

## ORIGINALES

### Asociación entre los polimorfismos genéticos de las citocinas proinflamatorias y la susceptibilidad a la otitis media

Janak A. Patel, MD<sup>a</sup>, Sangeeta Nair, DVM<sup>a</sup>, Krystal Revai, MD<sup>a</sup>, James Grady, DrPh<sup>b</sup>, Kokab Saeed, MD<sup>a</sup>, Reuben Matalon, MD<sup>a</sup>, Stan Block, MD<sup>c</sup>, y Tasnee Chonmaitree, MD<sup>a</sup>

**OBJETIVO:** La susceptibilidad a la otitis media (OM) es consecuencia de complejas acciones mutuas entre los factores genéticos del huésped, la exposición a los gérmenes patógenos y las influencias ambientales. El objetivo del estudio consistió en investigar el papel de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los elementos reguladores de los genes de las citocinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> e IL- $\gamma$ <sup>-174</sup>, en la susceptibilidad a la OM recurrente infantil.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Se incluyó a 505 sujetos (296 susceptibles a la OM, 209 controles no susceptibles) en dos lugares de estudio (Texas y Kentucky). Se investigó el ADN de los sujetos en busca de SNP específicos mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, y se confirmó por secuenciación genética.

**RESULTADOS:** En el grupo total de estudio, la presencia de polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL- $\gamma$ <sup>-174</sup> heterocigóticos u homocigóticos (genotipos con alta producción de citocinas) se asoció significativamente con la susceptibilidad a la OM (OR = 1,7 y 1,76, respectivamente). La misma asociación se halló en un subgrupo de 384 sujetos aparejados (OR = 1,6 y 1,57, respectivamente). En el grupo total de estudio hubo un aumento escalonado significativo de la susceptibilidad a la OM al aumentar el número de genotipos polimórficos concomitantes ( $p < 0,01$ ). La combinación simultánea de los polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL- $\gamma$ <sup>-174</sup> incrementó aún más el riesgo de susceptibilidad a la

OM (OR = 2,84). Estos dos genotipos polimórficos se asociaron también a un mayor riesgo de colocar tubos de timpanostomía (prueba de tendencia,  $p = 0,03$  y  $0,01$ , respectivamente). Los sujetos con polimorfismo TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> que recibieron lactancia materna durante menos de 1 mes o estuvieron expuestos al humo de tabaco tuvieron más probabilidades de ser susceptibles a la OM.

**CONCLUSIÓN:** Nuestros datos sugieren que los polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL- $\gamma$ <sup>-174</sup> se asocian con un mayor riesgo de susceptibilidad a la OM y de colocación de tubos de timpanostomía. Los factores ambientales, como la lactancia materna, pueden modificar el riesgo de susceptibilidad a la OM en los individuos con polimorfismos.

#### INTRODUCCIÓN

Hasta un 19% de niños son susceptibles a la otitis media (OM) recurrente<sup>1-3</sup>. Entre las secuelas a largo plazo de la OM crónica y recurrente se encuentran el retraso en el desarrollo del lenguaje y las dificultades para el aprendizaje. La etiología de la susceptibilidad a la OM es multifactorial e incluye factores ambientales, microbianos y del huésped. Dado que la susceptibilidad a la OM ocurre en agrupamientos familiares, se ha considerado que los factores genéticos desempeñan un papel principal.

Es probable que los factores de susceptibilidad a la OM sean multigénicos, con influencia sobre una amplia gama de respuestas inmunitarias del huésped. Los genes que codifican las citocinas y moléculas afines presentan un considerable polimorfismo. Se ha observado que muchos polimorfismos genéticos de las citocinas influyen en la resistencia a la infección y en la susceptibilidad a diversas enfermedades. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los elementos reguladores de los genes de las citocinas pueden occasionar una producción disgregada de citocinas, lo que a su vez influye en la inmunidad natural y adquirida<sup>4</sup>. Es posible que los SNP con alta producción de citocinas de fase aguda, o citocinas proinflamatorias, es decir, el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y las interleucinas (IL)-1 $\beta$  e IL-6, desempeñen un papel promotor de la inflamación durante la interacción virus-bacterias que ocurre en la nariz-trompa de Eustaquio-tímpano en el proceso que condu-

Departments of <sup>a</sup>Pediatrics and <sup>b</sup>Preventive Medicine and Community Health, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, Estados Unidos; <sup>c</sup>Kentucky Pediatric Research, Inc., Bardstown, Kentucky, Estados Unidos.

Apoyo económico: este trabajo fue subvencionado por las becas R01 DC 5841 (a T.C.) de los National Institutes of Health. El estudio se realizó en el General Clinical Research Center at the University of Texas Medical Branch at Galveston, financiado por la beca M01 RR 00073 del National Center for Research Resources, NIH.

Correspondencia: Tasnee Chonmaitree, MD, Division of Pediatric Infectious Disease and Immunology, Department of Pediatrics, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0371, Estados Unidos.

Correo electrónico: tchonmai@utmb.edu

ce a la OM. De hecho, se ha observado que los SNP específicos con alta producción de citocinas, TNF- $\alpha^{308}$ , IL-1 $\beta^{+3953}$  e IL- $\beta^{-174}$ , se asocian con la susceptibilidad a infecciones frecuentes o graves<sup>5-9</sup>. Sin embargo, no se ha estudiado adecuadamente el papel de los SNP de las citocinas en la susceptibilidad a la OM. Otros factores conocidos que influyen en la susceptibilidad a la OM son la edad, el sexo masculino, los antecedentes familiares de susceptibilidad a la OM, la diátesis alérgica, la asistencia a guarderías, la exposición al humo del tabaco, la falta de lactancia materna, el uso de chupetes y el dar el biberón en decúbito supino<sup>1-3,10-14</sup>.

El objetivo del presente estudio consistió en valorar la asociación entre los polimorfismos TNF- $\alpha^{308}$ , IL-1 $\beta^{+3953}$  e IL- $\beta^{-174}$  y la susceptibilidad a la OM, así como correlacionar los polimorfismos con otros factores ambientales y del huésped, que contribuyan a la susceptibilidad a la OM.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Población del estudio y definición de la enfermedad

Se incorporó a los niños en las consultas externas de pediatría general y otorrinolaringología infantil en la University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, y en la Kentucky Pediatric Research Office, Bardstown, Kentucky. El estudio fue aprobado por la UTMB Institutional Review Board. Se obtuvo el consentimiento informado de los progenitores de los niños participantes.

Los niños con susceptibilidad a la OM reunían al menos uno de los siguientes criterios: primer episodio de OM aguda antes de los 6 meses; tres o más episodios de OM aguda en un plazo de 6 meses; cuatro o más episodios de OM aguda en un plazo de 12 meses; seis o más episodios a la edad de 6 años, o historia de colocación de tubos de timpanostomía por otitis media recurrente o persistente. El grupo de control, sin susceptibilidad a la OM, estuvo compuesto por niños que habían presentado 0-2 episodios de OM aguda a los 2 años de edad. Se excluyó del estudio a los niños con defectos anatómicos o fisiológicos del oído o la nasofaringe, anomalías inmunológicas conocidas, procesos médicos importantes o tratados por afecciones crónicas.

Los datos clínicos se recogieron mediante entrevistas a los padres y revisión de las historias clínicas. Se anotaron los datos de género, edad, raza/etnia, episodios de OM aguda, colocación de tubos de timpanostomía, procesos atópicos (asma, eccema, fiebre del heno o alergias alimentarias), susceptibilidad a la OM

en familiares cercanos, duración de la lactancia materna, asistencia a guarderías y exposición al humo de tabaco en el hogar.

### Análisis del SNP

Se obtuvo el ADN de los participantes a partir de células mononucleares de sangre periférica o células del epitelio bucal. Se efectuó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el extracto del ADN, en series del estimulador de las citocinas respectivas que abarcaban los sitios SNP<sup>6</sup>. Los productos PCR resultantes se digirieron con enzimas polimórficas específicas del sitio: NCo1 para TNF- $\alpha^{308}$ , Taq1 para IL-1 $\beta^{+3953}$ , y Hsp92IL-1 $\beta^{+3953}$  para IL- $\beta^{-174}$ . Todos los SNP identificados por PCR se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

El personal de laboratorio que realizó los análisis de polimorfismo desconocía la situación de susceptibilidad a la OM de cada niño. El estudio de SNP dio lugar a tres genotipos para cada citocina: homocigótico "normal" (baja producción de citocinas) y polimórfico (alta producción de citocinas) homocigótico o heterocigótico.

### Análisis estadístico

La variable de susceptibilidad a la OM se comparó con el genotipo, mediante las pruebas  $\chi^2$  y de Cochran-Armitage para las tendencias, con el programa estadístico SAS. Se utilizó un modelo de regresión logística para analizar el valor predictivo de los tres polimorfismos, con control de las covariables individuales, del lugar del estudio (tabla 5) y de los análisis post hoc adicionales. Se consideraron significativos todos los valores de P de 0,05, con una potencia del 80% para detectar las diferencias.

## RESULTADOS

### Características de la población

En la tabla 1 se resumen las características de los sujetos participantes. La población total del estudio (n = 505) no estaba equilibrada con respecto al número de sujetos con o sin susceptibilidad a la OM (58,6% frente a 41,4%, respectivamente). Sin embargo, la distribución en cuanto a raza/etnia, edad y género no era significativamente diferente entre los dos grupos (tabla 1). Después de incluir a los primeros 121 sujetos para el estudio piloto, los 384 siguientes se emparejaron según presen-

**TABLA 1. Características de los sujetos**

	Grupo total <sup>a</sup> n = 505		Grupo emparejado <sup>b</sup> n = 384	
	Susceptibles a la OM n = 296	No susceptibles a la OM n = 209	Susceptibles a la OM n = 192	No susceptibles a la OM n = 192
Género				
Masculino	168 (57) <sup>c</sup>	124 (59)	119 (62)	119 (62)
Femenino	128 (43)	85 (41)	73 (38)	73 (38)
Edad: años, media ( $\pm$ DE)	4,9 $\pm$ 3,1	4,9 $\pm$ 2,6	5,0 $\pm$ 3,2	4,9 $\pm$ 2,6
Etnia/raza				
Blanca	160 (54)	89 (43)	79 (41)	79 (41)
Negra	69 (23)	58 (28)	56 (29)	56 (29)
Hispana	63 (21)	57 (27)	54 (28)	54 (28)
Asiática	3 (1)	2 (1)	2 (1)	2 (1)
Mixta (B/N)	1 (0,3)	3 (1)	1 (0,5)	1 (0,5)
Lugar de estudio				
Texas	196 (66)	170 (81)	163 (85)	163 (85)
Kentucky	100 (34)	39 (19)	29 (15)	29 (15)

DE: desviación estándar; OM: otitis media.

<sup>a</sup>Las distribuciones por sexos y por grupos raciales/étnicos no fueron significativamente diferentes entre los grupos susceptibles y no susceptibles a la OM (prueba  $\chi^2$ , p = 0,63 y 0,09, respectivamente); <sup>b</sup>cada sujeto susceptible a la OM se emparejó, según la edad, el género, la raza/etnia y el lugar de estudio, con un sujeto no susceptible; <sup>c</sup>los números entre paréntesis corresponden al porcentaje de la columna del grupo total.

**TABLA 2. Genotipos de los polimorfismos de citocinas en los sujetos emparejados, susceptibles o no a la OM (n = 192 en cada grupo)**

Alelos polimórficos <sup>a</sup>	Susceptibles a la OM n (%)	No susceptibles a la OM n (%)	OR: IC <sup>b</sup>	Valor de p <sup>c</sup>
TNF- $\alpha$ -308				
A/A <sup>d</sup>	139 (72)	155 (81)	1,60: 0,99-2,58	0,05
A/G o G/G <sup>e</sup>	53 (28)	37 (19)		
IL-1 $\beta$ +3953				
C/C <sup>d</sup>	145 (76)	135 (70)	0,77: 0,49-1,20	0,25
C/T o T/T <sup>d</sup>	47 (25)	57 (30)		
IL- $\gamma$ -174				
C/C <sup>d</sup>	112 (58)	132 (69)	1,57: 1,03-2,39	0,03
C/G o G/G <sup>e</sup>	80 (42)	60 (31)		

IC: intervalo de confianza; OM: otitis media; OR: odds ratio.

<sup>a</sup>Los sujetos podrían presentar combinaciones de SNP de las citocinas; <sup>b</sup>OR: IC = probabilidad relativa: intervalo de confianza del 95%; <sup>c</sup>calculado por análisis de  $\chi^2$ ; <sup>d</sup>genotipo homocigótico "normal" (baja producción de citocinas); <sup>e</sup>genotipos polimórficos (alta producción de citocinas).

**TABLA 3. Genotipos polimórficos de citocinas en los sujetos (n = 384) con o sin colocación de tubos de timpanostomía**

Alelos polimórficos <sup>a</sup>	No susceptibles + no tubos n (%)	Susceptibles a la OM + no tubos n (%)	Susceptibles a la OM + tubos n (%)	Valor de p <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ -308				
A/A <sup>c</sup>	155 (81)	102 (73)	37 (70)	0,03
A/G o G/G <sup>d</sup>	37 (19)	37 (27)	16 (30)	
IL-1 $\beta$ +3953				
C/C <sup>c</sup>	135 (70)	106 (76)	39 (74)	0,19
C/T o T/T <sup>d</sup>	57 (30)	33 (24)	14 (26)	
IL- $\gamma$ -174				
C/C <sup>c</sup>	132 (69)	83 (60)	29 (55)	0,01
C/G o G/G <sup>d</sup>	60 (31)	56 (40)	24 (45)	

OM: otitis media.

<sup>a</sup>Los sujetos podrían presentar combinaciones de SNP de las citocinas; <sup>b</sup>calculado mediante la prueba unilateral de Cochrane-Armitage para las tendencias; <sup>c</sup>genotipo homocigótico "normal" (baja producción de citocinas); <sup>d</sup>genotipos polimórficos (alta producción de citocinas).

taran o no susceptibilidad a la OM (192 en cada grupo), y según la raza/etnia y el género, en cada lugar del estudio (grupo "emparejado"). La mayoría de los análisis acerca del efecto de los genotipos polimórficos sobre la susceptibilidad a la OM se realizó en los grupos emparejados, con el fin de reducir el sesgo de la raza/etnia y el género, que podría contribuir a la diversidad genética y a la susceptibilidad a la OM. En Texas se incluyó al 72,0% y 84,9% de los sujetos de los grupos total y emparejado, respectivamente. En Kentucky se incluyó al resto de los sujetos.

#### **SNP en los sujetos con o sin susceptibilidad a la OM**

En el grupo total de estudio se hallaron los genotipos polimórficos heterocigóticos u homocigóticos TNF- $\alpha$ -308, IL-1 $\beta$ +3953 e IL- $\gamma$ -174 en el 25,6%, 27,9% y 39,0% de los sujetos, respectivamente (datos no mostrados). Los genotipos polimórficos homocigóticos no se analizaron por separado a causa del número relativamente escaso de sujetos con dicho genotípico. En el grupo total de estudio, los polimorfismos TNF- $\alpha$ -308 e IL- $\gamma$ -174 se asociaron con un riesgo significativamente aumentado de susceptibilidad a la OM (OR = 1,7, p = 0,01; OR = 1,76, p < 0,01, respectivamente; datos no mostrados). En el análisis del grupo emparejado se observó así mismo un riesgo similar de susceptibilidad a la OM con los polimorfismos TNF- $\alpha$ -308 e IL- $\gamma$ -174 (OR = 1,6 y 1,57, respectivamente; tabla 2). Por lo tanto, todos los análisis posteriores de los datos se realizaron sobre el grupo emparejado.

Se incluyó a un porcentaje significativamente mayor de varones con susceptibilidad a la OM (62%) (y, por lo tanto, al mismo porcentaje de varones en los sujetos de control emparejados). La distribución de los genotipos polimórficos fue análoga en ambos sexos (datos no mostrados). Entre los principales grupos raciales/étnicos, los sujetos de raza blanca, negra o hispana representaron el 41%, 29% y 28%, respectivamente. Estos grupos reflejaban en gran medida su distribución en la población general de los dos lugares estudiados. En los modelos de regresión logística no se observó acción mutua entre la raza/etnia y los genotipos polimórficos (p > 0,33 para todos los genotipos). Sin embargo, el análisis post hoc de subgrupos mostró que en los sujetos de raza blanca el polimorfismo IL- $\gamma$ -174 se asociaba significativamente con la susceptibilidad a la OM, más que con la falta de susceptibilidad a la OM (OR = 2,05, p = 0,03); se observó también una tendencia similar en los sujetos de raza negra (OR = 2,78, p = 0,07), pero no en los hispanos (OR = 0,86, p = 0,69; datos no mostrados). La distribución de los polimorfismos TNF- $\alpha$ -308 e IL-1 $\beta$ +3953 no se asoció significativamente con la susceptibilidad a la OM en relación con los distintos grupos de raza/etnia.

La historia de colocación de tubos de timpanostomía se consideró como una mayor susceptibilidad a la OM. En 53 (27,6%) de los sujetos con susceptibilidad a la OM había antecedentes de colocación de tubos de timpanostomía (tabla 3). Las tasas de los genotipos TNF- $\alpha$ -308 e IL- $\gamma$ -174 eran significativamente mayores, de un modo escalonado, entre los sujetos no susceptibles, con susceptibilidad a la OM sin colocación de tubos, y con

**TABLA 4. Combinaciones de genotipos polimórficos de citocinas en los grupos total y emparejado**

Combinaciones de polimorfismos	Grupo total <sup>a</sup> (n = 505)			Grupo emparejado <sup>a</sup> (n = 384)		
	Susceptibles a la OM n (%)	No susceptibles n (%)	Valor de p <sup>b</sup>	Susceptibles a la OM n (%)	No susceptibles n (%)	Valor de p <sup>c</sup>
No polimorfismos	84 (50)	85 (50)	Referencia	58 (43)	77 (57)	Referencia
Polimorfismo en un solo gen de citocina	135 (61)	86 (39)	0,02	95 (54)	80 (45)	0,05
Combinaciones polimórficas de dos genes cualesquiera de citocinas	65 (66)	34 (34)	0,01	32 (51)	31 (49)	0,38
Dos combinaciones específicas						
IL-1 $\beta^{+3953}$ + IL-6 $^{-174}$	27	19	0,25	12	18	0,77
IL-1 $\beta^{+3953}$ + TNF- $\alpha^{-308}$	11	7	0,36	5	6	0,87
IL-6 $^{-174}$ + TNF- $\alpha^{-308}$	27	8	<0,01	15	7	0,05
Combinación polimórfica de los tres genes de citocinas <sup>c</sup>	12 (75)	4 (25)	0,05	7 (64)	4 (37)	0,19

OM: otitis media.

<sup>a</sup>Prueba bilateral de Cochran-Armitage para tendencias con respecto a la susceptibilidad a la OM con ninguna, una, dos o tres combinaciones de genotipos polimórficos; grupo “total”, p < 0,01; grupo “emparejado”, p = 0,09. <sup>b</sup>Frente al valor de referencia; calculado por análisis  $\chi^2$ ; <sup>c</sup>genotipos polimórficos (alta producción de citocinas) heterocigóticos u homocigóticos.

susceptibilidad a la OM y colocación de tubos de timpanostomía.

#### Efecto de las combinaciones de SNP

En el grupo emparejado, 135 (35,2%) sujetos presentaban un genotipo homocigótico “normal” en las tres citocinas (tabla 4). En 175 sujetos (45,6%) había al menos un genotipo polimórfico para una citocina; 63 (16,4%) presentaban combinaciones de genotipos polimórficos en dos citocinas, mientras que el 2,9% de los niños presentaba combinaciones de genotipos polimórficos en las tres citocinas. En este grupo emparejado no había un aumento significativo escalonado del riesgo de susceptibilidad a la OM entre los sujetos con combinaciones de uno, dos o tres genotipos polimórficos ( $p = 0,09$ ). Sin embargo, el análisis del grupo total mostró un aumento significativo escalonado del riesgo de susceptibilidad a la OM al aumentar las combinaciones de genotipos polimórficos ( $p < 0,01$ ).

Entre las combinaciones de genotipos polimórficos de dos citocinas, sólo la de TNF- $\alpha^{-308}$  e IL-6 $^{-174}$  se asoció con una mayor susceptibilidad a la OM (OR = 2,84), en comparación con los polimorfismos TNF- $\alpha^{-308}$  o IL-6 $^{-174}$  aislados (OR = 1,6 y 1,57, respectivamente) en el grupo emparejado. La misma asociación se observó también en el grupo total. Como hecho de interés, cuando los sujetos con polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$  o IL-6 $^{-174}$  presentaban una combinación con el polimorfismo IL-1 $\beta^{+3953}$ , el riesgo de susceptibilidad a la OM no era significativo, lo cual sugiere un posible efecto moderador del polimorfismo IL-1 $\beta^{+3953}$  sobre dicha susceptibilidad.

#### Análisis independientes de las tres variables

Cada variable del estudio se investigó en cuanto a su capacidad para predecir la susceptibilidad a la OM, mediante análisis de regresión logística con variables múltiples (tabla 5). TNF- $\alpha^{-308}$ , IL-6 $^{-174}$ , los antecedentes personales de procesos atópicos y los antecedentes familiares de susceptibilidad a la OM se asociaron independientemente con un mayor riesgo de susceptibilidad a la OM. Por otra parte, la historia de lactancia materna se asoció independientemente con un riesgo significati-

**TABLA 5. Análisis de regresión logística de las tres variables de polimorfismo, con control de las variables individuales y del estudio, entre los sujetos emparejados**

Parámetro (resultado = susceptible a la OM)	Probabilidad relativa	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
TNF- $\alpha^{-308a}$	1,78	1,04-3,03	0,04
IL-1 $\beta^{+3953a}$	0,77	0,47-1,26	0,3
IL-6 $^{-174a}$	1,75	1,07-2,85	0,03
Género (F)	0,91	0,58-1,44	0,69
Raza			
Hispana vs. blanca	1,31	0,72-2,4	0,31
Negra vs. blanca	0,98	0,54-1,79	0,57
Exposición al humo de tabaco	0,70	0,43-1,15	0,16
Atopia en el paciente	2,18	1,26-3,78	0,01
Susceptibilidad familiar a la OM	2,74	1,76-4,28	<0,01
Lactancia materna			
4 meses	0,74	0,6-0,9	0,05
6 meses	0,64	0,46-0,85	0,05
Asistencia a guarderías	1,01	1,0-1,02	0,28
Centro de estudio (Tx vs. Ky)	1,06	0,55-2,07	0,86

F: femenino; OM: otitis media.

<sup>a</sup>Genotipos polimórficos (alta producción de citocinas) heterocigóticos u homocigóticos.

vamente menor de susceptibilidad a la OM. La reducción del riesgo fue más acentuada al prolongarse la lactancia materna (4 meses frente a 6 meses; OR = 0,74 frente a 0,64, respectivamente). El género, la raza/etnia, la exposición al humo de tabaco, la asistencia a guarderías y el lugar del estudio no se asociaron independientemente con la susceptibilidad a la OM.

#### Análisis post hoc adicional sobre el efecto de la lactancia materna y de la exposición al humo de tabaco

No hubo asociación entre los antecedentes personales de procesos atópicos o los antecedentes familiares de susceptibilidad a la OM y los alelos polimórficos de cualquiera de las tres citocinas en los sujetos del estudio (datos no mostrados).

En 122 (31,8%) sujetos había exposición al humo de tabaco. En esta población, dicha exposición por sí sola no se asoció con un mayor riesgo de susceptibilidad a la OM (32,3% y 31,3% de exposición entre los sujetos con

o sin susceptibilidad a la OM, respectivamente). Un modelo de regresión logística mostró que existía una acción marginal mutua entre los polimorfismos TNF- $\alpha^{-308}$ , IL-1 $\beta^{+3953}$  e IL- $^{-174}$  y la exposición al humo de tabaco, para predecir la susceptibilidad a la OM ( $p = 0,11, 0,12$  y  $0,52$ , respectivamente; datos no mostrados). Sin embargo, en un análisis post hoc de subgrupos se observó que los sujetos con polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$  expuestos al humo de tabaco tenían más probabilidades de ser susceptibles a la OM que de no serlo ( $OR = 2,9, p = 0,02$ ). Por otra parte, entre los sujetos no expuestos al humo de tabaco, el polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$  no se asoció con la susceptibilidad a la OM ( $OR = 1,21, p = 0,51$ ). A diferencia de lo observado con el polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$ , los sujetos con polimorfismo IL- $^{-174}$  no expuestos al humo de tabaco tenían más probabilidades de ser susceptibles a la OM que de no serlo ( $OR = 1,74, p = 0,04$ ), lo que no ocurría entre los expuestos al humo de tabaco ( $OR = 1,31, p = 0,46$ ). Como hecho de interés, los sujetos expuestos que presentaban el genotipo IL-1 $\beta^{+3953}$  tenían más probabilidades de no ser susceptibles a la OM que de serlo ( $OR = 0,45, p = 0,05$ ).

Doscientos sesenta y cinco (69%) sujetos no habían recibido lactancia materna o la duración de ésta había sido inferior a 1 mes. Un modelo de regresión logística mostró que el riesgo de susceptibilidad a la OM era más bajo entre los sujetos alimentados al pecho en ambos genotipos polimórficos y no polimórficos de las tres citocinas (datos no mostrados). El análisis adicional post hoc de subgrupos mostró que los sujetos con polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$  que no habían recibido lactancia materna o ésta había durado menos de 1 mes tenían más probabilidades de ser susceptibles a la OM que de no serlo ( $OR = 2,19, p = 0,01$ ).

## DISCUSIÓN

IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  son citocinas de fase aguda que favorecen la respuesta inflamatoria aguda después de una infección por virus o bacterias. Nuestro estudio ha sido el primero en demostrar que los genotipos polimórficos TNF- $\alpha^{-308}$  e IL- $^{-174}$  se asocian independientemente con el riesgo de susceptibilidad a la OM. El papel de estos dos genotipos de citocinas se vio más fortalecido al observar que existía un significativo aumento escalonado de la susceptibilidad a la OM al aumentar el número de genotipos polimórficos concomitantes. Además, la presencia simultánea de los genotipos polimórficos TNF- $\alpha^{-308}$  e IL- $^{-174}$  aumentó el riesgo de susceptibilidad a la OM y de colocación de tubos de timpanostomía, un marcador de la OM persistente o recurrente.

El papel de los polimorfismos TNF- $\alpha^{-308}$  e IL- $^{-174}$  en la susceptibilidad a la OM es compatible con el que desempeña en otras enfermedades infecciosas. El polimorfismo más ampliamente estudiado es el del alelo TNF- $\alpha^{-308}$ , que se asocia con la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas o con la mayor gravedad de éstas, como paludismo cerebral<sup>5</sup>, shock séptico<sup>6</sup> y periodontitis<sup>7</sup>. El polimorfismo IL- $^{-174}GG$  se asocia con la sepsis bacteriana grave en el recién nacido<sup>8</sup>. Por lo tanto, la asociación entre los genotipos TNF- $\alpha^{-308}$  e IL- $^{-174}$  y la susceptibilidad a la OM, mostrada en el presente estudio, representa probablemente el papel global de estos polimorfismos en la predisposición al aumento de sus-

ceptibilidad a muchas enfermedades infecciosas, y no necesariamente a la OM de modo exclusivo. Deben realizarse nuevos análisis para confirmar nuestros resultados en otras poblaciones.

El polimorfismo de los genes de citocinas no fue el único factor asociado con la susceptibilidad a la OM, pues la OM es una enfermedad multifactorial con interacciones complejas de los factores ambientales, los agentes infecciosos y los factores genéticos del huésped. Se han identificado numerosos factores de riesgo para el desarrollo de OM. Los factores ambientales incluyen la exposición al humo de tabaco<sup>12,13</sup>, la asistencia a guarderías<sup>1,11</sup>, la ausencia de lactancia materna<sup>12,13,15</sup> y el uso de chupete<sup>16</sup>. Nuestro estudio sugiere que la lactancia materna es por sí misma un factor de protección frente a la susceptibilidad a la OM, incluso en los niños con polimorfismos TNF- $\alpha^{-308}$  e IL- $^{-174}$ . La lactancia materna puede proteger contra la OM al aportar factores de protección pasiva en la orofaringe y el intestino, así como al modificar el sistema inmunitario en desarrollo del lactante, que puede aportar protección durante toda la vida<sup>17</sup>.

En nuestra población de estudio, la exposición al humo de tabaco no fue un factor de riesgo independiente para la susceptibilidad a la OM. Sin embargo, en un análisis de subgrupos mostramos que la exposición al humo de tabaco aumentó aún más la susceptibilidad a la OM en los niños con polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$ , mientras que el polimorfismo IL- $^{-174}$  aumentó la susceptibilidad a la OM en los niños no expuestos. Se cree que el humo de tabaco contribuye a la inflamación de las vías aéreas por liberación de muchos mediadores inflamatorios, incluido TNF- $\alpha^{18}$ . El humo de tabaco podría empeorar la inflamación del tracto respiratorio durante las infecciones a este nivel, sobre todo en los individuos con polimorfismo TNF- $\alpha^{-308}$ .

Al igual que en otros estudios, nuestros datos muestran una asociación entre la atopia, los antecedentes familiares de susceptibilidad a la OM y la mayor susceptibilidad del niño a la OM<sup>1,10,11,19-21</sup>. En cambio, no hubo asociación entre la atopia, los antecedentes familiares de susceptibilidad a la OM y los polimorfismos de los genes de citocinas. Esta observación sugiere que en la susceptibilidad a la OM asociada con la atopia pueden intervenir otros genes inmunorreguladores. Se ha especulado que el desequilibrio entre las citocinas en los linfocitos Th1/Th2 sería importante en los individuos atópicos con susceptibilidad a la OM<sup>22</sup>.

El papel de los factores genéticos en la susceptibilidad a la OM se ha reconocido en estudios de grupos familiares<sup>1</sup> y en gemelos y trillizos<sup>23,24</sup>. Ramet et al<sup>25</sup> estudiaron un gen que controla la proteína A del factor tensioactivo, un complejo lipoproteico que desempeña un papel en la defensa natural del huésped a nivel pulmonar y que se expresa también en la trompa de Eustaquio. Estos autores hallaron que los haplotipos específicos de la proteína A del factor tensioactivo se hallaban con más frecuencia en los niños con susceptibilidad a la OM. Straetemans et al<sup>26</sup> hallaron unas tasas más elevadas de polimorfismos Fcy-RIIa-R/R131 en los niños holandeses susceptibles a la OM, aunque la observación carecía de significación estadística. Fcy-RIIa es un receptor IgG leucocitario que desempeña un papel en la fagocitosis bacteriana facilitada por la IgG. En un geno-

tipaje para los loci de susceptibilidad en las familias susceptibles a la OM, Daly et al<sup>27</sup> hallaron contribución de los genes en tres regiones cromosómicas distintas (10q, 19q y 3p), con potencial interacción gen-gen. Aunque estas regiones de vinculación contienen varios genes candidatos posicionales putativos, no se ha identificado aún con exactitud cuáles son los genes y las proteínas codificadas que intervienen en la susceptibilidad a la OM. Los genes que codifican a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no se hallan en estos cromosomas.

Entre los estudios anteriores sobre polimorfismos genéticos de las citocinas en la susceptibilidad a la OM, se halla el de Joki-Erkkila et al<sup>28</sup>, quienes investigaron los genes antagonistas de los receptores TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup>, IL-1 $\alpha$ <sup>-889</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>-511</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> e IL-1 en 20 familias finlandesas con susceptibilidad a la OM, que comprendían 63 individuos y 400 donantes de sangre sanos elegidos aleatoriamente como controles. A diferencia de nuestros hallazgos, no observaron asociación entre la OMA recurrente y los polimorfismos de los genes de citocinas estudiados, incluidos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup>. El diseño de su estudio difería del nuestro en su menor número de sujetos y en que éstos se hallaban emparentados genéticamente, por lo que el enfoque era más bien hacia un patrón hereditario de la susceptibilidad a la OM. Dado que la OMA es multifactorial, no es sorprendente que no se observe una herencia de tipo mendeliano. Además, no se investigó el papel de IL-1 $\beta$ <sup>-174</sup>. Finalmente, los sujetos de control se incluyeron a partir de donantes de sangre adultos, de quienes se desconocían sus antecedentes infantiles de OMA y que podrían ser sujetos con susceptibilidad a la OM. Como la OM es una enfermedad multifactorial, los genes de la susceptibilidad a la OM pueden desempeñar distintos papeles en diferentes poblaciones, en particular al comparar una población finlandesa homogénea con una población multirracial heterogénea en Estados Unidos.

IL-1 $\beta$  desempeña un papel similar a TNF- $\alpha$  e IL-6 en la inflamación aguda. El polimorfismo IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> se asocia con un mayor riesgo de periodontitis avanzada<sup>7</sup>. En nuestro estudio, el polimorfismo IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> no incrementa el riesgo de susceptibilidad a la OM e incluso parece ejercer un papel protector cuando los niños se exponen al humo de tabaco. Además, el polimorfismo IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> inhibe las acciones de los polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL-1 $\beta$ <sup>-174</sup> promotoras de la OM al presentarse combinados. Nosotros especulamos que el polimorfismo IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> aumentaría la producción de IL-1 $\beta$ , una citocina Th1, lo que evitaría la respuesta Th2 que puede conducir a la atopia y a la susceptibilidad a la OM<sup>22</sup>.

Es improbable que el cribado de estos genes de citocinas tenga un valor práctico importante para identificar a los individuos susceptibles en el ámbito clínico habitual, debido a la relativa frecuencia de estos polimorfismos genéticos de las citocinas en los individuos no propensos a la OM, así como a la etiología multifactorial de la OM. En cambio, la investigación del papel de estos genes de citocinas puede dar lugar al desarrollo de tratamientos moduladores de las citocinas para impedir la aparición de OM después de una infección de las vías respiratorias altas. También es posible realizar otros estudios para examinar los mecanismos inmunitarios inducidos por vacunas frente a los gérmenes patógenos de la OM, con el fin de prevenir la tendencia a la OM en la población genéticamente susceptible.

## CONCLUSIONES

Hemos puesto de manifiesto una asociación entre los polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL-1 $\beta$ <sup>-174</sup> y la susceptibilidad a la OM. Se observó un papel adicional de estos alelos polimórficos en los grupos específicos de raza/etnia y en los niños expuestos al humo de tabaco. El genotipo IL-1 $\beta$ <sup>+3953</sup> es protector en los niños expuestos al humo de tabaco y contrarresta además la susceptibilidad que confieren los polimorfismos TNF- $\alpha$ <sup>-308</sup> e IL-1 $\beta$ <sup>-174</sup>. La lactancia materna protegió frente a la susceptibilidad a la OM, independientemente de estos polimorfismos genéticos. En los niños genéticamente susceptibles a la OM, las modificaciones ambientales, como la lactancia materna o la menor exposición al humo de tabaco, pueden ayudar a reducir la aparición de OM, aunque ello requiere ulteriores investigaciones.

## AGRADECIMIENTO

Damos las gracias a S. Ahmad, MD; A. Syal, MD; K.L. Najera, BS; M. Tran, BS, y M. Spalding, RN, por su ayuda en la incorporación de los sujetos del estudio, así como a Ronald Deskin, MD, por facilitar la incorporación de los sujetos en la clínica de otorrinolaringología. También expresamos nuestro agradecimiento a L. Yin, MD; W. Song, MD, y R. Serna, BS, por su ayuda en los laboratorios, y a L. Zhang, MS, por el análisis estadístico de los datos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in Children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis.* 1989;160: 83-94.
2. Block SL, Harrison CJ, Hedrick J, Tyler R, Smith A, Hedrick R. Restricted use of antibiotic prophylaxis for recurrent acute otitis media in the era of penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2001;61:47-60.
3. Teele DW, Klein JO, Chase C, Menyuk P, Rosner BA, the Greater Boston Otitis Media Study Group. Otitis media in infancy and intellectual ability, school achievement, speech, and language at age 7 years. *J Infect Dis.* 1990;162: 685-94.
4. Knight J. Polymorphisms in tumor necrosis factor and other cytokines as risks for Infectious diseases and the septic syndrome. *Curr Infect Dis Rep.* 2001;3:427-39.
5. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 1994;371:508-11.
6. Mira J, Cariou M, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. A multicenter study. *JAMA.* 1999;282: 561-8.
7. Galbraith GMP, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26:705-9.
8. Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23: 424-8.
9. Harding D, Dhamrait S, Millar A, et al. Is interleukin-6-174 genotype associated with the development of septicemia in preterm infants? *Pediatrics.* 2003;112:800-3.
10. Daly KA, Brown JE, Lindgren BR, Meland MH, Le CT, Giebink GS. Epidemiology of otitis media onset by six months of age. *Pediatrics.* 1999;103:1158-66.
11. Daly KA, Giebink GS. Clinical epidemiology of otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:S31-6.

12. Duffy LC, Faden H, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D. Exclusive breastfeeding protects against bacterial colonization and day care exposure to otitis media. *Pediatrics*. 1997;100(4). Disponible en: [www.pediatrics.org/cgi/content/full/100/4/e7](http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/100/4/e7)
13. Owen MJ, Baldwin CD, Swank PR, Pannu AK, Johnson DL, Howie VM. Relation of infant feeding practices, cigarette smoke exposure, and group child care to the onset and duration of otitis media with effusion in the first two years of life. *J Pediatr*. 1993;123:702-11.
14. Ey JL, Holberg CJ, Aldous MB, Wright AL, Martinez FD, Taussig LM. Passive smoke exposure and otitis media in the first year of life. *Pediatrics*. 1995;95:670-7.
15. Duncan B, Ey J, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Taussig LM. Exclusive breast-feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Pediatrics*. 1993;91:867-72.
16. Niemela M, Uhari M, Mottonen M. A pacifier increases the risk of recurrent acute otitis media in children in day care centers. *Pediatrics*. 1995;96:884-8.
17. Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long lasting active immunity [revisión en Ann Allergy Asthma Immunol. 1999;82:478]. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;81:523-33.
18. Churg A, Wang RD, Tai H, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- $\alpha$  release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1083-9.
19. Irander K, Borres MP, Bjorksten B. Middle ear diseases in relation to atopy and nasal metachromatic cells in infancy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1993;26:1-9.
20. Mucha SM, Baroody FM. Relationships between atopy and bacterial infections. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003;3:232-7.
21. Tainio VM, Savilahti E, Salmenpera L, Arjomaa P, Siimes MA, Perheentupa J. Risk factors for infantile recurrent otitis media: atopy but not type of feeding. *Pediatr Res*. 1988;23:509-12.
22. Bernstein JM, Ballow M, Xiang S, O'Neil K. Th1/Th2 cytokine profiles in the nasopharyngeal lymphoid tissues of children with recurrent otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:22-7.
23. Casselbrant ML, Mandel EM, Fall PA, et al. The heritability of otitis media: a twin and triplet study. *JAMA*. 1999;282:2125-30.
24. Kvaerner KJ, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Distribution and heritability of recurrent ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997;106:624-32.
25. Ramet M, Lofgren J, Alho OK, Hallman M. Surfactant protein-A gene locus associated with recurrent otitis media. *J Pediatr*. 2001;138:266-8.
26. Straetemans M, Wiertsema SP, Sanders EA, et al. Immunological status in the aetiology of recurrent otitis media with effusion: serum immunoglobulin levels, functional mannose-binding lectin and Fc receptor polymorphisms for IgG. *J Clin Immunol*. 2005;25:78-86.
27. Daly KA, Brown WM, Segade F, et al. Chronic and recurrent otitis media: a genome scan for susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2004;75:988-97.
28. Joki-Erkkila V, Puuhakka H, Hurme M. Cytokine gene polymorphism in recurrent acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;28:17-20.