



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Asociación de polimorfismos de un solo nucleótido asociados a enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina en pacientes mestizos mexicanos. Estudio replicativo utilizando la estrategia de gen candidato

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M en C. GANDHI FERNANDO PAVÓN ROMERO

TUTORES PRINCIPALES
Dr. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ
Departamento de Inmunogenética y Alergia.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Dr. RAMCÉS FALFAN VALENCIA
Laboratorio HLA.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Ciudad de México, noviembre 2018



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.

Agradecimientos.

La presente tesis se realizó gracias al apoyo del Programa de Postgrado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud; de la Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Medicina Campus CU, UNAM) así también a los departamentos de Inmunogenética y Alergia dirigido por el Dr. Luis Manuel Terán Juárez y el Laboratorio de HLA a cargo del Dr. Ramcés Falfan Valencia.

Agradezco el apoyo financiero brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de beca 356659.

Índice

Sección	Página
Marco Teórico	4
Antecedentes	8
Planteamiento del problema	28
Justificación	29
Objetivo	30
Materiales y métodos	31
Resultados	42
Discusión	60
Bibliografía	71

I. Marco Teórico.

A. La Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina

En 1968 Ray Beer y Max Samter estudian a una población de pacientes con asma y poliposis nasal que exacerbaban sus síntomas posteriores a la ingesta de analgésicos no esteroideos (AINEs), principalmente al ácido acetil salicílico (AAS), estableciendo las características clínico-epidemiológicas de lo que hoy se conoce como enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina (EREA), (1) entidad caracterizada por rinosinusitis crónica con poliposis nasal, asma e hipersensibilidad o intolerancia a la aspirina (IA).(2)La prevalencia de la EREA varía dependiendo de la fuente consultada; se estima que el 7% de los pacientes con asma la padecen e incrementa al 21% cuando las pruebas de provocación son utilizadas para su diagnóstico.(3)

En 1975 A. Szczeklik propone las bases del mecanismo fisiopatológico de la EREA, el cual involucra la inhibición farmacológica de los AINEs en la enzima ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1),(4) mediante su fijación en el aminoácido arginina 120 y posterior acetilación de la serina en la posición 529(5)lo que induce al desvío metabólico del ácido araquidónico (AA) hacia la vía de la lipooxigenasa cuyo producto de síntesis final es la formación de leucotrienos (LT); en esta vía el AA se convierte a ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico y leucotrieno A4 por ALOX5 o la 5-lipoxigenasa (5-LO) y por su cofactor proteína activadora 5-lipoxigenasa (ALOX5AP y FLAP). El LTA4 sintetizado, se transforma en LTB4 por LTA4 hidrolasa (LTA4H) y posteriormente es conjugado por la leucotrieno C4 sintasa (LTC4S) calcio-dependiente para formar LTC4, proteína que se caracteriza por contener varias cadenas de aminoácidos en su región terminal, la cual puede ser degradada por proteínas citoplasmáticas, modificando la conformación de la proteína transformándola a LTD4 y LTE4. (6)

Las actividades biológicas de los LT solo se ejercen como consecuencia de la unión a sus receptores específicos (receptor de cisteinil leucotrieno tipo 1 y 2 -CYSLTR1, CYSLTR2- y P2Y) de siete dominios transmembranales asociados a proteínas G, localizados en la superficie de eosinófilos y mastocitos principalmente; sus funciones consisten en inducir broncoconstricción, aumentar la permeabilidad vascular, incrementar la secreción de moco, ejercer función de factor quimiotáctico para eosinófilos y contribuir en la hipertrofia de músculo liso con la deposición de colágeno en la pared bronquial.(7)

Sin embargo, en los últimos años se han descrito nuevos mecanismos que participan a diferentes niveles que involucran mediadores de las dos principales vías metabólicas del AA e inclusive se evidencia la intervención de componentes inmunológicos externos a este proceso; ejemplo de ello es el bloqueo de COX-1, que conlleva a la disminución de prostaglandinas (PG) en especial de PGE2, y consecuentemente evita su acoplamiento a sus receptores específicos EP2 y EP4(8)(9) en condiciones basales este proceso activa la transducción de señales dependientes de AMP cíclico lo que induce la síntesis de COX2, favoreciendo la retroalimentación positiva que tiene como objetivo el incremento de esta PG,(10) esencial para el bloqueo de la enzima ALOX5(11); otras investigaciones han demostrado que el eje IL1B-IL1R en fibroblastos es capaz de activar a COX-2 induciendo la síntesis de PGE2, incrementado el número de receptores de IL (interleucina-IL) IL1, proceso que favorece el ciclo anti-inflamatorio antes descrito.(12)

Con respecto al segundo apartado, se ha establecido la asociación de los mecanismos fisiopatológicos de la EREA con el daño epitelial, aunque no es un mecanismo propio de esta enfermedad, ya que se ha descrito en entidades como la dermatitis atópica, alergia alimentaria y otros endofenotipos de asma no dependientes del típico mecanismo mediado por la atopia. En este proceso existe daño epitelial por diferentes etiologías en la vía aérea, las células epiteliales inducen la síntesis de IL-33, IL-25 y linfopoyetina

estromal tímica (TSLP), que interactúan con sus receptores específicos IL1/ST2, receptor de IL-25 y TSLP localizada en las células linfoides innatas tipo 2 (ICL2), estirpe celular de linfocitos tipo Th2, en donde la vía de transcripción ROR α y GATA3 se activa e induce a la síntesis de IL-5 e IL-13 indispensables para el desarrollo y acción de eosinófilos, principal estirpe celular relacionada en el daño de los pacientes con EREA.(13)

Habitualmente la EREA se presenta en mujeres de la cuarta década de la vida, las primeras manifestaciones en detectarse son los síntomas característicos de rinitis (constipación, estornudos y rinorrea), posteriormente en un promedio de dos años se evidencian los síntomas de asma (tos seca, opresión torácica y disnea) y poliposis nasosinusal, siendo la congestión nasal y la hiposmia su sintomatología más típica; con respecto a la intolerancia a aspirina u otro analgésico no esteroideo, la aparición de este hallazgo es variable, se relaciona casi siempre como el factor más evidente de la enfermedad, usualmente asociado a eventos de broncoespasmo que ameritan atención hospitalaria y por la tanto sugerente del diagnóstico clínico. (6)

El diagnóstico confirmatorio se realiza a través de pruebas de provocación específica a AAS o AINES, mediante la introducción nasal e inhalada de estos medicamentos a dosis graduales, con posterior desarrollo de manifestaciones clínicas de la enfermedad y rasgos cuantitativos como: disminución del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁, >20%) y reducción del flujo nasal total (FNT, >40%) con respecto a valores basales de cada paciente.(14)

El tratamiento de esta entidad consiste en el control de las enfermedades que la componen, acogiéndose a las recomendaciones que estipulan guías como GINA (15) y EPOS (16), importante adición es la administración de los inhibidores de los leucotrienos(17) particularmente por su mecanismo de acción principal, el bloqueo de los receptores de CYSLTR1, además de otros demostrados a nivel molecular (disminución de

la actividad de 5-lipoxygenasa, inhibición de prostaglandina E sintetasa-1 microsomal, disminución de la migración y adhesión eosinofílica y disminución de la actividad de NFκB entre otros). (18) Una vertiente específica desarrollada por Stevensson desde 1982 ha sido la desensibilización, administración de dosis controladas de AAS, con el objetivo de tolerar el medicamento para el control de sus entidades sin que se presenten síntomas asociados a asma o rinitis, con este tratamiento se ha reportado disminución en la frecuencia de eventos de sinusitis, disminución en el uso de esteroides sistémicos y mejoría del olfato.(19)

Hasta el momento se desconoce el mecanismo de acción de este procedimiento terapéutico, sin embargo, se ha propuesto que puede inducir tres procesos inmunológicos: 1) inhibición de IL-4, esencial para la síntesis de CYSLTR1 en linfocitos T, B y eosinófilos; 2) disminución de PGD2 y 3) reducción en la síntesis de metaloproteasas, que actúan como factor quimiotáctico para eosinófilos y neutrófilos.(20)

La EREA actualmente es una enfermedad en la cual cada vez se identifican nuevos mecanismos fisiopatológicos y terapéuticos; en algunos casos, los estudios de asociación genética han contribuido a evidenciar y confirmar su participación como factor indispensable para su desarrollo.

II. Antecedentes

La predisposición genética, así como los mecanismos fisiopatológicos y terapéuticos en EREA no han sido definidos por completo(21), los estudios de asociación genética han evaluado diversos genes, (22) principalmente se han enfocado al estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), cambios de una base nitrogenada por otra y la combinación de los alelos mediante modelos de genotipos (co-dominante, dominante y recesivo), en genes implicados en la síntesis de leucotrienos y recientemente a otros mecanismos. En la presente sección se agruparán a los estudios en cuatro categorías: 1) SNP implicados en el metabolismo del AA, 2)HLA, 3) factores de transcripción, 4)inflamación, 5) receptores y 6) enfermedades con mecanismos compartidos.

A. SNP asociados a metabolismo de ácido araquidónico

a) LTC4 sintasa

LTC4 sintasa está codificada por el gen *LTC4S*, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35), tiene una extensión de aproximadamente 2.5 kilobases, contiene 5 exones(23); esta región también codifica para citocinas como el factor estimulante de granulocitos, IL-3, 4, 5, 9 y 13 además del receptor β adrenérgico. La función principal de la proteína LTC4S es la conversión de leucotrieno A4 a C4 (24). Este gen fue el primero en ser analizado en el contexto de la EREA en 1997 por Marek Sanak, quien analizó elSNP localizado en la posición -444 del gen en pacientes polacos con intolerancia a la aspirina, encontrando que la transversión adenina (A) por citosina (C) se encontraba asociado 3.89 veces más en esta clase de pacientes en comparación con sujetos control. (25)

En el año 2000, Van Sambeek replica la asociación del gen en 61 pacientes residentes en Estados Unidos de América con intolerancia a AAS (IA); el ensayo funcional demostró

que no existía participación del promotor para la expresión del gen, sin embargo, tiende a haber una mayor proporción de homocigotos del genotipo CC en pacientes con IA, (26) posteriormente, el grupo polaco reanaliza en el mismo año los resultados obtenidos por Sanak en 1997, reportando una similar proporción de sujetos portadores con la variable de riesgo C, además demostró a través de ensayos funcionales la participación de este alelo con el incremento en la actividad del promotor, así como con los niveles de RNA mensajero (RNAm) de *LTC4S* en eosinófilos sanguíneo se incremento de la síntesis de LTE_4 urinario posterior al reto con AINEs; aparentemente estos efectos atribuidos al alelo C son necesarios para la activación del factor de transcripción AP-2 y sucesivamente del factor 2 de transcripción de la histonaH4.(27) En 2002 Kawagishi analizó este gen en población japonesa (40 pacientes con IA y 100 pacientes con asma tolerante a la aspirina -ATA) y 110 sujetos control) describiendo similares resultados a los referidos por Sanak y Van Sambeek en cuanto a la distribución del genotipo homocigoto en los sujetos con IA con respecto a los pacientes con ATA, $p=0.042$ y realizó el análisis genético en modelo que describe como recesivo (AA vs. AC+CC) exclusivamente en aquellos pacientes con IA, reportando que los pacientes con participación del alelo C tenían una edad de presentación más temprana del asma y al igual que lo reportado por Sanak, también describió un aumento de la actividad del promotor.(28)

En 2004 Mary Anne-Kedda secuenció los cinco exones del *LTC4S* en 110 pacientes de Australia con antecedente IA, reportando la presencia de una variante antes no descrita en el intrón 1, a 10 pares de bases del exón 2 (en sentido 3'-5') y que solo se detectó en el 2% del total de la población evaluada, sin embargo, no presentó asociación. El mismo polimorfismo fue analizado en Corea por Jeong-Hee Choi sin que se reportara asociación con la enfermedad, sin embargo se reportó a través de análisis estratificados por variables

clínicas, que los pacientes con la variante de riesgo C usan un mayor número de esteroide sistémico que aquellos pacientes con el alelo A.(29)

La estrategia de asociar genes ha revelado que el SNP -444C de *LTC4* en combinación con el 2078 C>T en *CYSLTR2* se asoció con disminución del VEF₁ en el reto de lisinaspirina en modelo codominante y recesivo (p= 0.026 y p= 0.007). (30)

b) *ALOX5* y *ALOX5AP*

En 2004 se analizó en Corea el primer estudio de asociación genética en esa población, con ~100 pacientes con IA, se analizaron genes que participan en la síntesis de leucotrienos, entre ellos 4 polimorfismos en *ALOX5*, 1 en *ALOX5AP*, 4 en prostaglandina sintasa 2 (*PTGS2*), *COX2*, y 1 en *CYSLTR1*; sin embargo, no existió asociación entre los SNP de pacientes con IA vs. ATA a excepción de +1728A→G localizado en *ALOX5* en modelo codominante, el cual se encontró en menor proporción en pacientes con IA con respecto a sujetos control (p=0.04), sin embargo el resultado no soportó correcciones estadísticas; al analizar por haplotipos (ht), el ht de *ALOX5* (ht1[G-C-G-A]), este se encontraba en 94% de los pacientes con IA vs. 82.3% de ATA, p=0.01, OR=5.0, IC95% (1.54-17.9) y 90% de los sujetos control p=0.03, (OR=4.5, IC95% 1.1–18.4) probablemente siendo el primer estudio en reportar asociación mediante esta estrategia de análisis.(29)

Al año siguiente se analizó por parte de este grupo de investigación la evaluación de polimorfismos de repetidos en *tándem* de *ALOX5* y *ALOX5AP* (repetidos de GGGCGGy series del mononucleótido A respectivamente), describiendo que en población coreana se encontraban 6 y 23 repeticiones de cada uno y a pesar que no existió un *tándem* en específico asociado a IA en comparación con ATA o controles, se evidenció que la presencia del repetido de *ALOX5* es 5 veces menor en población coreana que en poblaciones caucásicas y que a su vez presentaba asociación con la reducción de la función pulmonar con respecto a la variante común.(31)

c) *EP2*

Nobuyoshi Jinnai en Japón analizó 370 SNP provenientes de un pool conformado por 833 SNP en 63 genes candidato, seleccionados en base a su desequilibrio de ligamiento y frecuencia alélica, para subsecuentemente ser probados en 198 pacientes con IA, el análisis de permutaciones demostraron resultados estadísticamente débiles, a excepción de 77 SNP del gen *EP2*, que codifica para el receptor de PGE2, siendo el SNP uS7 (-10814,T/A) y uS5 (-12813 G/A), localizados en la región de promotor, los únicos capaces de establecer una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó vs. ATA ($p=0.0025$, 0.0017) y control ($p=0.039$, 0.0016),⁽³²⁾ el haplotipo en conjunto con otros SNP como S1/S3/S6/S8, también demostró asociación ($p=0.0001$); sugiriendo que estos SNP son capaces de activar factores de transcripción como STAT1, reduciendo los niveles de expresión de *EP2*.

c) *TBXA2*

Otros agentes relacionados con la fisiopatogenia de la EREA son los tromboxanos (TBX), los cuales inducen broncoconstricción previa interacción con su receptor *TBXA2R*; en base a esta premisa, Kim en 2005, analizó los SNP *TBXA2R* +924T>C y +795T>C siendo el genotipo CC asociado en el modelo codominante ($p=0.03$), el análisis del haplotipo de las variantes menores (C-C) se encontraba en proporción más frecuente en los pacientes con IA (16% vs. 11%). Es el primer estudio en evaluar la interacción gen-gen en esta enfermedad, específicamente con *HLA-DPB1*0301* y *TBXA2R* +795T>C, además de *ALOX5* +21T con *TBXA2R* +924 T>C ($p=0.008$, OR=5.3 y $p=0.007$, OR=3.7, respectivamente) ambos en modelos recesivos. ⁽³³⁾ En 2012 se revaloró en población coreana por Kohyama y la presencia del genotipo CC+CT vs. TT fue 1.07 veces más frecuentes en pacientes con EREA ($p=0.015$) y mantuvo la asociación entre mujeres con la entidad ($p=0.013$, OR=1.96) pero no existió relación con otra variable clínica.⁽³⁴⁾

d) **CYSLTR2**

CYSLTR2 se encuentra localizado en el cromosoma 13q14.2-21.1, el gen fue analizado previa secuenciación por Jong Sook Park en Corea en un grupo de pacientes con IA, el análisis reveló 4 SNP candidatos: uno localizado en región 5'-UTR (-819 T>G), 2 en 3'-UTR (2078 C>T y 2534 A>G) y uno en promotor +297 A>G, las frecuencias de los alelos menores se encontraban en mayor proporción en comparación con la de otros grupos poblacionales (afroamericanos y caucásicos), los tres primeros se asociaron al riesgo al comparar los genotipos por modelos co-dominantes con IA vs.ATA [p=0.031, OR=2.04 e IC95% (1.06-3.85)], [p=0.013, OR=2.26 e IC95%(1.19-4.40)] y [p=0.031, OR=2.02 e IC95% (1.07-3.84)].(30)

e) **CRTH2**

La prostaglandina D2 (PGD2) es un prostanoide sintetizado por mastocitos posterior a la exposición a alérgenos, mediador importante en la patogénesis de la inflamación de las vías respiratorias a través del receptor, molécula quimioatrayente expresada en células Th2 (CRTH2). El gen *CRTH2* codifica una proteína G acoplada al receptor quimioatrayente que se expresa en linfocitos Th2, incluyendo otras células relacionadas con la alergia, como eosinófilos, basófilos y monocitos, participa en la quimiotaxis de los linfocitos Th2, eosinófilos y basófilos por PGD2, ha sido asociada con el asma alérgica en personas de origen caucásico y chinos provenientes de Taiwán. Palikhe reportó en 2010 la asociación de 2 SNP de *CRTH2* (-466T→C y -129C→A), siendo la única asociación, la reportada para -466T→C, el cual se encontró en mayor frecuencia en el grupo de pacientes con EREA en comparación con los asmáticos (p=0.04), además de la asociación con los niveles de eotaxina al estratificar por genotipos (TT vs. CT y CC, p=0.046); también se observó una menor actividad del promotor en ensayos de luciferasa y niveles disminuidos de RNAm. (35) Este SNP fue validado en población coreana en

2011 por Kohyama, mediante regresión logística y el genotipo TT obtuvo una asociación positiva con la enfermedad $p=0.03$, $OR=1.61$, $IC95\%1.0-2.5$ así también se asoció con el género femenino [$p=0.016$, $OR= 1.71$, $IC95\% 1.01-2.90$].(34)

B. Genes relacionados con el sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA)

a) HLA clase II

En 1997 se reportó la presencia de antígenos de *HLA-DR* en la superficie de células inflamatorias presentes en tejido nasal,(36)Etelka en el 2000, analizó el *HLA* de pacientes con poliposis nasosinusal provenientes de Hungría y los comparó con 50 sujetos control, demostró que los pacientes portadores del alelo *HLA-DR7* tenían una probabilidad de presentar 2.5 veces más esta entidad y similar resultado se presentaban al analizar otros alelos (*DQA1*0201*, $OR=2.52$ y *DQB1*0202*, $OR=2.84$), el haplotipo conformado por estos alelos tuvo un $OR=2.5$; al estratificar los resultados entre aquellos pacientes con EREA estos alelos demostraron mayor significancia estadística. Esta misma investigación demostró que existían alelos de protección, *DQA1*0104* ($OR=0.16$) y *DQB1*0604* ($OR=0.24$). (37)

Seung-Woo Shin describió los hallazgos generados de la búsqueda de regiones exónicas (exm) mediante la técnica de GWAS donde se incluyeron 54,555 SNP reportando que el exm537513 en *HLA-DPB1* obtuvo una asociación con la EREA $p=3.46 \times 10^{-8}$ ($OR=3.28$), dato importante es que entre los principales SNP detectados, 6 se encontraban en la región *HLA* (*HLA-DPB1*, *HLA-DPA1* y *HLA-DPB2*) y la combinación de 4 de ellos (exm537513, exm537522, exm3097671 y exm3129294) tenían un valor de área debajo de la curva (AUC) de 0.629. Al reajustar la combinación de los 6 SNP para similares resultados, se obtuvo que 7 SNP (exm537513, exm83523, exm1884673, exm538564, exm2264237, exm396794 y exm791954;) presentaban un área bajo la curva (AUC) de

0.75 y tenían una sensibilidad de 34% con especificidad de 93% para discriminar entre EREA de los ATA con valor predictivo positivo del 77.1% y exactitud de 76%.(38)

Seung-Hyun Kim reportó los hallazgos de un estudio de genoma completo (GWAS) en 2014, dos SNP, rs3117230 y rs3128965 fueron asociados a EREA, ambos con alto desequilibrio de ligamiento ($D'=0.984$, $r^2=0.961$) este último SNP localizado en el locus *HLA-DPB1*, portar alguna de sus variantes menores (AG o AA) fue significativamente más prevalente en el grupo de pacientes con EREA en comparación con los pacientes con asma tolerantes a la aspirina y los controles ($p=0.001$, $p=0.002$, en modelo codominante respectivamente).(39)

En 2015 Esmailzadeh, evaluó a los genes *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*, demostró asociación estadística con *HLA-DQB1*0302*, (OR=2.90, IC95% 1.49-5.67), *HLA-DQB1*0302* (OR=5.49, IC95%2.40-12.59), *HLA-DRB1* (OR=2.94, IC95%1.61-5.36) y *HLA-DRB1*04* (OR=3.19, IC95% 1.57-6.47), se encontraban en mayor proporción en los pacientes con EREA en comparación con los controles y lo mismo sucedió con la combinación de sus haplotipos ($p<0.05$). Los ht de *HLA-DRB1*04 / DQA1*0301 / DQB1*0302* obtuvieron asociación con OR=4.25, IC95% 1.94-9.29 y *HLA-DRB1*07 / DQA1*0201 / DQB1*0201* OR=3.52, IC95%1.54-8.06.(40)

En ese mismo año se asoció a estos polimorfismos del HLA como predictores de la respuesta a desensibilización, partiendo de la evolución clínica de 16 pacientes, denotó que los pacientes con una respuesta satisfactoria (mejoría en la constipación y función pulmonar), tenían mayor frecuencia del *HLA-DQB1*0302* en comparación con el grupo de pacientes no respondedores al tratamiento farmacológico($p=0.022$, OR=0.12, IC95% 0.02-0.76), a pesar que el tamaño de muestra utilizado es considerablemente menor para los estudios clásicos de asociación genética, la tesis del autor propone que este polimorfismo

podiera ser un marcador genético predictor de respuesta farmacológica por los valores de sensibilidad (71.4%, IC95% 35.8-91.7) y especificidad (81.8%, IC95% 52.3-94.8).⁽⁴¹⁾

b) TAP1 y TAP2

Jeong-Hyum Kim asoció en 2012 los genes que codifican las proteínas transportadoras de antígeno TAP1 y TAP2, codificadas por genes en el cromosoma 6, anteriormente relacionadas con atopia e inmunodeficiencias.^(42,43) El estudio fue realizado en población coreana; basado en el HapMap se seleccionaron 12 SNP de TAP1 y 31 en TAP2, siendo el de este último gen con 7 SNP (de 31) [rs241437, rs241454, rs2857101, rs13501, rs2856993, rs2857103, rs2621321]; los que resultaron asociados ($p=0.04-0.002$, principalmente en modelo recesivo) y 2 haplotipos que incluyeron a los últimos 5 SNP asociados cuando se contrastó con un decremento en el VEF₁ durante el reto con aspirina.⁽⁴⁴⁾

c) TRIM26

TRIM26 (*tripartita motif-containing 26*), gen cercano a la región HLA, importante por poseer secuencias codificadoras para dedos de zinc y estar relacionados con interacciones proteicas; se analizó de manera exploratoria por Jin Son Lee en 2012; particularmente fue uno de los primeros estudios en analizar los hallazgos con otros procesos, como el relacionado con microRNA (miRNA), siendo el rs4711211 el que estuvo asociado con la EREA ($p=0.05$, OR=0.54, IC95% 0.30-1.00), mientras que los rs2072107 y rs2284165 lo estuvieron con el decremento de VEF₁ ($p<0.05$) en el reto con aspirina; sin embargo, los hallazgos no se han podido asociar de manera directa con ningún mecanismo fisiopatológico de la EREA, probablemente estén en relación con procesos de ubiquitinización ampliamente demostrados en padecimientos como el asma. ⁽⁴⁵⁾

d) ZNRD1

En 2012, C. Pasaje analizó el gen *ZNRD1* (*zinc ribbon domain containing 1*) que codifica para una proteína dedo de zinc, localizado en el cromosoma 6p21.3, región que contiene marcadores como el *HLA-DPB1*, asociado a esta enfermedad en pacientes coreanos, su importancia radica en que estas proteínas que catalizan la transcripción de DNA a RNA, motivo por el cual se le consideró blanco de estudio en EREA. 6 SNP fueron analizados y solo el rs1150740 mantuvo asociación al riesgo con EREA en modelo dominante ($p=0.03$, $OR=1.14$, $IC95\%1.14-10.16$) así también con decremento de la función pulmonar.(46)

C. Genes relacionados con factores de transcripción

a) CIITA

Joon Seol Bae en 2013 evaluó la participación del gen *CIITA*(*class II, major histocompatibility complex, transactivator*), factor esencial para la regulación de la transcripción de *HLA*, en población coreana, codificado en el cromosoma 16p13, debido a la participación de asma y poliposis componentes esenciales de la EREA; 18 SNP fueron evaluados, 2 SNP (rs12932187 y rs11074938) y 2 haplotipos (*CIITA_BL1_ht2* y *CIITA_BL1_ht5*) demostraron asociación con poliposis nasal ($p=0.001-0.01$, $OR=0.53-2.35$), sin embargo el rs1139564 se asoció con la intolerancia a la aspirina ($p=0.02$, $OR=2.66$, $IC95\%1.19-5.94$).(47)

b) TBX21

En 2005 Mitsuteru Akahoshi analizó un gen no relacionado con la síntesis de leucotrienos ni presentación antigénica, el *TBX21*, que codifica para el factor de transcripción T-bet, localizado en el cromosoma 17q12-q22 miembro de la familia T-box, relacionado con la síntesis de interferón gamma y por ende con la respuesta inflamatoria Th1. (48) La secuenciación del gen identificó 24 SNP. En este estudio exploratorio, se evaluaron los SNP en diferentes grupos de pacientes japoneses con asma: niños con asma, adultos con

asma atópica, asma no atópica y el grupo de IA, reportando asociación positiva al riesgo con un SNP localizado en región promotora -1993T/C, en específico el alelo C ($p=0.016$, $OR=1.93$, $IC95\%1.22-3.06$) y mantuvo su significancia al contrastarlo con otros tipos de asma ($p=0.001$); éste SNP mantenía un alto desequilibrio de ligamiento en conjunto con otro SNP, el 390 A/G, la adición de ambos incrementaba el riesgo con las variantes menores en modelo recesivo al analizarlos con los otros tipos de asma ($p<0.05/OR \sim 2.0$), así como su haplotipo ($p=0.016$, $OR=14$); en el ensayo funcional, la presencia del alelo C presentó una mayor actividad del promotor, mecanismo que puede contribuir a una mayor inflamación en estos pacientes.(49)

D. Genes relacionados con mecanismos inflamatorios

a) CCR3

El gen del receptor de quimiocinas CC3 y su respectiva proteína (CCR3) poseen un rol importante para su desarrollo en los pacientes con asma, ya que codifica a proteínas G que responden a diferentes quimiocinas involucradas en el asma, como CCL11, CCL26 y CCL7. Kim SH evaluó en 2010 dos polimorfismos (-520T→G y -174C→T) del promotor de CCR3, en 330 pacientes con sensibilidad a la aspirina (191 pacientes con EREA y 139 con urticaria inducida por aspirina -UIA) vs. 217 controles sanos, a nivel general no existió diferencia en la frecuencia de los genotipos entre los pacientes con sensibilidad y los controles, pero si entre EREA y pacientes con UIA con el SNP -520T/G, el genotipo GG presentó significancia ($p=0.015$, $OR=2.03$) y de similar forma con -174 C/T genotipo TT ($p=0.011$, $OR=2.37$), una característica particular en esta investigación es que se reportó un alto desequilibrio de ligamiento entre ambos ($r^2=0.77$), concluyendo que estos 2 SNP pueden considerarse como marcadores genéticos capaces de diferenciar entre estos dos fenotipos de intolerancia a la aspirina.(50)

b) CD58

En 2011 C. Pasaje, describió la participación del gen *CD58* o *Lymphocytefunction-associated antigen 3 (LAF-3)* localizado en el cromosoma 1p13, la proteína que codifica es miembro de la familia de la inmunoglobulinas, está involucrada en la activación de linfocitos T por las células presentadoras de antígeno; evidenció la participación de CD58-CD2 para la activación de las células NK, por este proceso se induce la síntesis de citocinas Th2 vía independiente a mecanismos de hipersensibilidad tipo I, mecanismo que pudiera contribuir al daño inmunopatológico en pacientes con IA. Se seleccionaron solo SNP localizados en exones en población chino-japonesa, reportándose siete SNP (1 en promotor: rs17036001 y 6 en intrones rs7542681, rs2300747, rs1335532, rs12044773, rs1414275, rs10924108), siendo solo el rs7542681 el que fue asociado al descenso del VEF₁ durante el reto con lisin-aspirina, pero no existió otro tipo de asociación entre cada SNP o haplotipo a pesar de poseer un alto desequilibrio de ligamiento. (51)

c) IL13 & IL17

Otra vertiente de la investigación realizada por Kohyama en población coreana fue evaluar la participación de los genes de *IL13*(5q31-q33) e *IL17*(6p12.1) involucrados en mecanismos relacionados con eosinofilia y asma grave entidades características de la IA respectivamente; evaluó los SNP -111C→T y Arg110Gln (rs20541) en *IL13* y -737C→T en *IL17*, reportando que el genotipo TT vs. CT/CC de *IL13* se distribuía en la población de pacientes con EREA y se asociaba en modelo recesivo (p <0.01, OR=2.8) además de ser más predominante en el sexo femenino (p<0.001) y tendencialmente con la disminución del VEF₁. En el caso de *IL17* este obtuvo asociación, pero en el modelo dominante (CC vs. TT+CT, p=0.02, OR 1.8, IC95% 1.1-2.9). (52)

e) IL1B

En 2011 Falfan-Valencia, realizó el primer estudio de asociación genética en una población no caucásica, ni asiática, analizó el SNP del gen *IL1B*, suproteína IL-1 está presente en pólipos, epitelio de la vía aérea y células inflamatorias (53), previamente asociada por Erbek en pacientes con poliposis nasosinusal (54). En la investigación se describió la asociación a la susceptibilidad de EREA con el genotipo AA del rs16944 (*IL1B*), el cual se encuentra incrementado casi en 3 veces más en comparación con los pacientes que padecen asma ($p=0.018$, $OR=2.98$, $IC95\%1.17-7.82$). (55).

f) *IL17RA*

La participación de agentes proinflamatorios como IL-17(IL17A-IL17F) y su respectivo receptor (IL17R) han sido estudiados como potenciadores de la respuesta inflamatoria, sobre todo en modelos alérgicos, el gen en específico de este último componente (*IL17RA*) activa a p38 e induce la expresión subsecuente de COX2. Jong-Sook Park en 2012 evaluó al gen *IL17RA* localizado en el gen 22q11.22 en 163 pacientes con EREA. El estudio se caracteriza por presentar ensayos funcionales y de expresión (medición de RNAm para *IL17RA* y expresión de IL17RA en monocitos), 15 SNP se analizaron, reportando la asociación solo para 4 SNP (rs4819553, rs4819554, rs917864 y rs6518660) capaces de diferenciar EREA del asma y del grupo control; la asociación a la protección resultó para el rs917864, además el genotipo TT se asoció con el decremento de la función pulmonar durante el reto con aspirina y con una menor expresión del receptor $p=0.010$. (56)

g) *IL5RA*

Purevsuren en 2013 evaluó la asociación de IL5 en pacientes con EREA, necesaria para la generación y migración de eosinófilos, el gen de *IL5RA* (3p26-p24) codifica para la subunidad alfa del receptor, en el presente estudio analizó la frecuencia de los genotipos

y realizó ensayo de luciferasa para evaluar al promotor. 4 SNP fueron evaluados y a pesar de que no existió una diferencia de los genotipos entre los diferentes grupos, el -5993G>A presentó asociación con el genotipo AA vs. (GA+GG) con los niveles de IgE específica contra la toxina A de *Staphylococcus* ($p=0.008$) y el alelo menor(A) obtuvo mayor actividad en el ensayo de luciferasa ($p=0.013$) con respecto al alelo G. (57)

h) RAS

Los Ras como Rab GTPasas regulan el transporte de vesículas de endocitosis y exocitosis, las vesículas de los mastocitos contienen proteínas lisosomales involucradas en procesos inflamatorios como el asma y otras enfermedades (58), Jong-Sook Park en 2013 evaluó polimorfismos del gen *RAB1A*, este estudio demostró 2 SNP localizados en intrón (+14444 G>T y +41170 C>G) asociados con la EREA, $p=0.0003-0.03$, en modelo codominante y recesivo, así también con el decremento de la función pulmonar durante el reto oral con aspirina.(59)

i) HSP70

Kikuchi analizó en 2012 los polimorfismos de los genes *HSP70* en pacientes japoneses con EREA, se seleccionaron los SNP -179 C>T y 1267 A>Gen *HSPA1B*, no existió diferencias significativas en los niveles de IgE total en suero, conteo de eosinófilos o la prevalencia de atopia entre EREA y ATA. Los pacientes con EREA mostraron frecuencias más altas del genotipo CT/TT en el SNP-179 C>T con respecto al genotipo CC en comparación con el grupo ATA ($p<0.001$); así también mostraron frecuencias más altas del genotipo GG que la del genotipo AA/GA en comparación con ATA ($p<0.001$) correspondiente a 1267A>G. La frecuencia del haplotipo -179C/1267A también fue significativamente mayor en la comparación EREA vs. ATA ($p<0.001$; OR=3.15, IC95%1.91-5.19). Entre las características clínicas y hematológicas investigadas, EREA

mostró una variación significativa en el recuento de eosinófilos en sangre periférica de acuerdo con la asociación de los polimorfismos de los genes HSP70-2 ($p=0.033$), pero no con los pacientes con asma tolerante.(47)

j)ACE

La bradicinina (BDK) es un péptido vasoactivo, implicado en el incremento de la permeabilidad vascular y vasoconstrictor a nivel de la musculatura lisa pulmonar así también activa a la fosfolipasa A2 que incrementa el metabolismo del ácido araquidónico; su degradación depende de proteínas del plasma. Durante el proceso de síntesis de BDK, uno de sus metabolitos, el octapeptido *des-Arg* bradicinina, es digerido por la enzima convertidora de angiotensina (ACE o Kininase II) con actividad peptidasa, la cual es codificada por el gen *ACE* localizado en el cromosoma 17q23, constituido de 26 exones y 25 intrones, la teoría de como el gen *ACE* participa en la fisiopatogenia del EREA propone que existe un defecto estructural a nivel de proteína, produciendo que no se cumpla el proceso de degradación de BDK, derivando que esta proteína este mayor tiempo en circulación, realizando sus efectos proinflamatorios. Kim evaluó 5SNP de *ACE* (rs4291, rs4292, rs4309, rs4343, rs1799763), siendo los SNPrs4291 y rs4292 aquellos que demostraron tener asociación con la EREA (OR=2.08, 1.91) así como la conformación de su haplotipo ($p=0.01$); con respecto a la disminución del VEF₁ durante la prueba de provocación, los alélelos menores también reportaron una mayor actividad en el ensayo de luciferasa e interesantemente el rs4291 demostró ser un SNP probablemente relacionado con sitio de transcripción.(60)

E. Genes relacionados con receptores

a) RGS7BP

Lee en 2012 investigó el rol de los receptores acoplados a proteína G, común denominador en la mayoría de los receptores involucrados en la vía de los leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos. RGS7BP controla la función de proteínas G (GPCR) e indirectamente modula corrientes de potasio activados por acetilcolina a través de los receptores muscarínicos M2. Debido a este mecanismo los autores investigaron la asociación entre los 42 SNP que se reportaron en el gen *RGS7B*, localizado en el cromosoma 5q12.3, encontrando que 3 SNP y un haplotipo (BL3-ht2) están asociados con EREA +98092 C→G ($p=0.03$, OR=0.26) y +98853 C→T, ($p=0.01$, OR=0.21) ambos en el intrón 5' UTR y +104450 T→G ($p=0.03$, OR=0.26) en la región 3'UTR. Las frecuencias del haplotipo y SNP se distribuyen en menor frecuencia en los pacientes con EREA en comparación con los asmáticos y el haplotipo se asoció con mayor respuesta durante el reto con metacolina, pero no se reportó mayor expresión de RNAm. (61).

b) ADRB2

El gen del receptor beta 2 adrenérgico, localizado en el cromosoma 5q31-32, está involucrado en la síntesis del receptor, esencial para que el salbutamol ejerza sus mecanismos farmacológicos en pacientes con asma(62), en 2011 fue estudiado por Kenia Kohyama en población japonesa, reportando que el polimorfismo ArgArg se asocia 3 veces más en los pacientes con EREA ($p<0.001$) con respecto a ArgGly/ GlyGly en comparación con los ATA ($p<0.001$) y el hallazgo se mantiene al estratificar por género femenino con la enfermedad ($p=0.02$, OR=2.82).(63)

c) *MS4A2*

El gen *MS4A2* codifica para la cadena β del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (Fc ϵ RI), la cadena β está involucrada en la señalización intracelular por parte de este receptor para la liberación de los mediadores preformados contenidos en los gránulos de los eosinófilos, mastocitos y basófilos, vía interacción con calmodulina dependiente de calcio; la cadena β también es considerada un marcador de maduración para estas células, su asociación clínica está directamente relacionada con la patología alérgica. El gen *MS4A2* se encuentra en el cromosoma 11q13. Hi Sin Park asoció a los polimorfismos Fc ϵ R1B -109T>C (TT vs. TC+CC) en pacientes con intolerancia a la aspirina y SEB; (enterotoxina de *Staphylococcus B*) vs. ATA y grupo control (p=0.001, OR=7.27, p=0.02, OR=6.36), en el ensayo de luciferasa demostró que existía alteración de la transcripción del gen en aquellos portadores del alelo C.(64)

F. Genes asociados a otras enfermedades e investigados en EREA

a) *DPCR1*

La región crítica de panbronquiolitis (*DPCR1*) o *C6orf37OS* es un gen localizado en el cromosoma 6p21.33 entre el *HLA-B* y *HLA-A*, de hecho 200Kb de este gen están incluidos en la región HLA, en 2012 fue evaluado como uno de los 500 polimorfismos con posible participación en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana y la panbronquiolitis; sin embargo, previamente Kim reveló que la aspirina puede inhibir al complejo mayor de histocompatibilidad clase I, afectando la presentación antigénica.(65) En este estudio realizado por Jin Son Lee se analizaron 6 SNP, no existiendo diferencia entre las MAF de los grupos de comparación, el rs251749 se asoció en modelo recesivo entre el grupo IA vs. ATA (p=0.03 OR=0.27, IC95% 0.08-0.90) así como con el decremento de la función pulmonar durante el reto con aspirina en el mismo

modelo ($p=0.007$), al igual que el rs2240804 ($p=0.03$), posiblemente la repercusión biológica del SNP los autores hipotetizan que el SNP pudiera estar asociado con un sitio de splicing alternativo(66)

b) FANNC

Existen otros polimorfismos no relacionados con mecanismos directos de la enfermedad y su estudio en la EREA tiene como objetivo valorar su participación, lo que puede proveer de información para establecer nuevos mecanismos patológicos hasta ahora poco explorados, tal es el caso del estudio con gen *FANNC* (*Fanconi anemia complementation group C*) localizado en el cromosoma 9q22.3 asociado con IA por Jeong-Hyun Kim en 2012 y que inicialmente está relacionado directamente con la anemia de Fanconi, su interés radica en que es un gen esencial en la reparación del DNA(67); entre una selección de 25 SNP localizados en su mayoría en intrones a excepción de 2 (rs356677T>C y rs356680G>A), se reportó que el alelo A del rs4647376C>A y rs554879C>G fueron asociados en modelo recesivo con un decremento de la función pulmonar durante el reto con aspirina, el estudio realiza hipótesis a *priori*, utilizando análisis in silico siendo el rs4647376C>A asociado en modelo codominante con un sitio relacionado con splicing alternativo (68).

c) KIFC1

Otro gen adyacente a la región del MHC es *KIFC1* (del inglés *kinesin family member C1*), localizado en el cromosoma 6p21.3 relacionado con la discinecia ciliar primaria siendo los rs456993, rs4655506, rs465223 y rs376006 los que obtuvieron asociación al riesgo en modelo dominante ($p \leq 0.04$, $OR \approx 2$), siendo los rs456993 y rs211457 aquellos que tuvieron asociación con el decremento de la función pulmonar; hasta 2012C. Pasaje consideró que aún no existía una clara explicación sobre la participación del gen en la IA(69).

d) DCBLD2

Otros como el *discoidin neuropilin-like membrane protein (DCBLD2)*, así como *CUB* y *LCCL*, localizados en el cromosoma 3, implicados en la regulación de los factores de transcripción AP-2 y TFAP2A (70) que regulan la síntesis de IL-8 y fibroblastos, componentes esenciales de la remodelación de la vía aérea, Park evaluó en específico a *DCBLD2* y demostró que los SNP rs1371687, rs7615856, rs828621, rs828616, y el haplotipo *DCBLD2_ht1* están asociadas a la susceptibilidad de padecer poliposis nasal, (71) siendo el rs17278047, rs7615856, rs828621 y *DCBLD2_ht5* aquellos que tuvieron asociación con EREA y poliposis nasosinusal, pero no mantuvo la asociación cuando se realizaron múltiples correcciones.

d) ANXA4

Las anexinas (ANXA) son proteínas reguladoras de calcio unidas a fosfolípidos que participan en la regulación del ciclo celular así como en la apoptosis (72), en el asma el calcio está involucrado en la contracción muscular (hiperreactividad bronquial), se ha demostrado que la anexina 1 inhibe la activación de NF κ B y anexina 6 es un supresor de tumores a través de la vía Ras–Raf–mitogen-activated protein kinase (Ras-Raf-MAPK). Park T evaluó los efectos de la posible asociación genética de los polimorfismos de *ANXA4* que a diferencia de otras proteínas de esta familia, está involucrada en el flujo de calcio en epitelios secretores, de 21 SNP que integraron el análisis del gen, figuraron 8 SNP (rs2168116, rs4853017, rs6546547, rs13428251, rs7577864, rs7559354, rs7588022, y rs3816491) y 2 haplotipos (*ANXA4-ht3* and *ANXA4-ht5*) que se asociaron con la susceptibilidad a la enfermedad, en específico con sus alelos menores, siendo el rs3816491 aquel que tuvo el resultado estadístico más significativo ($p=0.03$) después de correcciones múltiples; por otro lado, al rs2168116 localizado promotor, se le realizó un

análisis in silico demostrando su probable participación como regulador de factores de transcripción Sp1 y TFIID.(73)

e) ATF6B

El factor activador de la transcripción 6 beta (ATF6B) es una isoforma del factor de transcripción de activación 6 (ATF6) que se expresa principalmente en el retículo endoplásmico, de manera exploratoria se asociaron los rs2228628 y rs8111, así como el haplotipo ATF6B-ht4 con un decremento en la función pulmonar durante el reto con aspirina ($p=0.03$), en relación con los alelos menores de ambos SNP, también se demostró asociación solo en el grupo EREA ($p=0.02$), el análisis in silico demostró que el rs8111, localizado en la región 3'-UTR, puede estar involucrado en la estabilidad del RNA mensajero.(74)

G. Estudios de genoma completo.

En últimos años se ha tratado de investigar polimorfismos mediante la estrategia de análisis del genoma completo "GWAS" (*Genome-Wide Association Study*) o WGAS (*Whole Genome Association Study*). El primer antecedente usando esta estrategia fue realizado por Shin en 2012, donde evaluó 94,609 SNP seleccionados mediante un $OR > 1$ y/o o que tuvieran un valor asociado a riesgo en combinación con otros SNP mediante la conformación de haplotipos. El resultado de la investigación identificó 10 SNP candidato, posteriormente mediante análisis del área bajo la curva se detectó que ocho SNP eran los que mejor se ajustaban a este modelo ($p=3.432E-21$) [rs6911768 (*PARK2*), rs3213729 (*WDR21*), rs7963956 (*FAM19A2*), rs6714952 (*VRK2*), rs746035 (*CHST11*), rs4501026 (*LINC00314*), rs4867084 (*PDZK3*), rs139719 (*SGSM1*) rs7852409 (*VLDLR*), rs6659655 (*CENPF*)] ya su vez discriminaban también con el grupo de comparación de asma ($p=$

0.00017), siendo estos SNP no relacionados con la vía del ácido araquidónico, pero aparentemente con una probable participación en vías inflamatorias.(39)

La mayoría de los SNP que han sido identificados o son considerados como probables marcadores genéticos de EREA, están localizados en regiones intrónicas, es por eso que Shin en 2014 analizó solo las variables exónicas conformando un microarreglo, partiendo de un *pool* de 242,985 SNP, se analizaron 545,555 que se seleccionaron mediante diferentes estrategias de análisis genético. Detectando que el *exm537513* en HLA-DPB1 es un marcador genético capaz de discriminar el asma del EREA ($p=3.4 \times 10^{-8}$, OR=3.28) (38).

Park en 2013 publicó otro reporte de GWAS realizado en la población coreana, realizó un análisis de genoma completo utilizando un microarreglo capaz de evaluar 657,366 SNP, identificó al *rs2281389* ($p=5.6 \times 10^{-6}$; OR=2.41), localizado en un área intrónica adyacente a *HLA-DPB1*, por otra parte el *rs1042151* localizado en este gen se posicionó como el hallazgo principal en la segunda etapa ($p=5.11 \times 10^{-7}$; OR= 2.40) además del *rs2281389* y *rs3117230*, que además obtuvieron un alto desequilibrio de ligamiento ($r^2=0.97$), este último SNP fue replicado en un segundo estudio y presentaba también un desequilibrio de ligamiento con *rs3117230* ($r^2=0.96$), la presencia de los genotipo GA o AA se asociaban con la susceptibilidad de padecer EREA en comparación con el grupo de asma tolerante y control en modelo co-dominante ($p=0.001$, $p=0.002$). (39),(75)

III. Planteamiento del problema

Las investigaciones en asociación genética en EREA se han enfocado en el estudio de polimorfismos en genes implicados en la síntesis de leucotrienos y más recientemente a otros mecanismos; sin embargo, la mayoría no han sido replicados en otras poblaciones. Se desconoce si el bagaje genético reportado podría estar asociado a la enfermedad en población mexicana, que por razones históricas tiene una constitución genética diferente a otras poblaciones.

IV. Justificación

La metodología de análisis de regiones genómicas candidato permite evaluar una gran cantidad de polimorfismos en un solo ensayo, de esta manera se podría estudiar el rol de los SNPs en estos genes, así como validarlos, ayudando a comprender su participación en los pacientes mexicanos, para en el futuro desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en datos genómicos propios de la estructura de la población mexicana, que ayuden a identificar a individuos con mayor susceptibilidad a padecer esta entidad, promoviendo el desarrollo de la medicina personalizada.

V. Objetivo Primario

Describir si existe asociación genética de los polimorfismos de un solo nucleótido reportados en EREA, en poblaciones europea y asiática en pacientes mexicanos con esta enfermedad.

Objetivo Secundario

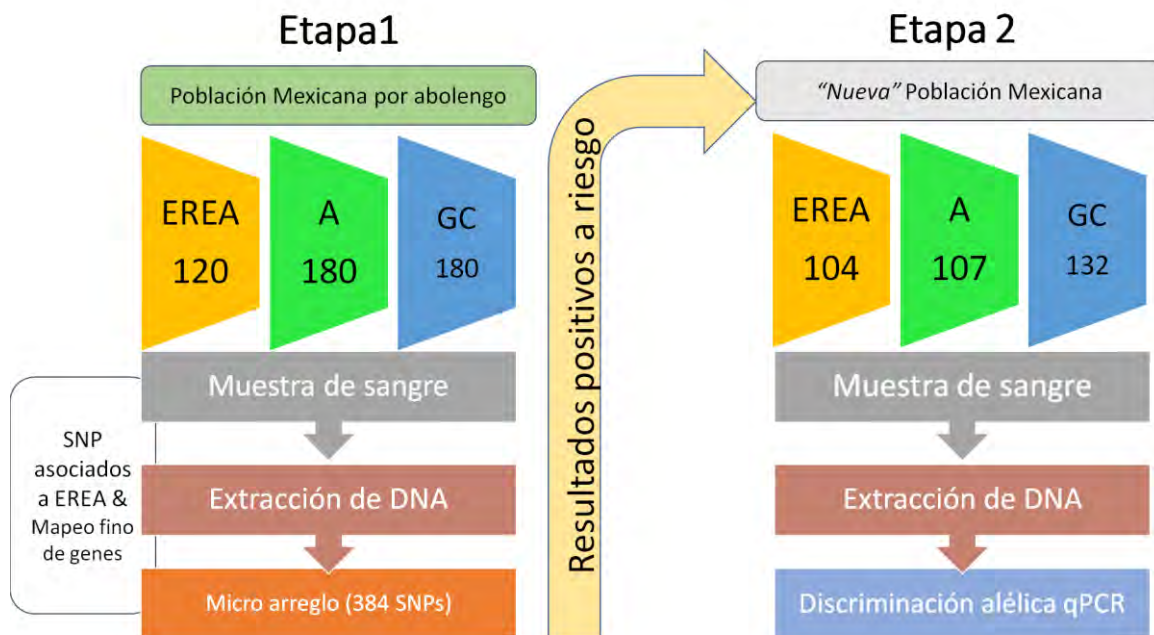
Asociar el polimorfismo de un solo nucleótido con características clínicas inherentes al EREA.

VI. Materiales y Métodos

Diseño de estudio

El protocolo de investigación fue un estudio transversal con orientación de casos y controles, el cual se dividió en dos etapas. En ambas fases, los sujetos fueron adultos, mestizos mexicanos de género indistinto y debían contar con el antecedente de ascendencia mexicana (3 generaciones previas nacidas en México). Una vez clasificados los integrantes en cada grupo, se procedió a su genotipificación mediante una microarreglo que contenía 381 SNPs etiqueta de genes asociados a EREA a través de la plataforma GoldenGate. Los resultados obtenidos se analizaron comparando frecuencia alélicas y modelos genéticos; sólo aquellos resultados que obtuvieron asociación estadísticamente significativa a riesgo, se validaron en una segunda población de estudio mediante ensayo de PCR-TR y fueron analizados con la misma estrategia estadística.

Figura 1. Diseño de estudio



Tamaño de muestra

Debido a la baja prevalencia de la enfermedad, se realizó un muestreo a conveniencia para la primera etapa con una relación de 1 caso:1.5 controles (120 pacientes con EREA y 180 pacientes con asma y el mismo número para los integrantes del grupo control). Similar proporción para la segunda etapa. (104 pacientes con EREA, 107 con asma y 132 sujetos controles).

Criterio de inclusión

EREA

A los pacientes que integraron el grupo EREA se les realizó prueba de reversibilidad (incremento del VEF_1 , $>12\%$ y 200mL respecto al VEF_1 basal), posterior a la administración de 400 μ g de salbutamol para establecer la condición de asma, nasoendoscopia para determinar la poliposis nasosinusal o el antecedente de polipectomía o nasalización de los mismos y reto con lisin-aspirina para confirmar la condición de intolerancia a la aspirina (decremento del 40% del FNT, posterior a la ingesta de 100mg de lisin-aspirina administrada en dosis gradual, respecto al FNT basal) o el antecedente de broncoespasmo 30 minutos posterior a la ingesta de AAS o AINEs y que haya ameritado internamiento en el área de urgencias del INER.

Asma

Los pacientes que conformaron el grupo de asma solo debieron presentar el parámetro de reversibilidad y sintomatología sugerente de asma (tos, disnea, sibilancias, sensación de opresión torácica) y no debieron presentar ninguna característica clínica relacionada con la EREA (poliposis nasosinusal e hipersensibilidad a la aspirina).

Sujeto Control

Los sujetos del grupo control no debieron haber presentado ninguna de las características antes mencionadas (asma, poliposis nasosinusal e hipersensibilidad a la aspirina).

Independientemente del grupo a que perteneciera cada uno de los participantes, se les evaluaron niveles de eosinófilos séricos, IgE sérica y sensibilidad alérgica mediante pruebas cutáneas, una vez fenotipificados los sujetos de estudio, se procedió a la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico).

Criterios de exclusión

Pacientes y sujetos control que al momento del reclutamiento reportarán en la historia clínica, formato de reporte de caso o expediente clínico alguna de las siguientes enfermedades: cáncer, autoinmunidad (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, etc.), tuberculosis, VIH, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y síndrome metabólico.

Pacientes y voluntarios que posean las condiciones necesarias para entrar en alguno de los grupos de estudio, pero nieguen su consentimiento a participar en el estudio.

Criterios de eliminación

Muestra de ADN de cualquier participante, que no tenga el grado de calidad necesario para el desarrollo de las técnicas de biología molecular.

Reto nasal con lisin-aspirina.

A todos los pacientes con EREA y asma se les suspendió con una semana de anticipación los esteroides intranasales, manteniendo exclusivamente como tratamiento los aseo nasales; con 7 días de anterioridad se limitó la ingesta de antihistamínicos y antagonistas de los receptores de leucotrienos, los esteroides inhalados y beta-agonistas de larga duración se suspendieron con 5 días, la restricción para los beta-agonistas de corta duración fue de 12 horas, en caso de tener tratamiento con anticolinérgicos inhalados y metilxantinas, estas se evitaron con 48 horas previas al estudio.

La evaluación del reto se llevó a cabo con un Espirómetro-Rinomanómetro Jaeger modelo Flowscreen calibrado diariamente y programado con los valores de referencia de Pérez-Padilla. Una vez evaluada la condición clínica del paciente y corroborado la suspensión de medicamentos de acuerdo a lo especificado, además de previa firma de consentimiento informado, se realizó espirometría basal hasta obtener criterios de repetibilidad y aceptabilidad que justificarán un grado de calidad A.

Con la finalidad de evaluar la presencia de hiperreactividad nasal inespecífica, se instiló sobre ambos cornetes medios, 1 ml de solución salina a 37°C, 20 minutos después se obtuvo determinación de rinomanometría, en caso de haber presentado un descenso del FNT >50%, se consideró hiperreactividad nasal y el reto fue reprogramado; descartada esta condición se continuó con el reto nasal manteniendo al paciente con medición continua de saturación de oxígeno por medio de oximetría de pulso, además de contar con un acceso vascular permeable que permita la administración de medicamentos sistémicos en caso de reacción grave al AAS.

Para instilar lisin-aspirina en cavidad nasal se elaboró una concentración en estado líquido de 50 mg/ml, mediante la dilución de un sobre de Coraspir® (Acetil Salicilato de

Lisina) 160 mg (equivalentes a 80 mg de ácido acetilsalicílico) en 3.2 ml de solución salina al 0.9%. Se aplicó con pipeta Eppendorf en cada cornete medio, 250 μ L de la solución previamente descrita que equivalen a 12.5 mg de lisin-aspirina, aplicando una dosis total de 25 mg; posterior a 20 minutos se realizó rinomanometría y espirometría, en caso de haber presentado un descenso $\geq 40\%$ el FNT se consideró reto positivo y/o si el VEF₁ obtuviera una caída $\geq 20\%$ respecto al valor inicial.

En caso de no haber presentado criterios de positividad, se instiló nuevamente 12.5 mg de lisin-aspirina en cada narina, procedimiento que se repitió hasta una cuarta ocasión (dosis acumulada de lisin aspirina de 100 mg), en caso de no existir descenso del FNT o del VEF₁ el reto se consideró negativo.

Pruebas cutáneas

Previa explicación al paciente de la técnica se realizó interrogatorio con el objetivo de conocer si existió ingesta de medicamentos que pudiera provocar falsos negativos. Los antihistamínicos anti H1 debieron suspenderse con diez días de anticipación. Se realizó asepsia de la cara anterior de ambos antebrazos, inmediatamente se aplicó leve presión en esta región con punta roma, 15 minutos posterior a esta maniobra se evaluó la condición de dermatografismo de estar ausente se procedió al desarrollo de la prueba

Se aplicó sobre la piel con lanceta de polipropileno tipo duotip, 40 alérgenos Alk-Abello®, distribuidos de la siguiente manera: 16 pólenes de árboles, 10 pólenes de pastos, 8 pólenes de malezas, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, cucaracha y epitelio de gato, perro, y conejo. Como control negativo se utilizó solución fisiológica 0.9% y clorhidrato de histamina (1:1000) como control positivo. Posterior a 20 minutos se midieron los diámetros ortogonales que produjeron los reactivos, considerando positivas aquellas reacciones que midieron >3 mm en comparación con el diámetro de roncha provocada por el control negativo.

Integración de microarreglo

Para la conformación del microarreglo se realizó una búsqueda intencionada de los estudios de asociación genética en EREA en el portal *US National Library of Medicine del National Institutes of Health* utilizando las palabras clave: SNP & AERD, SNP and aspirin intolerance y SNP & asthma aspirin hypersensitivity, en un periodo comprendido de 1997 a 2014; de estos estudios se eligieron sólo aquellos cuyos resultados fueron compatible con riesgo ($OR > 1$ y $p < 0.005$), seleccionándose 53 genes, a los que se les realizó un mapeo fino de genes asociados cuyo objetivo fue identificar SNP etiqueta, utilizando el software Haploview versión 11.0; así mismo se dispuso de marcadores de ancestría poblacional proporcionados del proyecto de divulgación genómica del mestizo mexicano y marcadores de ancestría de la población caucásica-europea.

Se conformó un microarreglo a la medida integrado por 384 SNP (362 SNP integrados a genes asociados a EREA y 22 SNP marcadores de ancestría poblacional).

Selección de SNPs marcadores informativos de ancestría (AIMs)

Con la finalidad de evaluar el origen poblacional de los individuos incluidos en el estudio (tanto casos como controles) y evitar que las asociaciones encontradas sean debidas a estratificación poblacional, se incluyeron marcadores informativos de ancestría (AIMs) que cumplieran con los siguientes criterios: diferencia de la frecuencia del SNP entre dos poblaciones $> 30\%$, distancia entre AIMs > 500 kb. Se seleccionaron 260 AIMs, sin embargo, sólo 253 cumplieron con los criterios de calidad de la compañía, estos SNPs se encuentran distribuidos desde el cromosoma 1 hasta el cromosoma 21.

Extracción de ADN

La muestra de ADN se extrajo a partir de sangre venosa por medio del kit comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA) para obtener ADN de alto peso molecular. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos para la

obtención de suero y plasma. Posteriormente se separó el suero del tubo SST gel (sin anticoagulante) y se extrajo la capa de leucocitos del tubo BD-EDTA, se colocó en un tubo cónico de 15mL agregando 2mL de detergente DB1, dando vórtex para una mejor homogenización y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante del tubo y se agregó 2mL de BD2 dando vórtex y centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante, concluidos los pasos anteriores se aplicó 1000µL de BD3 y homogenizó con el botón leucocitario formado; dejándose en baño maría por 45 minutos a 65°C, posteriormente se pasó la muestra obtenida a un tubo Eppendorf y se agregó 400µL de BD4, centrifugándose a 14000 rpm durante 10 minutos, subsecuentemente se extrajo el sobrenadante y se agregó 500µL de isopropanol al 100%, mezclándose por inversión vigorosamente hasta observar la hebra de ADN y volviéndose a centrifugar a 3,000 rpm por 2 minutos. Ulteriormente se decantó el residuo de isopropanol protegiendo el ADN el cual se encuentra precipitado como un botón blanco en el fondo del tubo Eppendorf, dejándose secar por 15 minutos aproximadamente. Para la hidratación del ADN a cada muestra se le agregaron de 300 a 500 µL de solución amortiguadora TE dependiendo de la cantidad de ADN obtenido, dejándose incubara 65°C por una hora. Para el almacenamiento en espera de la realización de PCR se mantuvo a 4°C, y transferido a un criotubo.

Genotipificación por GoldenGate

La genotipificación se lleva a cabo empleando la tecnología GoldenGate, la cual se fundamenta en la activación del DNA con estreptavidina para que una vez activada pueda unirse a las partículas paramagnéticas y posteriormente sea alineado con los oligonucleótidos alelo específicos 1 (ASO1) y alelo específicos 2 (ASO2) que van a identificar al SNP y al oligonucleótido de direccionalidad, una vez alineado, es lavado para eliminar el exceso de reactivos y se realiza una ligación para que posteriormente se

realice la amplificación del DNA por medio de una reacción de PCR; en la mezcla de esta PCR se encuentran 3 oligonucleótidos universales, C y 3 que se incorpora a ASO1 y Cy5 que se incorpora a ASO2 y un anticuerpo biotinilado complementario al locus específico de direccionalidad, el cual posteriormente servirá para inmovilizar el producto de PCR sobre el microarreglo de genotipificación. El escáner utilizado para estos microarreglos es el modelo denominado *BeadArray Reader*, el cual usa un láser para excitar la fluorescencia de la extensión de una sola base. Los fluoróforos presentan una imagen de alta resolución en cada sección de los microarreglos. Los datos de estas imágenes fueron analizados para determinar cada genotipo de los SNPs probados usando el software *BeadStudio* con el módulo de genotipificación; en la figura 2 se esquematizan los pasos a seguir para la genotipificación por GoldenGate.

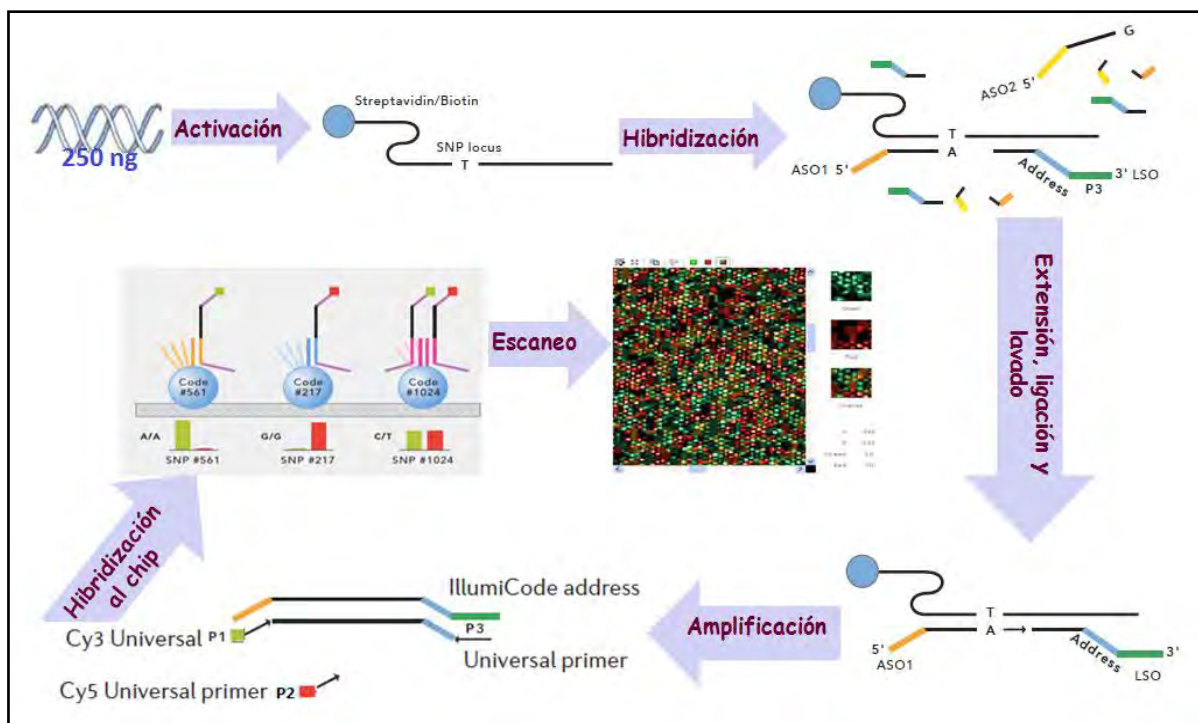


Figura 2. Esquema de la técnica de genotipificación masiva. Se muestra en resumen la técnica de genotipificación masiva empleando la plataforma comercial GoldenGate de Illumina.

Genotipificación en Tiempo Real (qPCR)

Se utilizó el ensayo de 5' exonucleasa para la amplificación y detección de alelos específicos en las muestras de ADN genómico purificado, cada ensayo TaqMan contiene 2 cebadores para amplificar la secuencia de interés y 2 sondas TaqMan para la detección de alelos, lo que nos permite determinar el genotipo de los 2 alelos posibles.

El ensayo determina la presencia o ausencia de un SNP basado en el cambio de la fluorescencia asociada a las sondas, ya que se encuentran marcadas con un fluoróforo en el extremo 5' (VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2), ambas sondas tienen en el extremo 3' un quencher el cual inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda no hibride con la secuencia específica de ADN, una vez que se haya dado la hibridación de la sonda con el ADN si se encontrará la presencia del polimorfismo, la sonda TaqMan se unirá a una secuencia homóloga y la polimerasa degradará el quencher, lo que dará como resultado la liberación de fluorescencia, por lo que será posible la identificación del alelo basándonos en el tipo de emisión. El programa de ciclaje utilizado fue el siguiente:

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

Análisis estadístico

En el análisis estadístico se consideró la estrategia de contrastar el grupo de interés (EREA) vs. los grupos de comparación (Asma y Control) de manera individual; para variables clínicas cuantitativas se utilizó estadística no paramétrica, Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney expresando sus resultados en medianas y rango intercuartilar; para las

variables cualitativas fue ji cuadrada (3x2 y 2x2), con el software SPSS V.21. Para las variables genéticas, se analizaron las frecuencias alélicas con el software PLINK. Subsecuente se crearon modelos genéticos (codominante y recesivo) con los programas estadísticos Epi-Info v.7.0 y Epidat v.2.0 (estrategia que también se aplicó en la segunda etapa). Sólo se tomaron en consideración para ser validados en la segunda etapa, aquellos resultados de la primera fase que estadísticamente fueran significativos y asociados positivamente a riesgo, ($p < 0.05$ y $OR > 1$).

Aspectos éticos

El estudio no represento ningún tipo de riesgo para los pacientes y voluntarios y tiene la aprobación del comité de ética del INER bajo el registró: B14-12.

VII. Resultados.

Primera Fase.

Datos clínicos y demográficos.

La primera fase incluyó 120 pacientes con EREA, 178 con asma y 178 sujetos controles, la relación mujer: hombre fue similar en los grupos EREA (1.7:1) y control (1.3:1) e invertida en los asmáticos (2.3:1); en cuanto a la edad los pacientes (EREA y asma) se encontraban en la cuarta década de la vida y tenían mayor edad en comparación a los controles ($p < 0.001$), el conteo de eosinófilos séricos fue mayor en el grupo de pacientes con EREA en comparación con los grupos asma y control ($p < 0.0001$), en contraparte los niveles séricos de inmunoglobulina E fue superior en los sujetos del grupo asma, cuando se comparó con los pacientes con EREA ($p < 0.001$) y controles ($p < 0.001$), la intolerancia a la aspirina fue una condición que se encontró en todos los pacientes con EREA, demostrándose de manera objetiva como reducción del flujo nasal total posterior a la administración nasal de lisin-aspirina, característica que no se encontró en los otros grupos ($p < 0.001$); de la misma manera la reversibilidad, particularidad de los grupos con asma, fue patente con respecto al grupo control ($p = 0.02$), no se reportó diferencia en la sensibilidad alérgica mediante prueba cutánea en los tres grupos de estudio ($p > 0.05$). Dichos resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos.

Variable	Primera etapa						Segunda etapa					
	EREA	GC	A	EREA vs. GC	EREA vs. A	A vs. GC	EREA	GC	A	EREA vs. GC	EREA vs. A	A vs. GC
n	120	179	179				104	132	107			
Edad	43 (34-50)	27 (22-35)	39 (27-52)	§	NS	§	42(33-53)	34(26-43)	36(27-46)	§	¥	NS
% Femenino	64.5	59.7	70.1	NS	NS	¥	70	73	74	¥	NS	¥
Eosinófilos cell/mm ³	400 (300-700)	100 (61-191)	170 (40-492)	§	§	¥	400 (215-700)	136 (84-219)	300 (200-428)	§	¥	§
IgE UI/L	125 (62-235)	88 (38-135)	229 (118-297)	¥	¥	§	107 (42-254)	63 (18-107)	266 (131-501)	§	§	§
% PC+	46	52	55	NS	NS	NS	48	44	81	¥	¥	NS
% VEF ₁ ^φ	7 (2-13)	5 (0-5)	15 (8-21)	§	¥	¥	10 (5-13)	3 (0-5)	12 (6-16)	¥	¥	NS
% FNT ^{φφ}	54 (48-59)	3.6 (-5-5)	10 (3-10)	§	§	¥ [‡]	AC	-	-	-	-	-

EREA- Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina , A-Asma, AC-Antecedente clínico de broncoespasmo secundario a la ingesta de aspirina más la presencia de pólipos nasales y asma, GC, Grupo Control, FNT- Flujo Nasal Total(^{φφ}porcentaje de cambio en el resto con lisin-aspirina). PC+- Pruebas cutáneas positivas, VEF₁ - Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (^φporcentaje de cambio en la prueba de reversibilidad) Todos los resultados cuantitativos están expresados en medianas y rango intercuartilar. ‡ No cumple criterio de positividad (FNT> 40%).

¥ $p \leq 0.05$

§ $p \leq 0.0001$

Integración del microarreglo

Se analizaron 66 artículos publicados entre 1997 y 2014, de este proceso se obtuvieron los 362 polimorfismos de un solo nucleótido, que constituyeron el microarreglo que se analizó mediante la técnica GoldenGate.

Los SNPs se encuentran en 53 genes; 63 SNPs están directamente relacionados con la EREA en la literatura y 299 son SNPs etiqueta que se obtuvieron mediante el mapeo fino de genes asociados, análisis que se realizó con el software Haploview v.11.0. Posterior al análisis GoldenGate, 9SNPs no cumplieron con equilibrio de Hardy-Weinberg($p < 0.05$), 42 se eliminaron por tener una frecuencia de su alelo (MAF) $< 10\%$ y 22 eran de ancestría, por lo que el análisis de regiones genómicas candidato se realizó con 311 SNPs. Figura 3.

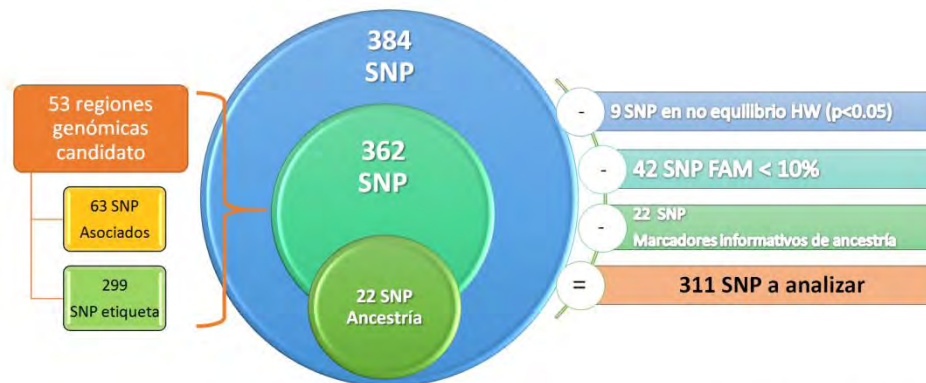


Figura 3. Diseño de microarreglo. SNP- polimorfismo de un solo nucleótido, HW-Hardy Weimberg, FAM-Frecuencia del Alelo Menor

Análisis de ancestría.

El análisis de la distribución de ancestría, reveló que no existían diferencias significativas en todos los integrantes que participaron en el estudio ($p > 0.05$, para las distintas comparaciones), cuando se compararon las frecuencias con los marcadores de ancestría poblacional (amerindio/caucásico-europeo), siendo para el grupo EREA (52%/48%), asma (56%/44%) y controles (58%/42%). Figura 4.

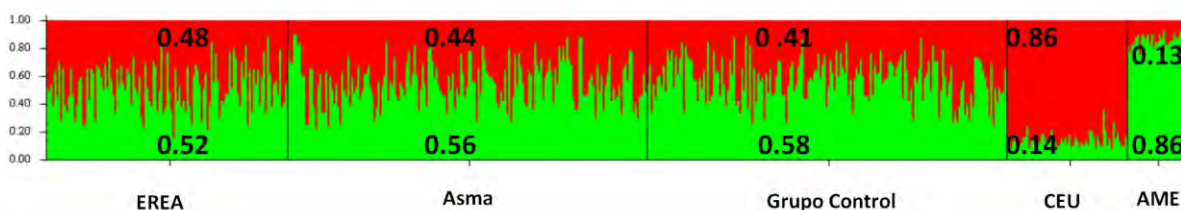


Figura 4. Análisis de ancestría. FST- Índice de fijación, EREA-Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina, CEU-Caucásico Europeo de Utah, MEX_PDGM(AME)- Programa de divulgación genómica del mestizo mexicano. Valores expresados en frecuencias

Frecuencias alélicas por GoldenGate

Los datos de frecuencias alélicas obtenidos mediante la técnica GoldenGate demostraron en la comparación EREA vs. grupo control, la asociación de 22 SNPs localizados en 11 genes, 11 SNPs asociados a riesgo en 9 genes (*ACE- Angiotensin I Converting Enzyme*, *MS4A2-Membrane Spanning 4-domains A2*, *FSIP- Fibrous Sheath Interacting Protein 1*, *IL10-interleukine 10*, *ANX4-Annexin A4*, *FCER1G-Fc fragment of IgE receptor Ig*, *KIF3C-Kinesin Family Member C3*) y 11 a protección en 7 genes (*MS4A2*, *PPARG- Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*, *IL10*, *RGS7BP- Regulator of G Protein*

Signaling 7 Binding Protein, TBXAS1-thromboxane A synthase 1, FANCC-Fanconi anemia complementation group C, FCER1G) siendo los genes *IL10* y *TBXAS1*, los genes que aportan un mayor número de SNPs.

El rs4309 correspondiente al gen *ACE* fue el que obtuvo mayor significancia estadística ($p < 0.0001$) manteniendo esta diferencia posterior a la corrección por Bonferroni con un factor de 311 ($p = 0.04$), OR=1.92 e IC 95% (1.37-2.69), siendo este el único polimorfismo que cumplió la presente condición; el rs4293 incluido también en *ACE*, presentó $p = 0.005$, OR=1.82, IC95% 1.29-2.56.

El gen *MS4A2* contribuyó con 2 SNPs, rs573790 y rs502581 obteniendo valor de $p = 0.0002$, OR=1.96, IC95% 1.5-2.77 y $p = 0.001$, OR=1.90, IC95% 1.26-2.87 respectivamente. El rs2631700 del gen *FSIP* tuvo $p = 0.001$, OR=1.71, IC95% 1.23-2.38.

Tabla 2

En la segunda comparación EREA vs. asma, se asociaron 19 SNPs contenidos en 11 genes, 14 a riesgo en 8 genes (*ACE*, *FSIP1*, *IL10*, *TBXAS1*, *IL1B*-Interleukin 1 beta, *CYP2C19*-Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19, *IL13*- Interleukin 13) y 5 a protección en 6 genes (*TBXAS1*, *IL10*, *PTGER2*- Prostaglandin E Receptor 2, *OBSCN*-Obscurin, Cytoskeletal Calmodulin and interacting RhoGEF y *PPARG*) siendo los genes *IL10* y *TBXAS1* aquellos que más aportaron SNPs., sin embargo continuaron siendo los rs4309 y rs4293 del gen *ACE*, los que presentaron una diferencia estadísticamente significativa.

El rs4309 se mantuvo en primer lugar, al igual que en la comparación EREA vs. controles, posterior a la corrección por Bonferroni, $p = 0.04$ OR 1.92, IC95% 1.37-2.69, el segundo lugar fue el rs4293 $p = 0.001$, OR=1.92, IC95% 1.36-2.71, pero no soportó dicha corrección así como los subsecuentes SNPs que obtuvieron $p \leq 0.001$ como el rs2631700 de *FSIP1*,

OR=1.69, IC95% 1.22-2.36, rs3024498 de *IL10*, OR=1.96 IC95% 1.28-3.02y rs2269997 de *TBXAS1*OR=1.67, IC95%1.20-2.33. Tabla 3

En la última comparación, asma vs. control, se asociaron 11 SNPs, 2 SNPs a riesgo en el gen *MS4A2* y 9 SNPs en 5 genes (*TBXAS1*, *FANCC*, *CYSLTR2* y *PTGER3*) los asociados a riesgo fueron el rs573790 p=0.001, OR= 1.70, IC95%1.23-2.37 y rs502581 p=0.001, OR=1.71, IC95% 1.17-2.50. Tabla 4.

Tabla 2. Comparación de frecuencias alélicas EREA vs. Grupo Control.

Cr	Gen	SNP	Alelo	EREA (FA)	GC (FA)	p	OR	CI95%
17	<i>ACE</i>	rs4309	C	0.4832	0.3268	0.0001257	1.926	1.37-2.69
11	<i>MS4A2</i>	rs573790	C	0.375	0.236	0.0002506	1.943	1.35-2.77
17	<i>ACE</i>	rs4293	G	0.4375	0.2989	0.0005139	1.825	1.29-2.56
15	<i>FSIP</i>	rs2631700	T	0.5583	0.4242	0.0013	1.716	1.23-2.38
11	<i>MS4A2</i>	rs502581	A	0.2542	0.1517	0.001875	1.906	1.26-2.87
3	<i>PPARG</i>	rs2960421	G	0.1167	0.2135	0.002256	0.4866	0.30-0.77
1	<i>IL10</i>	rs1554286	T	0.325	0.4438	0.003626	0.6034	0.42-0.84
5	<i>RGS7BP</i>	rs6870654	C	0.2417	0.3464	0.006381	0.6014	0.41-0.86
7	<i>TBXAS1</i>	rs13239058	T	0.1458	0.2318	0.009583	0.5657	0.36-0.87
3	<i>PPARG</i>	rs4135275	G	0.2125	0.3073	0.01044	0.6084	0.41-0.89
1	<i>IL10</i>	rs1800872	A	0.3625	0.4605	0.01765	0.6663	0.47-0.93
1	<i>IL10</i>	rs1800896	G	0.325	0.2374	0.01841	1.546	1.07-2.22
3	<i>PPARG</i>	rs1875796	T	0.425	0.5169	0.02771	0.6909	0.49-0.96
7	<i>TBXAS1</i>	rs10487667	G	0.3125	0.3989	0.03161	0.685	0.48-0.96
2	<i>ANX4</i>	rs7588022	C	0.3625	0.2809	0.03524	1.456	1.02-2.06
9	<i>FANCC</i>	rs1326188	C	0.075	0.1285	0.03807	0.5499	0.31-0.97
15	<i>FSIP</i>	rs2631702	G	0.4625	0.3799	0.04431	1.405	1.00-1.95
1	<i>FCER1G</i>	rs4489574	T	0.4792	0.3966	0.04571	1.399	1.00-1.94
1	<i>IL10</i>	rs3024498	G	0.2292	0.1638	0.04653	1.517	1.00-2.29
1	<i>FCER1G</i>	rs7528588	G	0.2125	0.2849	0.04666	0.6772	0.46-0.99
5	<i>KIFC3</i>	rs2285700	T	0.4	0.3212	0.04817	1.409	1.00-1.98
7	<i>TBXAS1</i>	rs6962291	A	0.3875	0.4689	0.04955	0.7165	0.51-0.99

ACE-angiotensin I convertin genzyme, *ANX4*- annexin A4, CI95%- 95%, Cr: Cromosoma , EREA- Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina, FA- Frecuencia alélica, *FANCC*- Fanconi anemia complementation group C, *FCER1G*- Fc fragment of IgE receptor Ig, *FSIP*-interleukin 24, GC-Grupo Control, *IL10*- interleucina 10, *KIFC3*- kinesin family member C3, *MS4A2*:membrane spanning 4-domains A2, OR- Odds ratio, *PPARG*:peroxisome proliferator activated receptor gamma, *RGS7BP*: regulator of G protein signaling 7 binding protein, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, *TBXAS1*: thromboxane A synthase 1.

Tabla 3. Comparación de frecuencias alélicas EREA vs. Asma

Cr	Gen	SNP	Alelo	EREA (FA)	Asma (FA)	<i>p</i>	OR	CI95%
17	<i>ACE</i>	rs4309	C	0.4832	0.3268	0.0001257	1.926	1.37-2.69
17	<i>ACE</i>	rs4293	G	0.4375	0.2877	0.0001634	1.926	1.36-2.71
6	<i>FSIP</i>	rs2631700	T	0.5583	0.427	0.001642	1.697	1.22-2.36
7	<i>TBXAS1</i>	rs2072190	C	0.4708	0.3436	0.001803	1.7	1.21-2.37
7	<i>IL10</i>	rs3024498	G	0.2292	0.1313	0.001813	1.967	1.28-3.02
1	<i>TBXAS1</i>	rs2269997	C	0.5292	0.4011	0.002096	1.678	1.20-2.33
7	<i>IL1B</i>	rs16944	G	0.458	0.3436	0.005023	1.614	1.15-2.25
1	<i>IL10</i>	rs1554286	T	0.325	0.4354	0.006754	0.6244	0.44-0.87
1	<i>IL10</i>	rs1800896	G	0.325	0.2263	0.007384	1.647	1.14-2.37
7	<i>CYP2C19</i>	rs10786172	A	0.4875	0.387	0.01513	1.507	1.08-2.09
10	<i>ANX4</i>	rs7588022	C	0.3625	0.2709	0.01742	1.53	1.07-2.17
4	<i>TBXAS1</i>	rs757760	A	0.1542	0.09497	0.02827	1.737	1.05-2.85
7	<i>IL10</i>	rs1800872	A	0.3625	0.4522	0.02926	0.6887	0.49-0.96
15	<i>IL13</i>	rs20541	C	0.4417	0.3567	0.03718	1.426	1.02-1.99
5	<i>FSIP</i>	rs2631702	G	0.4625	0.3771	0.03749	1.421	1.02-1.98
15	<i>FSIP</i>	rs2411300	A	0.4125	0.3296	0.03879	1.428	1.01-2.00
15	<i>PTGER2</i>	rs1409165	C	0.1083	0.1685	0.04022	0.5994	0.36-0.98
1	<i>OBSCN</i>	rs4653544	A	0.1208	0.1816	0.0455	0.6195	0.38-0.99
1	<i>PPARG</i>	rs2960421	G	0.1167	0.176	0.04778	0.6184	0.38-0.99

FA- Frecuencia alélica, *ACE*-angiotensin I converting enzyme, *ANX4*-annexin A4, CI95%- Intervalo de confianza al 95% , Cr- Cromosoma, *CYP2C19*-cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19, *FSIP*-interleukin 24, *IL10*: interleukin 10, *IL13*- interleukin 13, *IL1B*- interleukin 1B, *OBSCN*- obscurin, cytoskeletalcalmodulin and titin-interacting, OR- Odds ratio, *PPARG*-peroxisome proliferator activated receptor gamma, *PTGER2*- prostaglandin E receptor 2, *RhoGEFTBXAS1*- thromboxane A synthase 1.

Tabla 4. Comparación de frecuencias alélicas Asma vs. Grupo Control.

Cr	Gen	SNP	Alelo	Asma FA(%)	GC FA (%)	<i>p</i>	OR	CI95%
11	<i>MS4A2</i>	rs573790	C	0.3455	0.236	0.001288	1.709	1.23-2.37
7	<i>TBXAS1</i>	rs2072190	C	0.3436	0.4581	0.001768	0.6191	0.45-0.83
11	<i>MS4A2</i>	rs502581	A	0.2346	0.1517	0.005006	1.715	1.17-2.50
7	<i>TBXAS1</i>	rs2269997	C	0.4011	0.5028	0.006428	0.6624	0.49-0.89
9	<i>FANCC</i>	rs1326188	C	0.07303	0.1285	0.01387	0.5344	0.32-0.88
7	<i>TBXAS1</i>	rs17161326	A	0.2612	0.3455	0.01446	0.6699	0.48-0.92
13	<i>CYSLTR2</i>	rs912278	C	0.3268	0.4134	0.01642	0.6889	0.50-0.93
14	<i>PTGER3</i>	rs1254600	T	0.3436	0.4302	0.01737	0.6933	0.51-0.93
7	<i>TBXAS1</i>	rs13239058	T	0.162	0.2318	0.0188	0.6406	0.44-0.93

FA, Frecuencia alélica , CI:confidenceinterval,GC- GC-Grupo Control, CI95%- Confidenceinterval at 95%, Cr- Cromosoma ,*CYSLTR2*-cysteinyl leukotriene receptor 2, *FANCC*- Fanconi anemia complementationgroup C, *MS4A2*-membrane spanning 4-domains A2, OR- Odds ratio, *PTGER3*- prostaglandin E receptor 3, SNP- polimorfismo de un solo nucleótido, *TBXAS1*- thromboxane A synthase 1.

Modelos genéticos codominante (MC) y recesivo (MR).

Debido a la forma en cómo se generaron los resultados, existieron SNPs que solo se asociaron a riesgo en una comparación (ej. EREA vs. asma) a lo que definimos como *asociación exclusiva*, sin embargo, pudo existir que un SNP se encontrara en dos comparaciones (ej. EREA vs. grupo control y EREA vs. asma) a lo que se le consideró como *asociación compartida*, ningún SNP presentó asociación en las tres comparaciones.

En el caso de las *asociaciones exclusivas*, se presentaron en la comparación EREA vs. asma y asma vs. control; con respecto a la primera, existió asociación del rs2269997CC de *TBXAS1*, $p=0.002$, OR=2.67 en modelo codominante y $p=0.02$ OR=1.96 en recesivo; además de *IL10* rs3024498GG $p=0.003$, OR=5.43 y $p=0.002$, OR 4.75. En la otra comparación exclusiva el rs502581AA del gen *MS4A2* obtuvo $p=0.01$; OR=4.78 y $p=0.03$, OR=4.21 en ambos modelos.

Para las *asociaciones compartidas*, el rs4309CC del gen *ACE*, demostró diferencias entre los grupos EREA vs. control y EREA vs. asma, en la primera comparación $p=0.001$, OR=4.33 en el modelo codominante y $p=0.0002$, OR=2.07 para el recesivo, en la segunda comparación obtuvo $p=0.0001$ OR=4.33 en modelo codominante y $p=0.001$, OR=3.17 en modelo recesivo.

El análisis para rs4293GG integrado en el gen *ACE* en la comparación EREA vs. control en MC presentó significancia estadística con $p=0.002$, OR=3.41 en MC y $p=0.01$, OR=2.45 en MR; en la comparación EREA vs. asma $p=0.0001$, OR=5.61 en MC y $p=0.004$, OR=4.2.

El rs573790CC del gen *MS4A2*, demostró asociación estadística en dos comparaciones EREA vs. control y asma vs. control, para la primera se obtuvo $p=0.0001$, OR=7.8 en MC y $p=0.001$ OR 5.77 en MR, para la comparación asma vs. control los modelos MC y MR tuvieron, $p=0.001$, OR=7.42 y $p=0.00001$, OR 6.77 respectivamente. Tabla 5

Tabla 5. Modelos genéticos codominante y recesivo asociados a riesgo en EREA

Gen/SNP	EREA	GC	Asma	EREA vs. GC		EREA vs. Asma		Asma vs. GC	
	120	179	179	<i>p</i>	OR (CI95%)	<i>p</i>	OR (CI95%)	<i>p</i>	OR (CI95%)
ACE rs4309									
TT	32 (26.66)	84 (46.92)	77 (43)	0.0002	1	0.0001	1	0.24	1
TC	61 (50.83)	73 (40.78)	87 (48.60)		2.26 (1.32-3.86)		1.68 (0.99-2.85)		1.3 (0.83-2.01)
CC	27 (22.5)	22 (12.29)	15 (8.37)		3.32 (1.65-6.68)		4.33 (2.03-9.20)		0.74 (0.36-1.53)
TT+TC	93 (77.5)	157 (87.71)	164 (91.63)	0.02	2.07 (1.11-3.84)	0.001	3.17 (1.6-6.26)	0.29	1.53 (0.76-3.06)
CC	27 (22.5)	22 (12.29)	15 (8.37)						
ACE rs4293									
AA	37 (30.83)	87 (48.60)	85 (47.48)	0.02	1	0.0001	1	0.38	1
AG	61 (50.83)	77 (43.01)	85 (47.48)		1.8 (1.11-3.14)		1.64 (0.99-2.73)		1.12 (0.73-1.73)
GG	22 (18.33)	15 (8.37)	9 (5.02)		3.4 (1.61-7.37)		5.61 (2.36-13.35)		0.61 (0.25-1.47)
AA+GG	98 (81.67)	164 (91.63)	170 (94.98)	0.01	2.45 (1.21-4.95)	0.0004	4.2 (1.87-9.57)	0.29	1.72 (0.73-4.05)
GG	22 (18.33)	15 (8.37)	9 (5.02)						
MS4A2 rs573790									
TT	44 (36.66)	99 (55.33)	80 (44.69)	0.0001	1	0.24	1	0.001	1
TC	62 (51.66)	76 (42.45)	75 (41.89)		1.8 (1.12-2.99)		1.5 (0.91-2.47)		1.22 (0.79-1.88)
CC	14 (11.66)	4 (22.34)	24 (13.4)		7.8 (2.45-25.28)		1.06 (0.49-2.25)		7.42 (2.47-22.27)
TT+TC	106 (88.34)	175 (77.66)	155 (86.60)	0.001	5.7 (1.85-18.01)	0.79	0.85 (0.42-1.72)	0.0001	6.77 (2.29-19.95)
CC	14 (11.66)	4 (22.34)	24 (13.4)						
MS4A2 rs502581									
CC	64 (53.33)	128 (71.5)	107 (59.77)	0.004	1	0.23	1	0.01	1
AC	51 (42.50)	48 (26.81)	60 (33.51)		2.12 (1.29-3.48)		1.42 (0.87-2.30)		1.49 (0.94-2.36)

AA	5 (4.16)	3 (1.67)	12 (6.70)		3.33 (0.77-14.38)		0.69 (0.23-2.06)		4.78 (1.31-17.39)
CC+AC	115 (95.84)	176 (98.83)	167 (93.30)	0.34	2.5 (0.59-10.87)	0.5	1.65 (0.56-4.81)	0.03	4.21(1.16-15.2)
AA	5 (4.16)	3 (1.67)	12 (6.70)						
IL10 rs3024498									
AA	74 (61.66)	123 (68.71)	135 (75.41)	0.01	1	0.003	1	0.28	1
AG	37 (30.83)	54 (30.16)	41 (22.9)		1.13 (0.68-1.89)		1.63 (0.96-2.76)		0.69 (0.43-1.11)
GG	9 (7.5)	2 (1.11)	3 (1.67)		7.47 (1.57-35.56)		5.43 (1.42-20.68)		1.36 (0.22-8.31)
AA+AG	111 (92.5)	177 (98.89)	176 (98.33)	0.02	7.17 (1.52-33.82)	0.002	4.75 (1.26-17.97)	1	0.66 (0.10-4.01)
GG	9 (7.5)	2 (1.11)	3 (1.67)						
TBXAS1 rs2269997									
TT	29 (24.16)	50 (27.93)	69 (38.54)	0.7	1	0.002	1	0.02	1
TC	55 (45.83)	78 (43.57)	78 (45.37)		1.24 (0.70-2.19)		1.67 (0.96-2.92)		0.73 (0.45-1.19)
CC	36 (30)	51 (28.49)	32 (17.87)		1.26 (0.67-2.36)		2.67 (1.40-5.09)		0.47 (0.26-0.83)
TT+TC	84 (69.99)	128 (71.51)	147 (82.13)	0.87	0.92 (0.55-1.54)	0.02	1.96 (1.13-3.41)	0.02	0.54(0.33-0.90)
CC	36 (30)	51 (28.49)	32 (17.87)						

EREA- Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina, ACE-angiotensin I convertingenzyme, CI95%- Intervalo de confianza al 95%, GC- Grupo Control, *IL10*:interleucina 10, *MS4A2*-membrane spanning 4-domains A2, OR- Odds ratio, SNP- polimorfismo de un solo nucleótido, *TBXAS1*- thromboxane A synthase 1.

Segunda etapa

Datos clínicos y demográficos

En la segunda etapa fueron incluidos 104 pacientes con EREA, 107 con asma y 132 sujetos control; el género femenino presentó mayor proporción en los grupos de pacientes así como en el control (~70%), el grupo EREA tuvo la mediana de mayor edad en comparación con el grupo de asma ($p=0.005$) y control ($p=0.0001$). El conteo de eosinófilos obtuvo sus valores más altos en el grupo EREA vs. control /asma ($p<0.05$), en cambio los niveles de IgE fueron mayores en el grupo asma con respecto al de pacientes con EREA y controles ($p=0.037$ y $p=0.0001$) este rubro es acorde con la sensibilidad alérgica la cual demostró una tendencia similar ya que el mayor número de pacientes con esta cualidad se reportó en el grupo asma (81%) y fue superior en comparación con 28% en EREA ($p=0.001$) y 40% en el control ($p=0.001$). La función respiratoria de los pacientes y sujetos control se encontró en parámetros adecuados al evaluar el volumen espiratorio en el primer segundo ($>80\%$) y la reversibilidad fue ~12% en los pacientes que padecen asma ($p=0.10$) pero no al comparar EREA vs. grupo control ($p=0.001$) y asma vs. control ($p=0.001$). Tabla 1

Modelos genético codominante y recesivo

Se analizaron seis polimorfismos de un solo nucleótido contenidos en 4 genes asociados a riesgo reportados en la primera etapa (*IL10*- rs3024498, *TBXAS1*- rs2269997, *MS4A2*- rs2573790 y rs25502581 y *ACE*-4293 y rs4309), en los tres grupos de estudio, independientemente si existía o no asociación al riesgo en alguna de las tres comparaciones reportadas previamente.

Para los polimorfismos de *ACE*-rs4293 (G>A) y rs4309 (C>T), *IL10*- rs3024498 (C>T) y *TBXAS1* rs2269997 (A>G) no se demostró asociación estadística en ninguna

comparación ($p > 0.05$). En relación a los SNPs de *MS4A2*, rs573790 (C>T) / rs5502581 (G>T), el alelo C fue el alelo menor para los SNPs rs573790 y rs5502581; sin embargo, la adición de la doble dosis del alelo C en rs573790 demostró asociación estadística en el modelo codominante $p=0.008$, OR= 2.27 (0.85-6.03) y en el recesivo $p=0.03$, OR= 3 (1.17-7.68) a diferencia de la comparación de asma vs. GC donde solo obtuvo diferencia en el primer modelo $p=0.03$ 1.93 (0.71-5.22) y fue tendencial en el recesivo. Tabla 6

Tabla 6. Modelos genéticos co-dominante y recesivo en etapa 2

Gen /SNP	EREA	GC	Asma	EREA vs. GC		EREA vs. Asma		Asma vs.GC	
	104 (%)	132 (%)	107 (%)	<i>p</i>	OR (CI95%)	<i>p</i>	OR (CI95%)	<i>p</i>	OR (CI95%)
ACE rs4309									
TT	40(38.46)	44(37.33)	40(37.23)	0.65	1	0.58	1	0.25	1
CT	50(48.35)	66(50.00)	57(53.17)		0.83 (0.47-1.46)		0.87 (0.49-1.56)		0.95 (0.54-1.65)
CC	14(13.18)	22(16.66)	10(9.57)		0.70 (0.31-1.55)		1.40 (0.55-3.52)		0.50 (0.21-1.18)
TT+CT	90(86.54)	110(83.33)	97(90.67)	0.61	0.77 (0.37-1.60)	0.46	1.50 (0.63-3.56)	0.14	0.51 (0.23-1.14)
CC	14(13.46)	22(16.67)	10(9.35)						
T	130(62.50)	154(58.33)	137(64.02)	0.41	0.84 (0.57-1.21)	0.82	1.06 (1.71-1.58)	0.24	0.78 (0.54-1.14)
C	78(37.50)	110(41.67)	77(35.92)						
ACE rs4293									
AA	51 (49.03)	64 (48.48)	49 (45.79)	0.94	1	0.31	1	0.44	1
AG	40 (38.46)	53 (40.15)	50 (46.72)		0.94 (0.54-1.64)		0.76 (0.43-1.36)		1.23 (0.72-2.10)
GG	13 (12.5)	15 (11.36)	8 (7.47)		1.08 (0.47-2.49)		1.56 (0.59-4.09)		0.69 (0.27-1.77)
AA+AG	91 (87.5)	117 (88.63)	99 (92.52)	0.94	1.11 (0.50-2.45)	0.32	1.76 (0.70-4.46)	0.42	0.63 (0.25-1.54)
GG	13 (12.5)	15 (11.36)	8 (7.47)						
A	142(68.26)	181(68.56)	148(69.15)	1	1.01 (0.68-1.49)	0.92	1 (0.69-1.57)	0.96	0.97 (0.65-1.43)
G	66(31.73)	83(31.43)	66(30.84)						
MS4A2 rs573790									
TT	50 (48.07)	53 (40.15)	51 (47.66)	0.008	1	0.85	1	0.03	1
CT	39 (37.5)	72 (54.54)	43 (40.18)		0.57 (0.33-0.99)		0.92 (0.51-1.65)		0.62 (0.36-1.06)
CC	15 (14.42)	7 (5.33)	13 (12.14)		2.27 (0.85-6.03)		1.17 (0.50-2.72)		1.93 (0.71-5.22)
CT+TT	89 (85.57)	125 (94.69)	94 (87.85)	0.03	3 (1.17-7.68)	0.77	1.21 (0.54-2.70)	0.09	2.46 (0.94-6.43)
CC	15 (14.42)	7 (5.30)	13 (12.14)						
T	139(66.82)	178(67.42)	145(67.75)	0.96	1.02 (0.69-1.51)	0.92	1.04(0.69-1.56)	1	0.98 (0.67-1.44)
C	69(33.17)	86(32.57)	69(32.24)						

MS4A2 rs502581									
GG	61 (58.65)	84 (63.63)	73 (68.22)	0.33	1	0.34	1	0.31	1
GT	36 (34.61)	35 (26.51)	29 (27.10)		1.41 (0.80-2.50)		1.48 (0.81-2.69)		0.95 (0.53-1.70)
TT	7 (6.73)	13 (9.84)	5 (4.67)		0.74 (0.27-1.96)		1.67 (0.50-5.54)		0.44 (0.15-1.30)
GG+GT	97 (93.27)	119 (90.15)	102 (95.32)	0.53	0.66 (0.25-1.72)	0.72	1.47 (0.45-4.79)	0.2	0.44 (0.15-1.30)
TT	7 (6.73)	13 (9.84)	5 (4.67)						
G	158(75.96)	203(76.89)	175(81.77)	0.89	1.05 (0.68-1.61)	0.17	1.42(0.88-2.27)	0.23	0.74 (0.47-1.16)
T	50(24.03)	61(23.10)	39(18.22)						
IL10 rs3024498									
TT	75 (72.11)	89 (67.42)	77 (71.96)	0.43	1	0.52	1	0.69	1
CT	23 (22.11)	38 (28.78)	27 (13.77)		0.71 (0.22-0.74)		0.87 (0.46-1.65)		0.82 (0.45-1.46)
CC	6 (5.76)	5 (3.78)	3 (2.80)		1.42 (0.09-0.67)		2.05 (0.49-8.51)		0.69 (0.16-2.99)
TT+CT	98 (94.23)	127 (96.22)	104 (97.19)	0.54	1.5 (0.46-5.24)	0.46	2.12 (0.51-8.72)	0.73	0.73 (0.17-3.13)
CC	6 (5.76)	5 (3.78)	3 (2.80)						
T	173(83.17)	216(81.81)	181(84.57)	0.71	0.91 (0.56-1.47)	0.79	1.1(0.66-1.86)	0.49	0.82 (0.50-1.33)
C	35(16.82)	48(18.18)	33(15.42)						
TBXAS1rs757760									
GG	26 (25)	40 (30.30)	34 (31.77)	0.36	1	0.34	1	0.96	1
AG	57 (54.80)	60 (45.45)	48 (44.85)		1.46 (0.79-2.69)		1.55 (0.81-2.94)		0.94 (0.51-1.70)
AA	21 (20.19)	32 (24.24)	25 (23.36)		1 (0.48-2.11)		1.09 (0.50-2.37)		0.91 (0.45-1.84)
GG+AG	83 (79.80)	100 (75.76)	82 (76.63)	0.55	0.79 (0.42-1.47)	0.69	0.82 (0.43-1.59)	0.99	0.95 (0.52-1.73)
AA	21 (20.19)	32 (24.24)	25 (23.36)						
G	109 (52.4)	140(53.03)	116(54.2)	0.96	1.02 (0.71-1.47)	0.74	1.07 (0.73-1.57)	0.86	0.95 (0.66-1.36)
A	99(47.59)	124(46.96)	98(45.79)						

EREA- Enfermedad Respiratoria Exacerbada por Aspirina, ACE-angiotensin I convertingenzyme, CI95%- Intervalo de confianza al 95%, GC- Grupo Control, IL10: interleucina 10, MS4A2-membrane spanning 4-domains A2, OR- Odds ratio, SNP- polimorfismo de un solo nucleótido, TBXAS1- thromboxane A synthase 1.

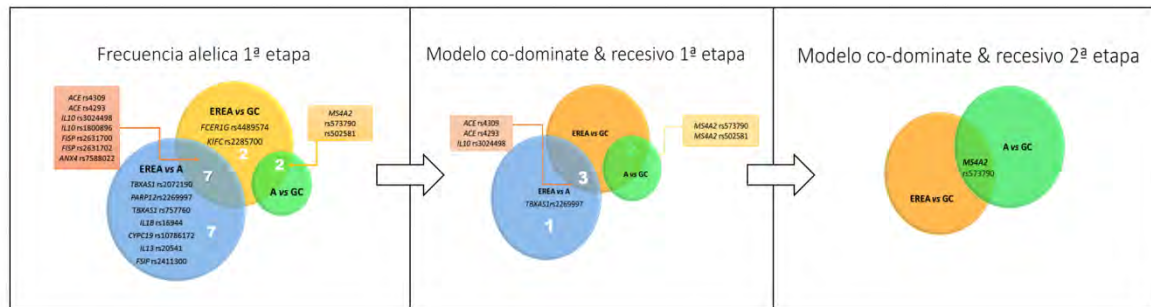


Figura 5. Progresión de los resultados de asociación genética en las dos etapas del estudio. ACE- angiotensin I converting enzyme, *IL10*- interleukin 10, *FISP*- interleukin 24, *ANX4*-annexin A4, *TBXAS1*- thromboxane A synthase 1, *PARP12*- poly(ADP-ribose) polymerase family member 12, *IL1B*- interleukin 1 beta, *CYP19*- Cytochrome P450 family 19, *IL13*- interleukin 13, *KIFC*- kinesin family member C3, *FCER1G*- Fc fragment of IgE receptor Ig, *MS4A2*- membrane spanning 4-domains A2.

Asociaciones clínico- genéticas

Se analizó la asociación del genotipo de riesgo (CC) del rs57370 en *MS4A2* con las variables clínicas entre los grupos de estudio, no se pudo establecer asociación con la edad, género, niveles de IgE, prueba de reversibilidad y sensibilización alérgica ($p > 0.05$); sin embargo, los sujetos de los grupos EREA y asma portadores del genotipo CC tenían un conteo de eosinófilos más alto que los sujetos control, lo que adquirió significancia estadística en la comparación de Asma vs. control ($p = 0.03$) y fue tendencial en EREA vs. Control ($p = 0.06$). Tabla.7

Tabla 7. Asociación del genotipo CC de rs573790 en MS4A2 con variables clínicas.

Variable	EREA	GC	Asma	EREA vs. GC	EREA vs.Asma	Asma vs. GC
n	15	7	13			
GeneroFemenino (%)	7 (46.6)	2 (28.5)	10 (76.9)	0.64	0.13	0.06
Edad > 42 años (%)	7 (46.6)	4 (57.1)	5 (38.46)	1	0.71	0.64
Eosinofiloscel/mm ³	400 (300-900)	170 (139-305)	550 (250-1050)	0.06	0.6	0.03
IgE UI/L	145 (56-306)	94 (24-168)	224 (88-455)	0.33	0.33	0.09
PC positiva n(%)	6 (40)	3 (42)	9 (69)	1	0.15	0.50
Prueba de reversibilidad%	10 (6-19)	5 (2-5)	10 (7-13)	0.10	0.87	0.05

GC- Grupo control, PC-Prueba cutánea, datos expresados en valores absolutos (frecuencias).

Discusión

La EREA es una entidad inflamatoria de la vía aérea unida (nasal y pulmonar), su fisiopatología se ha centrado en el estudio del metabolismo del ácido araquidónico, sin embargo, recientemente se han sido descrito otros mecanismos inflamatorios, como la participación de linfopoyetina estromal tímica (TSLP)(13), activación de células innatas tipo 2 (ICL-2) ó la participación del eje IL1/IL1R(12); en este contexto, los estudios de asociación genética han contribuido a fortalecer hallazgos previos como con el análisis de *LTC4S*(6) o describir nuevos genes con sus respectivos alelos de riesgo (*HLA-DPB1*) mediante tecnología de análisis de genoma completo, asociándolos inclusive con marcadores de pronóstico terapéutico (39), lamentablemente la mayoría de este tipo de estudios carece de replicación de sus hallazgos en otras poblaciones.(76)

En la presente tesis se analizaron 53 genes con sus respectivos SNP etiqueta y previamente reportados como asociados con EREA, describiéndose que el polimorfismo rs573790 del gen *MS4A2*(genotipo CC), fue el único en estar asociado a riesgo en ambas etapas de estudio.

En México no existen estimaciones de la prevalencia de la EREA, la presente tesis reúne alrededor de 234 casos reclutados en un periodo de diez años; diagnosticados de acuerdo al consenso de EREA establecido por las dos principales grupos de investigación en 2006, que postula la necesaria presencia o antecedente de las tres entidades que la integran (asma, rinosinusitis crónica con poliposis nasosinusal e intolerancia a la aspirina)(77) y no solo la presencia de asma con intolerancia a la aspirina, manejándose de manera habitual a la combinación de estas dos entidades como EREA en la mayoría de las publicaciones.

En el análisis de las características de nuestra población mexicana con EREA, los sujetos presentan cualidades similares a lo descrito en otras poblaciones como la edad de

diagnóstico alrededor de la quinta década(78), es importante señalar que el EREA no debuta con las tres entidades en este tiempo, sino que posee una historia natural, comenzando con la rinitis y subsecuentemente hacia la progresión del asma, la enfermedad polipoidea nasal tiene un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 años entre la rinitis y la PNS, en cambio la intolerancia a AINEs/ASA, caracterizada habitualmente por bronco-espasmo posterior su ingesta, aparece en cualquier momento durante éste transcurso de tiempo.(6)

El género femenino es el más afectado, estudios en modelos murinos han demostrado que la presencia de estrógenos inducen mayor síntesis de receptores para cysenil-leucotrienos (CysLT), mediador *de novo* y factor directamente implicado en la patogénesis del EREA.(79)

En nuestro estudio, los conteos de eosinófilos sanguíneos incrementados en pacientes con EREA en ambas etapas concuerdan con reportes epidemiológicos y estudios experimentales previos; además, en conjunto con los mastocitos, están relacionados con la síntesis de CysLT, proteína catiónica eosinofílica y otros péptidos involucrados en el daño a epitelio nasal y pulmonar; análisis de biopsias y lavados de mucosa nasal o bronquial han demostrado que existe incremento de marcadores de inflamación eosinofílica cuando se compara con pacientes con rinitis y asma sin intolerancia así también con la presencia de las estirpes celulares mencionadas(80)(81)

La sensibilidad alérgica es una condición que afecta aproximadamente hasta el 40% de la población mundial(82), siendo su principal enfermedad la rinitis alérgica, los pacientes con EREA no son ajenos a esta proporción, la mayoría de los estudios analiza esta variable, es probable que sea para realizar análisis estratificados para esta condición, la rinitis alérgica es indistinguible clínicamente de la rinitis del paciente con EREA(16) y por lo tanto puede coexistir con la rinosinusitis con poliposis nasosinusal debido al fenómeno

estadístico, es por ello que algunos estudios la ubican como la primera causa de poliposis nasosinusal(83), reportes actuales estiman que el 50% de los pacientes con EREA presentan algún tipo de sensibilidad, lo cual es un factor asociado, pero no causal ni relacionado, con cualquier pronóstico o evolución en EREA.(84)(85)

Los primeros artículos que evaluaban el asma en pacientes con EREA la consideraban como un asma difícil de controlar en el aspecto clínico (exacerbaciones frecuentes, altas dosis de medicamentos, alteración en calidad de vida), conforme se fue estudiando la EREA en sí, se fue observando que los pacientes presentan posterior a regímenes convencionales de tratamiento, adecuada respuesta clínica y por ende adecuada función pulmonar.(86)

El reto nasal con lisin-aspirina es un método diagnóstico reservado para evaluar aquellos pacientes con probable intolerancia a ASA o que presentan asma con poliposis nasosinusal sin intolerancia a aspirina, es un procedimiento seguro y puede ser considerado el primer paso para la desensibilización a ASA, sin embargo, se debe tener condiciones ideales nasales (pólipos de bajo grado) y pulmonares (control clínico de asma y función pulmonar adecuada) para su realización.(87) En la primera fase solo se incluyeron pacientes con reto positivo, sin embargo se ha demostrado que el antecedente de broncoespasmo por AINEs, adecuadamente documentado, iguala la sensibilidad diagnóstica de esta prueba (88), motivo por el cual los pacientes con EREA que participaron en la segunda fase de nuestro estudio solo debían poseer tal antecedente, acompañado de las otras dos características.

La presente investigación es un estudio replicativo de los principales hallazgos genéticos asociados a EREA, siendo la mayoría realizados en población asiática (Corea) y algunos reportes multicéntricos desarrollados en población de Europa; no es de extrañar que los polimorfismos de un solo nucleótido al ser las variantes genéticas más estudiadas fueron

también las primeras en ser evaluadas en aquellos genes que se relacionaban de manera directa con los mecanismos fisiopatológicos más comúnmente implicados en esta enfermedad; es así que en el año 1997, se tiene el primer registro de la asociación del gen *LTC4* con la EREA y su evolución ha derivado en últimos años a la realización de estudios de genoma completo con metodología GWAS.(89)

Como se había mencionado antes, una de las mayores limitantes de las publicaciones radica en que carecen de replicaciones en otras poblaciones, y la estratificación poblacional puede condicionar los hallazgos reportados por provenir de pacientes de un mismo grupo poblacional, genera la hipótesis *a priori* de que no sean del todo consistentes cuando se evalúan en segundas poblaciones y más aún cuando estas no tienen una contribución asiática tan importante (CHN-JPN), como la mexicana.

Con respecto al análisis de ancestría, los resultados de la primera etapa fueron acordes a lo referido por el proyecto de divulgación genómica del mestizo mexicano, ya que tienen una distribución similar a los dos principales grupos étnicos que integran a la población mexicana (amerindio 55% y caucásico 43%)(90), con lo que se concluyó que los sujetos de interés son mexicanos por análisis de AIMs, por lo que se excluyó este criterio de evaluación para la segunda etapa y sólo se reclutó a aquellos sujetos que tuvieran el antecedente de ancestría poblacional por interrogatorio.

En el presente estudio se realizó con la generación de un micorareglo a la medida con SNP etiqueta (tag SNP), de forma tal que no solo se evaluó el SNP previamente asociado, sino que se exploró todo el gen implicado al EREA, con ello se exploró el desequilibrio de ligamiento (LD) entre variantes genéticas, el cual sucede como resultado de la no segregación independiente de las mismas en los cromosomas de una población en particular, lo que ocasiona que dos o más variantes en posiciones físicas independientes se comporten como si fueran la misma, esta estrategia permitió minimizar el número de

variantes para obtener el máximo de cobertura en las regiones genómicas analizadas, reduciendo tiempos y costos.(91)

Se optó por un estudio multietapas (dos etapas) con el objetivo de disminuir los falsos positivos mediante análisis de replicación y validación de los hallazgos de asociación, con la condicionante de que la segunda etapa se realizó con una *segunda* población de casos y controles diferentes a la primera. Así también se utilizó una plataforma GoldenGate cuya bondad radica en que es una técnica donde se pueden evaluar cientos de SNPs en un solo procedimiento.(92)

Debido a la manera de cómo fue estructurado el análisis estadístico entre los grupos de estudio, (EREA vs. grupo control-C1, EREA vs. asma-C2 y asma vs. grupo control-C3) el análisis de las frecuencias alélicas obtenidas por PLINK demostró que existe asociación al riesgo en EREA en 16 SNPs cuando se contrastó el grupo de interés (EREA) vs. los grupos de comparación (C1 y C2).

De manera didáctica se ha tratado de organizar a los SNPs involucrados en EREA de acuerdo algún mecanismo fisiopatológico como: inflamación, daño epitelial, señalización intracelular, HLA, metabolismo farmacológico y metabolismo del ácido araquidónico,(89) siguiendo esta clasificación, el rs10786172 de *CYP2C19* perteneciente al grupo de metabolismo farmacológico y *KIFC3* con *FSIP1* relacionados con daño epitelial fueron los únicos representantes de esos grupos; de forma particular destacó el rs16944 en *IL1B*, el cual fue el primer SNP reportado como asociado en población mexicana con EREA(55), al compararlo con el grupo asma, y consistentemente replicó con significancia estadística. Sin embargo, todos los SNPs previamente descritos no soportaron corrección al ser evaluados por modelos genéticos.

Solo 1 SNP de los 311 está involucrado en la vía del ácido araquidónico en ambas comparaciones, el rs777760 en *TBXAS1*, tradicionalmente se ha establecido a las proteínas de esta vía metabólica y por ende a sus genes, sobre todo a *LTC4S* y *ALOX1* como aquellos implicados de manera directa con la enfermedad, sin embargo la poca evidencia en estudios replicativos, arroja resultados no consistentes con la asociación (24,25,27), lo cual también se corroboró en la presente tesis.

Los polimorfismos localizados en genes relacionados con mecanismos inflamatorios fueron el grupo que más SNPs aportaron (*ACE*, *MS4A2*, *IL10*, *IL1B*, *FCERIG* y *ANX4*), pero solo 5 SNPs contenidos en 4 genes soportaron la asociación al riesgo al ser analizados por los modelos codominante y recesivo: rs4309 y rs4293 en *ACE*, rs573790 y rs502581 en *MS4A2*, rs3024498 en *IL10* y rs2269997 en *TBXAS1*.

El alelo C del rs4309 localizado en *ACE*, es el principal polimorfismo asociado a riesgo en EREA en las comparaciones C1 y C2 además de ser el único SNP que mantuvo significancia estadística al corregir por Bonferroni. *ACE*, localizado en el cromosoma 17 q23, codifica para la proteína del mismo nombre, sus funciones están implicadas en el metabolismo de la bradicinina, péptido vasoactivo relacionado con el incremento de la permeabilidad vascular, vasoconstrictor a nivel de la musculatura lisa pulmonar, el cual activa a la fosfolipasa A2 e incrementa el metabolismo del ácido araquidónico; su regulación (degradación) depende de proteínas del plasma como ACE o Kininase II.(60)

El rs2269997 localizado en el gen *TBXAS1* (Tromboxano AS1 sintasa), está en el cromosoma 7q33-q34, codifica para la proteína del mismo nombre, su función consiste en catalizar la conversión de prostaglandina endoperoxido en tromboxano A2, derivado del metabolismo del ácido araquidónico a través de la vía de la cicloxigenasa tipo 1(COX-1). Los tromboxanos son proteínas involucradas en procesos hemostáticos y sintetizados predominantemente por las plaquetas; en la EREA, mínimas dosis de ácido acetil

salicílico inhiben a esta enzima y por ende su síntesis, pero en eosinófilos y basófilos se activa una enzima similar (COX-2) que restituye su producción, contribuyendo a la broncoconstricción y el reclutamiento de leucocitos perpetuando el estado inflamatorio.(93)

IL10 es una citocina multifuncional producida por numerosas células inmunes, es un potente factor de crecimiento y diferenciación en Linfocitos B activados, que pueden contribuir a la gravedad de algunas enfermedades de tipo alérgico. La expresión de ARNm de IL-10 en el lavado bronquioloalveolar es elevado en sujetos con asma atópica en comparación con sujetos control sin asma, el polimorfismo 1082A/G se asoció con la condición de intolerancia, así también con la presencia de rinosinusitis (característica esencial para el diagnóstico de EREA).(94)

MS4A2 localizado en 11q12.1, codifica para la cadena β del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcERI), la cadena β está involucrada en la señalización intracelular de este receptor para la liberación de los mediadores preformados contenidos en los gránulos de los eosinófilos, mastocitos y basófilos, vía interacción con calmodulina dependiente de calcio; la cadena β es considerada un marcador de maduración para estas células, su asociación clínica está directamente relacionada con etiologías de tipo alérgico.(64)

En términos de epidemiología genética, existen metaanálisis de polimorfismos en *MS4A2* y su asociación con asma, en sujetos asiáticos no se encontró ninguna asociación del cambio E237G con la enfermedad o su fenotipo atópico; sin embargo, el SNP -109 C/T en el asma tiene un riesgo menor con la enfermedad basada en el alelo (C vs.T), mientras que no hay evidencia de asociación en modelos genéticos. Kim y su grupo encontraron que el polimorfismo -109T>C (TT vs. TC + CC) están asociados con el riesgo en pacientes

con EREA (con enterotoxina estafilocócica B) vs. ATA y con el grupo de control en una población coreana.

MS4A2 se ha evaluado en pacientes latinos con asma (puertorriqueños y mexicanos provenientes de México y residentes en Los Angeles California en Estados Unidos de América) como parte de un estudio genético replicativo sobre el asma. Galanter y colaboradores demostraron que este gen se asoció con el asma en mexicanos, pero no en los puertorriqueños(95).

El SNP asociado en el presente estudio (rs573790) está localizado en la región 5'UTR del gen *MS4A2*, como previamente se mencionó es de tipo sinónimo, este tipo de polimorfismo se localiza en una región no codificante, por lo general relacionada con la alteración en la función o la estructura del ARN; sin embargo, no detectamos que esté implicado en algún proceso de esta clase utilizando software específicos.

Cabe mencionar que la mayoría de los polimorfismo asociados al riesgo están en regiones no codificantes, a excepción del rs4309 en *ACE*, este SNP se encuentra en región codificante (exón) el cual es sinónimo (el cambio de nucleótido *no* altera la secuencia de aminoácidos de la proteína), los polimorfismos rs30244928 en *IL10* y rs2269997 en *TBXAS1* se localizaron en regiones 3'UTR y el rs573790 en *MS4A2* en 5'UTR, estos polimorfismos en regiones no traducidas afectan la estructura y función de los ARN, incluyendo el corte y empalme, la estabilidad de los ARNm, su poliadenilación, así como la regulación de la traducción de los ARNm a proteínas y la funcionalidad de las mismas, es por eso que se les denomina polimorfismos estructurales (srSNP), al realizar un análisis in silico no demostraron relación con microRNA (miRNAs) o con sitios de splicing alternativo.

Interesantemente, la frecuencia alélica de los polimorfismos que mantuvieron la asociación por modelos genéticos en los sujetos del grupo control es menor a lo reportada en la base de datos de la biblioteca del *US National Library of Medicine of National Institutes of Health* cuando se compara con el grupo de mexicanos residentes en Los Ángeles California E.U.A. y es aún menor en los sujetos con ancestría chino-japonesa, lo que hace suponer la hipótesis de estratificación genética-poblacional de los hallazgos reportados.

Así mismo ninguno de los alelos que se asociaron en la primera etapa y que fueron validados no estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo anterior se puede deber al poco grado de mestizaje que compone a la estructura genética de la población, la cual aún es joven, no mayor a 500 años (mezcla entre caucásicos y nativos americanos).(96)

El número de SNPs asociados en este proyecto de investigación es similar a lo reportado por otros grupos que usan similares estrategias metodológicas clínico-genéticas aplicadas en otras enfermedades, como en el caso de cáncer de mama con la asociación del rs8752 en *HPGD* (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) el cual es sujeto a inhibición por parte de un microRNA (miR-485-5p), en esta investigación en la etapa uno se identificaron 15 SNPs, pero solo el correspondiente al gen *HPGD* fue el único que se asoció en ambas etapas, o la asociación de los genes que codifican para el complejo proteico implicado en la señalización intracelular JAK-STAT6 en pacientes con cáncer cérvico-uterino, siendo entre un pool de 11 genes, pero solo 2 SNPs se asociaron con la enfermedad(97)

Los resultados estadísticos generados en la primera etapa, principalmente en *ACE* lo hizo acreedor a establecer hipótesis *a priori* de ser el principal candidato a mantener su asociación en la segunda etapa, sin embargo, al reanalizar la secuencia donde está localizado el alelo, se encontró que mediante análisis in silico el alelo C está rodeado por un amplio número de islas CpG (>60%), este tipo de región de DNA es resistente a la

desnaturalización y es difícil de hibridar cebadores en PCR convencional; por lo tanto, pudo no ser la técnica ideal para validar este hallazgo, es probable que al analizarla por técnicas como secuenciación sea posible demostrar su asociación (98).

En nuestro estudio se presentó como objetivo principal validar algún gen que pudiera ser de riesgo en la población mexicana y que previamente estuviera asociado en otra población, desafortunadamente el hallazgo no se pudo asociar con algún desenlace clínico, terapéutico u otro rasgo fenotípico cuantitativo; ya que los pacientes con EREA y asma no fueron reclutados al mismo tiempo, a los pacientes seleccionados no se les realizó algún tipo de periodo de lavado terapéutico (*washout*) debido a las consideraciones inherentes al estado de salud que pudiera desarrollar cada pacientes a consecuencia de esta decisión, no se les pudo homogenizar el tratamiento ya que cada paciente, presentaba un estado de gravedad (nasal, pulmonar o sistémico) diferente entre sí, además de que el costo del tratamiento es algo que no se encontraba en el presupuesto de la investigación, ejemplo de ello fue el uso de esteroides orales para el tratamiento de pólipos nasales (99), esta variable no considerada podría influir en la disminución del recuento de eosinófilos (100) en este grupo, haciendo el análisis no significativo entre EREA vs. GC.

La mayoría de los estudios de asociación genética que han evaluado SNPs, concluyen que los polimorfismos están asociados con el decremento del VEF₁ posterior a la administración de ASA o AINEs, sin embargo, este análisis es tendencioso ya que para ello se debe establecer primero la condición de intolerancia a través de reto bronquial con ASA (característica fundamental del diagnóstico en EREA) en un grupo con EREA.

Es posible que los resultados genéticos estén condicionados al tamaño de muestra, el SNP de *MS4A2* asociado es reportado por Hae Sin Park en 2006 (101), se propone para futuras investigaciones en este ámbito realizar un análisis de genoma completo (GWAS)

del paciente mexicano con EREA, para identificar genes y correspondientes SNP candidatos exclusivos de la población mexicana y posteriormente realizar colaboraciones multicéntricas para comparar los resultados con otras poblaciones, así mismo realizar estudios de expresión de proteínas, traducción de RNAm y ensayos de función que fortalezcan las conclusiones genéticas.

La EREA es un fenotipo particular de asma y una entidad que tiene que considerarse para su estudio en todo paciente con poliposis nasosinusal e intolerancia a AINEs/ASA, la baja prevalencia de la EREA ha conllevado al escaso conocimiento por el médico de primer contacto, factor que repercute en el desarrollo de los estudios de investigación y por lo tanto en la generación del conocimiento que coadyuva a una mejor comprensión de los procesos genéticos, moleculares, metabólico y clínico-terapéuticos, en beneficio de los pacientes con esta entidad.

Conclusión

El rs573790 en el gen *MS4A2* es el único SNP que se asocia con EREA en pacientes mestizos mexicanos.

Bibliografia

1. Samter M, Beers RF. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1968 May;68(5):975–83.
2. Lee RU, Stevenson DD. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Evaluation and management. *Allergy, Asthma Immunol Res [Internet].* 2010;3(1):3–10. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78650647296&partnerID=40&md5=e2363c55f8cb0a7c0e73cefc4b62cbfb>
3. Jenkins C, Costello J, Hodge L. Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. *BMJ.* 2004 Feb;328(7437):434.
4. Szczeklik A, Gryglewski RJ, Czerniawska-Mysik G. Clinical patterns of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 1977;60(5):276–84.
5. Dovizio M, Tacconelli S, Sostres C, Ricciotti E, Patrignani P. Mechanistic and pharmacological issues of aspirin as an anticancer agent. *Pharmaceuticals.* 2012;5(12):1346–71.
6. Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. Vol. 533, *European Journal of Pharmacology.* 2006. p. 145–55.
7. Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res [Internet].* 2004;50(1):1–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661803004213>
8. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, et al. Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E2 in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J Allergy Clin Immunol.*

2011;128(1):66–72.

9. Cahill KN, Raby BA, Zhou X, Guo F, Thibault D, Baccarelli A, et al. Impaired E prostanoïd2 expression and resistance to prostaglandin E2 in nasal polyp Fibroblasts from subjects with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(1):34–40.
10. Corrigan CJ, Napoli RL, Meng Q, Fang C, Wu H, Tochiki K, et al. Reduced expression of the prostaglandin E2 receptor E-prostanoïd 2 on bronchial mucosal leukocytes in patients with aspirin-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(6):1636–46.
11. Liu T, Laidlaw TM, Katz HR, Boyce J a. Prostaglandin E2 deficiency causes a phenotype of aspirin sensitivity that depends on platelets and cysteinyl leukotrienes. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2013;110(42):16987–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3801005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Machado-Carvalho L, Martín M, Torres R, Gabasa M, Alobid I, Mullol J, et al. Low E-prostanoïd 2 receptor levels and deficient induction of the IL-1??/IL-1 type i receptor/COX-2 pathway: Vicious circle in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):99–107.e7.
13. Buchheit KM, Cahill KN, Katz HR, Murphy KC, Feng C, Lee-Sarwar K, et al. Thymic stromal lymphopoietin controls prostaglandin D2 generation in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1566–1576e5.
14. Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczyńska M, Picado C, Scadding G, et al. EAACI/GA2LEN guideline: aspirin provocation tests for diagnosis

of aspirin hypersensitivity. *Allergy* [Internet]. 2007 Oct [cited 2018 Jul 25];62(10):1111–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2007.01409.x>

15. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention.(update 2016) [Internet]. Available at: www.ginasthma.org. 2016. Available from: www.ginasthma.org
16. Thomas M, Yawn B, Price D, Lund V, Mullol J, Fokkens W. EPOS primary care guidelines: European Position Paper on the primary care diagnosis and management of Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007 - A summary. Vol. 17, *Primary Care Respiratory Journal*. 2008. p. 79–89.
17. Dahl??n SE, Malmstr??m K, Nizankowska EWA, Dahl??n B, Kuna P, Kowalski M, et al. Improvement of aspirin-intolerant asthma by montelukast, a leukotriene antagonist: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(1):9–14.
18. Theron AJ, Steel HC, Tintinger GR, Gravett CM, Anderson R, Feldman C. Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function. Vol. 2014, *Journal of Immunology Research*. 2014.
19. Berges-Gimeno MP, Simon RA, Stevenson DD. Long-term treatment with aspirin desensitization in asthmatic patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):180–6.
20. Katial RK, Strand M, Prasertsuntarasai T, Leung R, Zheng W, Alam R. The effect of aspirin desensitization on novel biomarkers in aspirin-exacerbated respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):738–44.

21. Wang XS, Wu AYY, Leung PS, Lau HYA. PGE2 suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leucotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(6):620–7.
22. Sánchez-Borges M. NSAID Hypersensitivity (Respiratory, Cutaneous, and Generalized Anaphylactic Symptoms). Vol. 94, *Medical Clinics of North America*. 2010. p. 853–64.
23. Bigby TD, Hodulik CR, Arden KC, Fu L. Molecular cloning of the human leukotriene C4 synthase gene and assignment to chromosome 5q35. *Mol Med [Internet]*. 1996;2(5):637–46. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8898379
24. Penrose JF, Baldasaro MH. Leukotriene C4 synthase: a candidate gene for the aspirin-intolerant asthmatic phenotype. Vol. 20, *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 1999. p. 353–60.
25. Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. Vol. 350, *Lancet (London, England)*. England; 1997. p. 1599–600.
26. Van Sambeek R, Stevenson DD, Baldasaro M, Lam BK, Zhao J, Yoshida S, et al. 5' Flanking region polymorphism of the gene encoding leukotriene C4 synthase does not correlate with the aspirin-intolerant asthma phenotype in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(1 I):72–6.
27. Arima H, Aguilera G. Vasopressin and oxytocin neurones of hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei co-express mRNA for Type-1 and Type-2

- corticotropin-releasing hormone receptors. *J Neuroendocrinol.* 2000 Sep;12(9):833–42.
28. Kawagishi Y, Mita H, Taniguchi M, Maruyama M, Oosaki R, Higashi N, et al. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(6):936–42.
29. Choi JH, Park HS, Oh HB, Lee JH, Suh YJ, Park CS, et al. Leukotriene-related gene polymorphisms in ASA-intolerant asthma: An association with a haplotype of 5-lipoxygenase. *Hum Genet.* 2004;114(4):337–44.
30. Park JS, Chang HS, Park C-S, Lee J-H, Lee YM, Choi JH, et al. Association analysis of cysteinyl-leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics. *Pharmacogenet Genomics [Internet].* 2005;15(7):483–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970796>
31. Kim SH, Bae JS, Suh CH, Nahm DH, Holloway JW, Park HS. Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: A positive association with airway hyperresponsiveness. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2005;60(6):760–5.
32. Bouzigon E, Dizier MH, Krähenbühl C, Lemainque A, Annesi-Maesano I, Betard C, et al. Clustering patterns of LOD scores for asthma-related phenotypes revealed by a genome-wide screen in 295 French EGEA families. *Hum Mol Genet.* 2004;13(24):3103–13.
33. Kim SH, Choi JH, Park HS, Holloway JW, Lee SK, Park CS, et al. Association of thromboxane A2 receptor gene polymorphism with the phenotype of acetyl salicylic acid-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(5):585–90.

34. Kohyama K, Hashimoto M, Abe S, Kodaira K, Yukawa T, Hozawa S, et al. Thromboxane A₂ receptor +795T>C and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells -466T>C gene polymorphisms in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Mol Med Rep.* 2012;5(2):477–82.
35. Cortesina G, De Stefani A, Galeazzi E, Cavallo GP, Jemma C, Giovarelli M, et al. Interleukin-2 injected around tumor-draining lymph nodes in head and neck cancer. *Head Neck.* 1991;13(2):125–31.
36. Wang D, Levasseur-Acker GM, Jankowski R, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Charron D, et al. HLA class II antigens and T lymphocytes in human nasal epithelial cells. Modulation of the HLA class II gene transcripts by gamma interferon. *Clin Exp Allergy.* 1997 Mar;27(3):306–14.
37. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2000 Mar;110(3 Pt 1):422–5.
38. Shin S-WW, Park BL, Chang H, Park JS, Bae D-JJ, Song H-JJ, et al. Exonic variants associated with development of aspirin exacerbated respiratory diseases. Lee YL, editor. *PLoS One [Internet].* 2014 Nov 5 [cited 2017 Feb 16];9(11):e111887. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111887>
39. Kim SH, Cho BY, Choi H, Shin ES, Ye YM, Lee JE, et al. The SNP rs3128965 of HLA-DPB1 as a genetic marker of the AERD phenotype. *PLoS One.* 2014;9(12):1–10.
40. Esmailzadeh H, Nabavi M, Amirzargar AA, Aryan Z, Arshi S, Bemanian MH, et al. HLA-DRB and HLA-DQ genetic variability in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29(3):e63-9.

41. Esmailzadeh H, Nabavi M, Aryan Z, Akbar A. Pharmacogenetic tests to predict the efficacy of aspirin desensitization in patients with aspirin-exacerbated respiratory diseases ; HLA-DQB302. *Expert Rev Respir Med*. 2015;9(5):511–8.
42. Gadola SD, Moins-Teisserenc HT, Trowsdale J, Gross WL, Cerundolo V. TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2000 Aug;121(2):173–8.
43. Ismail a, Bousaffara R, Kaziz J, Zili J, el Kamel a, Tahar Sfar M, et al. Polymorphism in transporter antigen peptides gene (TAP1) associated with atopy in Tunisians. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(2):216–23.
44. Kim J-H, Park B-L, Pasaje CFA, Bae JS, Park JS, Park SW, et al. Genetic association analysis of TAP1 and TAP2 polymorphisms with aspirin exacerbated respiratory disease and its FEV1 decline. *J Hum Genet [Internet]*. 2011 Sep 28 [cited 2017 Feb 16];56(9):652–9. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jhg.2011.75>
45. Lee JS, Bae JS, Kim J-HHJY, Kim J-HHJY, Park TJ, Pasaje CF, et al. Association study between TRIM26 polymorphisms and risk of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Int J Mol Med [Internet]*. 2012 May 26 [cited 2017 Feb 16];29(5):927–33. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2012.898>
46. Pasaje CFA, Bae JS, Park B-L, Cheong HS, Jang A-S, Uh S-T, et al. A possible association between ZNRD1 and aspirin-induced airway bronchoconstriction in a Korean population. *J Investig Allergol Clin Immunol [Internet]*. 2012 [cited 2017 Feb 16];22(3):193–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697009>
47. Kikuchi K, Abe S, Kodaira K, Yukawa T, Hozawa S, Mochizuki H, et al. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Japanese patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Investig Med*. 2013;61(4):708–14.

48. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655–69.
49. Akahoshi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, et al. Functional promoter polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma. *Hum Genet*. 2005;117(1):16–26.
50. Kim S-H, Yang E-M, Lee H-N, Choi G-S, Ye Y-M, Park H-S. Association of the CCR3 gene polymorphism with aspirin exacerbated respiratory disease. *Respir Med* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Feb 16];104(5):626–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611109003886>
51. Pasaje CFA, Bae JS, Park B-L, Cheong HS, Jang A-S, Uh S-T, et al. Lack of association between CD58 genetic variations and aspirin-exacerbated respiratory disease in a Korean population. *J Asthma*. 2011;48(6):539–45.
52. Kohyama K, Abe S, Kodaira K, Yukawa T, Hozawa S, Sagara H, et al. IL-13 and IL-17A gene polymorphisms in Japanese patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 Dec;107(6):510–6.
53. Otto B a, Wenzel SE. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2008;16(3):270–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18475084>
54. Erbek SS, Yurtcu E, Erbek S, Atac FB, Sahin FI, Cakmak O. Proinflammatory cytokine single nucleotide polymorphisms in nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2007;133(7):705–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17638785>

55. Falfán-Valencia R, Pavón-Romero GF, Camarena A, García M de la L, Galicia-Negrete G, Negrete-García MC, et al. The IL1B-511 Polymorphism (rs16944 AA Genotype) Is Increased in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease in Mexican Population. *J Allergy*. 2012;2012:1–5.
56. Park JS, Park BL, Kim M-KM-O, Heo J-S, Jung J-S, Bae D-J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms on Interleukin 17 receptor A (IL17RA) gene with aspirin hypersensitivity in asthmatics. *Hum Immunol*. 2013 May;74(5):598–606.
57. Losol P, Kim S-H, Shin YS, Ye YM, Park H-S. A genetic effect of IL-5 receptor α polymorphism in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Exp Mol Med [Internet]*. 2013;45(3):e14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3641394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Wu G, Yussman MG, Barrett TJ, Hahn HS, Osinska H, Hilliard GM, et al. Increased Myocardial Rab GTPase Expression: A Consequence and Cause of Cardiomyopathy. *Circ Res [Internet]*. 2001;89(12):1130–7. Available from: <http://0-circres.ahajournals.org.wam.leeds.ac.uk/content/89/12/1130.full>
59. Park J-S, Heo J-S, Chang HS, Choi IS, Kim M-K, Lee J-U, et al. Association analysis of member RAS oncogene family gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients. *DNA Cell Biol*. 2014 Mar;33(3):155–61.
60. Kim T-HH, Chang H-SS, Park S-MM, Nam B-YY, Park J-SS, Rhim T, et al. Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 2008 Nov;38(11):1727–37.
61. Lee EH, Park BL, Park SM, Lee SH, Park SW, Park JS, et al. Association analysis of RGS7BP gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients. *Ann*

- Allergy, *Asthma Immunol.* 2011;106(4):292–300.
62. Israel E, Drazen JM, Liggett SB et al. The effect of polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:75–80.
63. Kohyama K, Abe S, Kodaira K, Yukawa T, Hozawa S, Morioka J, et al. Arg16Gly beta2-adrenergic receptor gene polymorphism in Japanese patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011;156(4):405–11.
64. Kim SH, Bae JS, Holloway JW, Lee JT, Suh CH, Nahm DH, et al. A polymorphism of MS4A2 (-1090T > C) encoding the β -chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc ϵ R1 β) is associated with a susceptibility to aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy [Internet].* 2006 Jul [cited 2018 Jul 25];36(7):877–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2006.02443.x>
65. Kim H-J, Lee Y-H, Im S-A, Kim K, Lee C-K. Cyclooxygenase Inhibitors, Aspirin and Ibuprofen, Inhibit MHC-restricted Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Immune Netw [Internet].* 2010;10(3):92–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2902675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Lee JS, Bae JS, Kim J-H, Kim JY, Park TJ, Pasaje CFA, et al. Effect of diffuse panbronchiolitis critical region 1 polymorphisms on the risk of aspirin-exacerbated respiratory disease in Korean asthmatics. *Respir Care.* 2012;57(5):758–63.
67. Nicchia E, Benedicenti F, De Rocco D, Greco C, Bottega R, Inzana F, et al. Clinical aspects of Fanconi anemia individuals with the same mutation of FANCF identified by next generation sequencing. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015 Dec;103(12):1003–10.

68. Kim J-H, Park B-L, Pasaje CFA, Bae JS, Park JS, Park SW, et al. Association of FANCC polymorphisms with FEV1 decline in aspirin exacerbated respiratory disease. *Mol Biol Rep.* 2012 Mar;39(3):2385–94.
69. Pasaje CFA, Bae JS, Park B-L, Kim J-H, Cheong HS, Uh S-T, et al. Genetic variations in KIFC1 and the risk of aspirin exacerbated respiratory disease in a Korean population: an association analysis. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):5913–9.
70. Feng H, Lopez GY, Kim CK, Alvarez A, Duncan CG, Nishikawa R, et al. EGFR phosphorylation of DCBLD2 recruits TRAF6 and stimulates AKT-promoted tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014;124(9):3741–56.
71. Park T-J, Kim J, Park B, Cheong HS, Bae JS, Pasaje CF, et al. Potential association of DCBLD2 polymorphisms with fall rates of FEV(1) by aspirin provocation in Korean asthmatics. *J Korean Med Sci.* 2012 Apr;27(4):343–9.
72. Yau T, Dan X, Ng CCW, Ng TB. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules [Internet].* 2015;20(3):3791–810. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/3/3791/htm>
73. Park T-J, Kim J-H, Bae JS, Park B-L, Cheong HS, Pasaje CF, et al. Potential association between ANXA4 polymorphisms and aspirin-exacerbated respiratory disease. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(3):164–71.
74. Park T-J, Kim J-H, Pasaje CF, Park B-L, Bae JS, Uh S-T, et al. Polymorphisms of ATF6B Are Potentially Associated With FEV1 Decline by Aspirin Provocation in Asthmatics. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014 Mar;6(2):142–8.
75. Park BL, Kim T-H, Kim J-H, Bae JS, Pasaje CFA, Cheong HS, et al. Genome-wide association study of aspirin-exacerbated respiratory disease in a Korean population.

- Hum Genet [Internet]. 2013 Mar;132(3):313–21. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180272>
76. Dahlin A, Weiss ST. Genetic and Epigenetic Components of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016 Nov;36(4):765–89.
77. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2018 Jul 25];118(4):773-86-8. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674906015703>
78. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. 2000 Sep;16(3):432–6.
79. Rossi A, Pergola C, Pace S, Rådmark O, Werz O, Sautebin L. In vivo sex differences in leukotriene biosynthesis in zymosan-induced peritonitis. *Pharmacol Res* [Internet]. 2014 Sep [cited 2018 Aug 7];87:1–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24892983>
80. Fuentes-Beltrán A, Montes-Vizuet R, Valencia-Maqueda E, Negrete-García MC, García-Cruz M de L, Teran LM. Chemokine CC-ligand 5 production and eosinophil activation into the upper airways of aspirin-sensitive patients. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2009 Apr [cited 2018 Aug 7];39(4):491–9. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2222.2008.03190.x>
81. Kupczyk M, Kurmanowska Z, Kupryś-Lipińska I, Bocheńska-Marciniak M, Kuna P. Mediators of inflammation in nasal lavage from aspirin intolerant patients after aspirin challenge. *Respir Med* [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 Aug 7];104(10):1404–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611110001964>

82. Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, Bachert C, Bindslev-Jensen C, Bonini S, et al. GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy* [Internet]. 2009 Oct [cited 2018 Jul 25];64(10):1498–506. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2009.02093.x>
83. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Jul 25];50(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469599>
84. Settipane RA, Peters AT, Chiu AG. Chapter 6: Nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy* [Internet]. 2013 May [cited 2018 Jul 25];27 Suppl 1(3_suppl):S20-5. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2500/ajra.2013.27.3926>
85. Riechelmann H, Europäischen Akademie für Allergie und Klinische Immunologie (EAACI) und der European Rhinologic Society (ERS). [Chronic Rhinosinusitis - EPOS 2012 Part I]. *Laryngorhinootologie* [Internet]. 2013 Mar 21 [cited 2018 Jul 25];92(3):193-201-3. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1333704>
86. Bochenek G, Szafraniec K, Kuschill-Dziurda J, Nizankowska-Mogilnicka E. Factors associated with asthma control in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Respir Med*. 2015 May;109(5):588–95.
87. Waldram JD, Simon RA. Performing Aspirin Desensitization in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2016 Nov [cited 2018 Jul 25];36(4):693–703. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889856116300510>

88. Nizankowska-Mogilnicka E, Bochenek G, Mastalerz L, Swierczynska M, Picado C, Scadding G, et al. No Title. *Allergy*. 2007 Oct;62(10):1111–8.
89. Pavon-Romero GF, Ramirez-Jimenez F, Roldan-Alvarez MA, Teran LM, Falfan-Valencia R. Physiopathology and genetics in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Exp Lung Res*. 2017 Oct;43(8):327–35.
90. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 May 26 [cited 2018 Jul 25];106(21):8611–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903045106>
91. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2005 Sep [cited 2018 Jul 25];366(9491):1121–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605674247>
92. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* [Internet]. 2008 Mar 19 [cited 2018 Jul 25];299(11):1335–44. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.299.11.1335>
93. Oh S-H, Kim Y-H, Park S-M, Cho S-H, Park J-S, Jang A-S, et al. Association analysis of thromboxane A synthase 1 gene polymorphisms with aspirin intolerance in asthmatic patients. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Jul 25];12(3):351–63. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.10.181>
94. Palikhe NS, Kim S-H, Jin HJ, Nam Y-H, Park H-S. Association of interleukin 10 promoter polymorphism at -819 T>C with aspirin-induced urticaria in a Korean population. *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2018 Jul

25];107(6):544–6. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1081120611006570>

95. Galanter JM, Torgerson D, Gignoux CR, Sen S, Roth LA, Via M, et al. Cosmopolitan and ethnic-specific replication of genetic risk factors for asthma in 2 Latino populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jul;128(1):37–43.e12.
96. Pérez-Rubio G, Silva-Zolezzi I, Fernandez-Lopez JC, Camarena A, Velazquez-Uncal M, Morales-Mandujano F, et al. Genetic Variants in IL6R and ADAM19 are Associated with COPD Severity in a Mexican Mestizo Population. *COPD*. 2016 Oct;13(5):610–5.
97. He N, Zheng H, Li P, Zhao Y, Zhang W, Song F, et al. miR-485-5p binding site SNP rs8752 in HPGD gene is associated with breast cancer risk. Christensen B, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 8 [cited 2018 Jul 25];9(7):e102093. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0102093>
98. Li L-CC, Dahiya R. MethPrimer: Designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* [Internet]. 2002 Nov [cited 2018 Jul 25];18(11):1427–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112>
99. Poetker DM. Oral corticosteroids in the management of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: Risks and benefits. *Am J Rhinol Allergy* [Internet]. 2015 Sep [cited 2018 Jul 25];29(5):339–42. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2500/ajra.2015.29.4223>
100. Sousa AR, Marshall RP, Warnock LC, Bolton S, Hastie A, Symon F, et al. Responsiveness to oral prednisolone in severe asthma is related to the degree of eosinophilic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2017 Jul [cited 2018 Jul 25];47(7):890–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cea.12954>

101. Kim S-H, Bae J-S, Holloway JW, Lee J-T, Suh C-H, Nahm D-H, et al. A polymorphism of MS4A2 (- 109T > C) encoding the beta-chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcepsilonR1beta) is associated with a susceptibility to aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jul;36(7):877–83.

