ocasional</i>	<i>Frecuente</i>	<i>Persistente o todo el día</i>
¿Cuánto moco escurre por la nariz?	<i>Ninguna</i>	<i>Ocasional</i>	<i>Frecuente</i>	<i>Persistente o todo el día</i>
¿Cuántas veces en el día ocurren estornudos?***	<i>0</i>	<i>1 a 4</i>	<i>5 a 9</i>	<i>Igual o mayor a 10</i>

**Nota:** \*Ninguna, obstrucción nasal que permite respirar a través de la nariz sin necesidad de abrir la boca. Leve, aunque hay dificultad para respirar por la nariz no hay necesidad de abrir la boca. Difícil, ocasionalmente necesita respirar con la boca abierta. Muy difícil o imposible, tiene que respirar todo el tiempo con la boca abierta. \*\*\*Los estornudos que ocurren en un día; varios estornudos continuos se consideran como un solo episodio.

Total \_\_\_\_\_

Fuente:

1. Montaña VBB, Jáuregui-Renaud K, Campillo Navarrete RM, et al. Evaluation of a questionnaire for measuring nasal symptoms in subjects with allergic rhinitis. Rev Alerg Mex 2003;50:17-21.

2. Modificado de Corren J, Harris AG, Aaronson D, et al. Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma. J Allergy Clin Immunol 1997;100:781-8.

## ANEXO 4. CUESTIONARIO SOBRE CONSUMO DE TABACO.

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Instrucciones. Para cada pregunta del cuestionario selecciona la respuesta a y marque la opción correspondiente, rellene completamente con un círculo su respuesta.

Ejemplo:

¿Qué zona geográfica se caracteriza por la escasa vegetación y muy altas temperaturas?

Respuesta correcta

- A. Selva
- B. bosque tropical
- C. desierto
- D. círculo polar

1. ¿Alguna vez has probado cigarros, aunque sólo hayas aspirado una o dos veces?

- A) Si
- B) No

2. ¿Cuántos años tenías cuando probaste fumar por primera vez?

- A) Nunca he fumado cigarros
- B) 10 años o menos
- C) 11 años de edad
- D) 12 años de edad
- E) 13 años de edad
- F) 14 años de edad
- G) 15 años de edad
- H) 16 años o más

SI TU RESPUESTA ES "NUNCA HE FUMADO CIGARROS" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA NUMERO 11.

3. Cuando fumaste por primera vez ¿cuál fue la razón por que lo hiciste?

- A) Por curiosidad
- B) Por que me presionaron mis amigos
- C) Para sentirme parte de un grupo
- D) Para parecer de más edad
- E) Para tener más personalidad
- F) Porque ya tengo edad suficiente para hacerlo
- G) Otra

4. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿cuántos días fumaste cigarros?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 5 días
- D) 6 a 9 días
- F) 20 a 29 días
- G) cada día los 30 días

5. Durante los pasados 30 días (un mes), los días en que fumaste, ¿cuántos cigarros fumaste?

- A) No fumé cigarros durante los pasados 30 días (un mes).
- B) Menos de un cigarro por día
- C) 1 cigarro por día
- D) 2 a 5 cigarros por día
- E) 6 a 10 cigarros por día
- F) 11 a 20 cigarros por día
- G) Más de 20 cigarros por día

6. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿qué marca de cigarros fumaste con mayor frecuencia? (SELECCIONAR UNA SOLA RESPUESTA)

- A) No fumé cigarros durante los pasados 30 días (un mes)
- B) Ninguna marca especial
- C) Marlboro
- D) Broadway
- E) Boots
- F) Montana
- G) Camel
- H) Otra marca nacional, ¿cuál? \_\_\_\_\_

7. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿alguna vez utilizaste tabaco en otra forma que no fueran cigarros? (por ejemplo: tabaco para masticar, aspirar, puros, pipa, cigarros pequeños, chicles de nicotina)

- A) Sí
- B) No

8. ¿Cuál es el lugar donde principalmente fumas? (marca una sola respuesta)

- A) No fumo cigarros
- B) En casa
- C) En el colegio/ escuela
- D) En el trabajo
- E) En casa de amigos
- F) En fiestas y reuniones sociales
- G) En lugares públicos (por ejemplo: parques, en la calle, en centros comerciales, etc)
- H) En otros lugares

9. ¿Alguna vez fumas ó tienes ganas de fumar inmediatamente cuando te levantas en la mañana?

- A) Nunca fumé cigarro
- B) He dejado el cigarro
- C) No, no fumo ni me dan ganas de fumar inmediatamente al levantarme en la mañana
- D) Sí, algunas veces fumo o me dan ganas de fumar al levantarme en la mañana
- E) Sí, siempre fumo o tengo ganas de fumar al levantarme en la mañana

10. En los pasados 2 días ¿fumaste cigarros?

- A) No fumé cigarros durante los pasados 2 días (ayer o anteayer).
- B) Menos de un cigarro por día
- C) 1 cigarro por día
- D) 2 a 5 cigarros por día
- E) 6 a 10 cigarros por día
- F) 11 a 20 cigarros por día
- G) Más de 20 cigarros por día

11. Durante los pasados 7 días ¿cuántos días fumó alguien en tu presencia estando en tu casa?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 4 días
- D) 5 a 6 días
- E) 7 días

12. Durante los pasados 2 días ¿fumó alguien en tu presencia estando en tu casa?

- A) SI
- B) NO

13. Durante los pasados 7 días ¿cuántos días fumó alguien en tu presencia estando fuera de tu casa?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 4 días
- D) 5 a 6 días
- E) 7 días

14. Durante los pasados 2 días ¿fumó alguien en tu presencia estando fuera de tu casa?

- A) SI
- B) NO

15. ¿Alguno de tus mejores amigos o amigas fuma?

- A) Ninguno de ellos
- B) Alguno de ellos
- C) La mayoría de ellos
- D) Todos ellos

16. ¿tus padres (o padrastro, o madrastra, o tutores) fuman?

- A) Ninguno de ellos
- B) Los dos
- C) Solo mi papá (padrastro o tutor)
- D) Solo mi mamá (madrastra o tutora)
- E) No sé

## ANEXO 5. "International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)". Adolescentes.

Estamos muy agradecidos por tu participación en este importante estudio relacionado con tu salud. Toda la información que nos proporciones será confidencial. Por favor, contesta las preguntas lo mejor que te sea posible. Muchas gracias por tu colaboración.

No. de Folio: \_\_\_\_\_  
 Tel: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_  
 Fecha de entrevista: \_\_\_\_\_  
 Nombre completo del participante \_\_\_\_\_

1. ¿Alguna vez has tenido estornudos, o la nariz mormada, o mucosidad cuando NO tuvieras catarro o gripe?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

2. ¿Alguna vez, ¿has tenido estornudos, o la nariz mormada, o mucosidad cuando NO tuvieras catarro o gripe?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 6

3. En los últimos 12 meses, ¿este problema nasal estuvo acompañado de lagrimeo y comezón en los ojos?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 6

4. ¿En cuáles de los últimos 12 meses se presentó este problema nasal?  
 (Señala todos los meses en que se tuvo problemas).

_____ Enero	_____ Mayo	_____ Septiembre
_____ Febrero	_____ Junio	_____ Octubre
_____ Marzo	_____ Julio	_____ Noviembre
_____ Abril	_____ Agosto	_____ Diciembre

5. En los últimos 12 meses, ¿en que medida interfirió este problema nasal con tus actividades diarias?

\_\_\_\_\_ Nada

\_\_\_\_\_ Un poco

\_\_\_\_\_ Moderadamente

\_\_\_\_\_ Mucho

6. ¿Alguna vez has tenido rinitis alérgica?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

7. ¿Alguna vez has tenido erupciones cutáneas (ronchas) con comezón, que se presentaran y desapareciera durante por lo menos seis meses?

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 13

8. ¿Has tenido erupciones cutáneas con comezón en algún momento en los últimos 12 meses?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 13

9. ¿En algún momento, estas erupciones cutáneas con comezón afectó algunos de los siguientes lugares?:

\_\_\_\_\_ El pliegue de los codos, parte posterior de las rodillas,  
 \_\_\_\_\_ parte anterior de los tobillos, por debajo de los glúteos,  
 \_\_\_\_\_ o alrededor del cuello, orejas y ojos

10. ¿A qué edad se presentaron las erupciones cutáneas con comezón por primera vez?

\_\_\_\_\_ Antes de los 2 años

\_\_\_\_\_ Entre los 2 y 4 años

\_\_\_\_\_ A los 5 años o posteriormente

11. ¿En algún momento, estas erupciones cutáneas desaparecieron completamente en los últimos 12 meses?

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

12. En los últimos 12 meses, ¿con qué frecuencia, en promedio, no has podido dormir, debido a estas erupciones cutáneas con comezón?

\_\_\_\_\_ Nunca en los últimos 12 meses

\_\_\_\_\_ Menos de una noche por semana

\_\_\_\_\_ Una o más noches por semana

13. ¿Alguna vez has padecido eczema

\_\_\_ Si

\_\_\_ No

14. ¿Cuál es el año de estudios más alto que completó tu mamá?

\_\_\_\_\_ Primaria (hasta el 6to año)

\_\_\_\_\_ Secundaria o Educación Media (hasta el 9no año)

\_\_\_\_\_ Preparatoria (hasta 12do año)

\_\_\_\_\_ Superior (Universidad)

\_\_\_\_\_ Ninguna

\_\_\_\_\_ No se

15. Ocupación de tu mamá:

\_\_\_\_\_

16. ¿Cuál es el año de estudios más alto que completó tu papá?

\_\_\_\_\_ Primaria (hasta el 6to año)

\_\_\_\_\_ Secundaria o Educación Media (hasta el 9no año)

\_\_\_\_\_ Preparatoria (hasta 12do año)

\_\_\_\_\_ Superior (Universidad)

\_\_\_\_\_ Ninguno

\_\_\_\_\_ No se

17 Ocupación de tu papá:

---

18 ¿Cuántos hermanos o hermanas tienes que sean de una edad mayor? \_\_\_\_\_

19 ¿Cuántos hermanos o hermanas tienes que sean de una edad menor? \_\_\_\_\_

20 ¿Cuántos adultos (de 18 años o más) viven en tu casa? \_\_\_\_\_

21 ¿Cuántos niños o adolescentes (menores de 18 años) viven en tu casa? \_\_\_\_\_

22 ¿Cuántas recámaras hay en tu casa?

---

23 ¿Duermes solo en un cuarto?

\_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No  
 \_\_\_\_\_ No sabe

24 Si no es así, ¿Cuántas personas duermen contigo?

---

25 ¿Alguna vez un médico le ha dicho que algún miembro de tu familia tiene asma?  
 (marque todos los casos que correspondan)

\_\_\_\_\_ A tu mamá  
 \_\_\_\_\_ A tu papá  
 \_\_\_\_\_ A un hermano(a)  
 \_\_\_\_\_ A nadie de la familia  
 \_\_\_\_\_ No sabe

26 ¿Alguna vez un médico le ha dicho que algún miembro de tu familia tiene conjuntivitis?

\_\_\_\_\_ A tu mamá  
 \_\_\_\_\_ A tu papá  
 \_\_\_\_\_ A un hermano(a)  
 \_\_\_\_\_ A nadie de la familia  
 \_\_\_\_\_ No se

27 ¿Alguna vez un médico ha dicho que algún miembro de tu familia tiene rinitis alérgica?

\_\_\_\_\_ A tu mamá  
 \_\_\_\_\_ A tu papá  
 \_\_\_\_\_ A un hermano(a)  
 \_\_\_\_\_ A nadie de la familia  
 \_\_\_\_\_ No se

28 ¿Fumas actualmente?

\_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No (pase a la pregunta 29)

28. En caso afirmativo, ¿cuántos cigarrillos al día fumas?

\_\_\_\_\_ Menos de 3  
 \_\_\_\_\_ De 3 a 10  
 \_\_\_\_\_ De 11 a 20  
 \_\_\_\_\_ Más de 20  
 \_\_\_\_\_ No se



29 ¿Sabes si tu mamá fumaba cuando estaba embarazada?

- Si  
 No (Pase a la pregunta 31)  
 No se (Pase a la pregunta 31)

30 En caso afirmativo, ¿cuántos cigarros al día se fumaban?

- De 1 a 9  
 De 10 a 29  
 De 35 a 59  
 60 o más  
 No se

31 ¿Actualmente hay personas que fuman en tu casa?

- Si (especifique quién (es) a. \_\_\_\_\_  
b. \_\_\_\_\_  
c. \_\_\_\_\_  
 No (Fin de cuestionario)  
 No se (Fin de cuestionario)

32 En caso afirmativo, ¿Actualmente, cuántos cigarros se fuman por día en tu casa?

- Menos de 3  
 De 3 a 10  
 De 11 a 20  
 Más de 20  
 No se

## “International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)” Niños.

Estamos muy agradecidos por su participación en este importante estudio relacionado con la salud de su hijo(a). Toda la información que usted nos proporcione será confidencial. Por favor, conteste las preguntas lo mejor que le sea posible. Muchas gracias por su colaboración.

No. de Folio: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha de entrevista: \_\_\_\_\_

Nombre completo de la persona que responde \_\_\_\_\_

Nombre del Niño(a) participante \_\_\_\_\_

Parentesco con el niño(a):

\_\_\_\_\_ Madre  
 \_\_\_\_\_ Padre  
 \_\_\_\_\_ Tutor  
 \_\_\_\_\_ Otro (especifique) \_\_\_\_\_

1 ¿Alguna vez le ha silbado el pecho a su niño(a) o ha padecido dificultades para respirar? \_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No

2 ¿Alguna vez su niño(a) ha tenido estornudos, o la nariz mormada, o mucosidad cuando NO tuviera catarro o gripe? \_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No

SI LA RESPUESTA ES “NO” FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 7

3 En los últimos 12 meses, ¿su niño(a) ha tenido estornudos, o la nariz mormada, o mucosidad cuando NO tuviera catarro o gripe? \_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No

SI LA RESPUESTA ES “NO” FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 7

4 En los últimos 12 meses, ¿este problema nasal estuvo acompañado de lagrimeo y comezón en los ojos? \_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No

5 ¿En cuáles de los últimos 12 meses se presentó este problema nasal? (Señale todos los meses que tuvo problemas).

_____ Enero	_____ Mayo	_____ Septiembre
_____ Febrero	_____ Junio	_____ Octubre
_____ Marzo	_____ Julio	_____ Noviembre
_____ Abril	_____ Agosto	_____ Diciembre

6 En los últimos 12 meses, ¿en qué medida interfirió este problema nasal con las actividades diarias de su niño(a)?

\_\_\_\_\_ Nada  
 \_\_\_\_\_ Un poco  
 \_\_\_\_\_ Moderadamente  
 \_\_\_\_\_ Mucho

7 Alguna vez su niño(a) ha tenido rinitis alérgica?  
 Si  
 No

8 ¿Alguna vez su niño(a) ha tenido erupción cutánea con comezón, que se presentara y desapareciera durante por lo menos seis meses?  
 Si  
 No

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 14

9 ¿Su niño(a) ha tenido esta erupción cutánea con comezón en algún momento en los últimos 12 meses?  
 Si  
 No

SI LA RESPUESTA ES "NO" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA 14

10 ¿En algún momento, esta erupción cutánea con comezón afectó algunos de los siguientes lugares?  
 El pliegue de los codos, parte posterior de las rodillas,  
 parte anterior de los tobillos, por debajo de los glúteos,  
 o alrededor del cuello, orejas y ojos

11 A qué edad se presentó esta erupción cutánea con comezón por primera vez?  
 Antes de los 2 años  
 Entre los 2 y 4 años  
 A los 5 años y posteriormente

12 *En algún momento, esta erupción cutánea ha desaparecido completamente en los últimos 12 meses?*  
 Si  
 No

13 En los últimos 12 meses, ¿con qué frecuencia, en promedio, no ha podido dormir su niño(a), debido a esta erupción cutánea con comezón?  
 Nunca en los últimos 12 meses  
 Menos de una noche por semana  
 Una o más noches por semana

14 ¿Alguna vez su niño(a) ha padecido eczema?  
 Si  
 No

15 ¿Cuál es el año de estudios más alto que completó la mamá del niño(a)?

- \_\_\_\_\_ Primaria (hasta el 6to año)  
 \_\_\_\_\_ Secundaria o Educación Media (hasta el 9no año)  
 \_\_\_\_\_ Preparatoria (hasta 12do año)  
 \_\_\_\_\_ Superior (Universidad)  
 \_\_\_\_\_ Ninguna  
 \_\_\_\_\_ No sabe

16 Ocupación de la mamá:

---

17 ¿Cuál es el año de estudios más alto que completó el papá del niño(a)?

- \_\_\_\_\_ Primaria (hasta el 6to año)  
 \_\_\_\_\_ Secundaria o Educación Media (hasta el 9no año)  
 \_\_\_\_\_ Preparatoria (hasta 12do año)  
 \_\_\_\_\_ Superior (Universidad)  
 \_\_\_\_\_ Ninguna  
 \_\_\_\_\_ No sabe

18 Ocupación de el papá:

---

19 ¿Cuántos hermanos o hermanas tiene su niño que sean de una edad mayor? \_\_\_\_\_

20 ¿Cuántos hermanos o hermanas tiene su niño que sean de una edad menor? \_\_\_\_\_

21 ¿Cuántos adultos (de 18 años o más) viven en su casa? \_\_\_\_\_

22 ¿Cuántos niños o adolescentes (menores de 18 años) viven en su casa? \_\_\_\_\_

23 ¿Cuántas recámaras hay en su casa?

---

24 ¿Su niño(a) duerme él sólo en un cuarto?

- \_\_\_\_\_ Si  
 \_\_\_\_\_ No  
 \_\_\_\_\_ No sabe

25 Si no es así, ¿Cuántas personas duermen con el niño(a)?

---

26 ¿Alguna vez un médico le ha dicho que algún miembro de la familia tiene asma?  
 (marque todos los casos que correspondan)

- \_\_\_\_\_ A la mamá del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ Al papá del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ A un hermano(a) del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ A nadie de la familia  
 \_\_\_\_\_ No sabe

27 ¿Alguna vez un médico le ha dicho que algún miembro de la familia tiene conjuntivitis?

- \_\_\_\_\_ A la mamá del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ Al papá del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ A un hermano(a) del niño(a)  
 \_\_\_\_\_ A nadie de la familia  
 \_\_\_\_\_ No sabe

28 ¿Alguna vez un médico le ha dicho que algún miembro de la familia tiene rinitis alérgica?

- A la mamá del niño(a)  
 Al papá del niño(a)  
 A un hermano(a) del niño(a)  
 A nadie de la familia  
 No sabe

29 ¿Fumaba tabaco la mamá durante el embarazo del niño(a)?

- Si  
 No (Pase a la pregunta 31)  
 No sabe (Pase a la pregunta 31)

30 En caso afirmativo, ¿cuántos cigarros al día fumaba durante el embarazo?

- Menos de 3  
 De 3 a 10  
 De 11 a 20  
 Más de 20  
 No sabe

31 ¿Se fumaba tabaco en el hogar durante el primer año de vida de este niño(a)?

- Si  
 No (Pase a la pregunta 33)  
 No sabe (Pase a la pregunta 33)

32 En caso afirmativo, cuántos cigarros por día se fumaban en la casa durante el primer año de vida de este niño(a)?

- De 1 a 9  
 De 10 a 29  
 De 35 a 59  
 60 o más

33 ¿Actualmente hay personas en la casa que fuman en presencia del niño(a)?

- Si (especifique quién(es) a. \_\_\_\_\_  
 b. \_\_\_\_\_  
 c. \_\_\_\_\_

- No (Fin de cuestionario)  
 No sabe (Fin de cuestionario)

34 En caso afirmativo, ¿Actualmente, cuántos cigarros se fuman por día en la casa en presencia del niño(a)?

- Menos de 3  
 3 a 10  
 11 a 20  
 Más de 20  
 No sabe