



Universidad de Sevilla

Programa de Doctorado

**Biología Molecular, Biomedicina e Investigación
Clínica.**

**Departamento Bioquímica Médica y Biología Molecular e
Inmunología**

**Estudio de variantes genéticas
asociadas a esofagitis
eosinofílica**

Tesis presentada por

María del Robledo Ávila Castellano

Sevilla 2022

***“No hay sueños, ideas, ni metas que puedas
cumplir sin esfuerzo y dedicación”***

Francisco Cayol

*A mi madre, hoy el sol luce radiante y cuando llegue la noche ese lucero en el
que vives cuidándome, eclipsará a la luna, porque segura estoy, de que hoy, no
hay nadie más orgullosa que tú.*

Agradecimientos

Durante muchas horas, días, meses, años he intentado arrancar tiempo al tiempo para sacar este proyecto adelante, hoy enciendo el ordenador y sólo me queda por escribir los agradecimientos y realmente no sé cómo hacerlo.

¡He acabado mi tesis! Y ... de repente, miro hacia atrás y me paro a pensar como he llegado hasta aquí, que o quienes han hecho que llegue hasta este momento, y se me pasan por la mente las innumerables personas a las que dar las gracias por haber hecho de este sueño una realidad.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi tutor Juan Miguel Guerrero Montávez y a mis directores de tesis, Dr. Raúl García Lozano (FEA del departamento de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío) y Dr. Joaquín Quiralte Enríquez (Director de la Unidad de Gestión Clínica de Alergología).

Raúl muchas gracias por tu ayuda, tu profesionalidad, por tus explicaciones repetidas, tu infinita paciencia, por el tiempo que me has dedicado y por adaptarte siempre a mis horarios. Has sido un director exigente, recto, con miles de cambios y correcciones, claro ésta que era tu papel y sin duda lo has cumplido con creces. Has sabido poner a mi disposición siempre las personas y recursos que más nos interesaban en cada momento, probablemente sin tu ayuda este proyecto no hubiera visto su fin.

Joaquín, seguro que no recuerdas una anécdota que sin duda fue el inicio de esta tesis, era yo escasa R1 y pasando una consulta que por motivos diversos había quedado descubierta, me llegó un paciente derivado de Digestivo por esofagitis eosinofílica ... mi cara muy probablemente palideció y salí cual R1 en busca de ayuda ...

Muchas cosas vendrían después de éste primer paciente, búsquedas, más de una decena de proyectos y solicitudes buscando financiación, llamando a todas las puertas, a veces con mejor suerte y la mayoría con regular. Pero siempre has estado ahí ... poniendo cordura a todos estos años de locura. Has sido como un padre en mi mundo de la alergia. Me has ayudado, aconsejado en los momentos de dudas, me has animado, reñido, llamado al orden, has soportado mis altos y bajos tanto personales como profesionales, me has exigido, pero también has hecho que mi sueño de ser Doctora ... ¡vea hoy la luz! Muchísimas gracias por confiar en mí y acompañarme en todo este recorrido con final feliz.

Agradecimientos sin duda al servicio de Alergología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, a todos mis compañeros que me han ayudado en la recopilación de pacientes y en especial a la enfermería que han colaborado de forma activa en la realización de las pruebas, en las extracciones sanguíneas, muchas gracias a todos, desde Lola Barcia, Elena Pascual, Eladis, María José Sierra, "me han criado"... pasando por Diego, Esteban y Carmen que son los actuales y con los que mantengo una excelente relación.

Al servicio de Inmunología del Hospital Virgen del Rocío, por la colaboración prestada poniendo a mi servicio todas las herramientas necesarias para desarrollar el trabajo de campo de esta tesis.

A mi familia, mi padre (Emilio), mi madre (María José), mis tres hermanos (Emilio José, Javier y Álvaro), y por supuesto mis abuelos que siempre se han sentido muy orgullosos de su nieta. Estoy escribiendo aquí en el campo, y siento que éste es el origen de todo lo que soy, aquí he estudiado la carrera con el apoyo incondicional de mis padres, mis hermanos y de Luis que desde segundo de carrera se convirtió en mi apoyo indiscutible en todo este largo recorrido que es el “ser médico”. Aquí pasé largos meses estudiando el interminable MIR, es a dónde quiero venir cuando me pasa algo, cuando estoy agobiada, cuando tengo algo que celebrar, y está claro que es porque aquí es dónde siento y encuentro a mi familia, la que me aporta mis mejores momentos de felicidad.

Papa y mama gracias por haberme educado en la perseverancia y haberme enseñado a perseguir los sueños, por haber estado a mi lado en todo mi recorrido, ahora que soy madre me puedo imaginar cuantos desvelos os habré ocasionado, espero que la felicidad de otros muchos momentos como hoy, haya compensado en algo la balanza.

Por último, y más importante, agradecer a mi marido Luis y mis hijas Lucia y Elena, muchas gracias por apoyarme en todo momento, por animarme, por aconsejarme y por creer en mí, esa confianza que tenéis en mi me hace sentir que puedo ser capaz de todo lo que me proponga, siempre que estéis a mi lado. Los últimos meses han sido agotadores para mí, robando tiempo a quien como sabéis, no me gusta quitarles ni un minuto, a las personas que más quiero y las que son el motor de mi vida. Lucia y Elena siempre que me ven al ordenador, me preguntan qué cuanto queda para terminar y mi respuesta siempre ha sido una cara triste, media sonrisa y un ... mucho, acompañándose esto siempre de un abrazo por su parte y un “no pasa nada mama”. Estas dosis de abrazos, junto con el – “venga vamos mama” constante que siempre me habéis inculcado han sido el trampolín que me ha hecho dar el salto final y llegar aquí hoy.

Lucía, Elena, Luis hoy os digo que queda sólo la recta final, esto se está acabando y espero seguir contando con los tres como mi pilar fundamental. Sin duda sois los más importante y lo más bonito que tengo en mi vida.

Deseando estoy poder compartir esta alegría con todos y fundirnos en un abrazo de esos que te hacen sentir única.

Índice

Índice

Abreviaturas	IV
Introducción	1
1.1 Concepto y epidemiología	
1.2. Fisiopatología de la EoE	
1.2.1. La respuesta inflamatoria epitelial: una barrera mucosa esofágica deficiente	
1.2.2. Una respuesta inmunitaria distinta tipo Th2	
1.2.2.1. Citoquinas asociadas a la respuesta Th2	
1.2.2.2. Células inmunes en la respuesta Th2.	
1.2.3. Las alteraciones esofágicas en la EoE	
1.3. Los componentes genéticos en la esofagitis eosinofílica.	
1.3.1. Variaciones genéticas en enfermedades complejas	
1.3.2. Genética de la EoE	
1.3.3. De la genética a la fisiopatología.	
1.3.3.1. Primer componente: la función de la barrera epitelial	
1.3.3.2 Segundo componente: la respuesta inmune TH2	
1.3.3.3. Estudios de interacciones de genes en EoE.	
1.4. Esofagitis eosinofílica y enfermedades alérgicas	
Hipótesis de trabajo. Objetivos y diseño experimental	35
Material y métodos	41
Pacientes y controles	
Consideraciones éticas del estudio	

Recogida y registro de la información

Principales variables recogidas en el estudio

Variables demográficas

Variables relacionadas con los hallazgos del prick-test a
aeroalergenos y trofoalergenos

Método

Obtención del ADN de pacientes y controles

Selección de los “Tag SNPs” (tSNPs)

Análisis estadístico

Resultados 61

Análisis fenotípico de los pacientes con EoE

Estudios de asociación de los genes estudiados con EoE

Gen TSLP

Gen TLR3

Gen TLR4

Gen FLG

Gen FOXP3

Estudios de asociación de los genes de TSLP y TLR3 estratificado
por género

Estudios de interacción entre los genes de TSLP y TLR3 con EoE

Estudios de asociación entre los genes de TSLP y TLR3 y el
fenotipo atópico de los pacientes

Discusión	81
Conclusiones	99
Resumen	103
Bibliografía	109
Anexos	121

Abreviaturas

Abreviaturas

APC: célula presentadora de antígeno.

ARNm: ARN mensajero

bp: pares de bases

CAPN14: calpaicina 14

CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5- RANTES

CDE: complejo de diferenciación epidérmica

CGA: campo de gran aumento

CCL16: eotaxina 3

CCR3: receptor de quimiocinas

DA: dermatitis atópica

DSG: desmogleina

EoE: esofagitis eosinofílica.

Eotaxina-3 (CCL26)

EREFS: Eosinophilic Esophagitis Endoscopic Reference Scores

ERGE: enfermedad por reflujo gastroesofágico

FcεRI: receptor de alta afinidad de la IgE

FGF-9: factor de crecimiento de fibroblastos-9

FLG: filagrina

FOXP: Forkhead winged-helix transcriptional factor

GWAS: Genome Wide Association Studies

IgE: inmunoglobulina E

ICAM-1: molécula de adhesión celular vascular tipo 1

IgE-FA: alergia alimentaria mediada por IgE

IL: interleucina

ILC: células linfoides innatas

NKT: células T asesinas naturales

IVL: involucrina

MAP: de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein

MBP: proteína básica mayor

OR: odds ratio

PLAU: plasminogen activator urokinase

POE: peroxidasa eosinofílica

POSTN: periostina

PPU: proteína principal de unión

PTM: modificaciones postraduccionales

RA: rinitis alérgica

SERPIN: inhibidores de la serina proteasa

SNP: polimorfismo de un sólo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*)

SPINK: inhibidores de la serina proteasa tipo Kazal

TGF- β : factor de crecimiento tisular

Th2: T helper tipo 2

TLR: receptores tipo Toll.

TSLP: linfopoetina tímica estromal

tSNP: Tag SNP

T regs: células T reguladoras

VEGF-A: factor vascular de crecimiento epitelial

Introducción

Introducción

1.1 Concepto y epidemiología

La esofagitis eosinofílica (EoE) se define como una enfermedad inflamatoria crónica del esófago de etiología inmunológica, caracterizada clínicamente por la existencia de síntomas de disfunción esofágica e histológicamente por la presencia de un infiltrado inflamatorio en el epitelio del esófago, con predominio de eosinófilos como células más características (1). En condiciones normales el esófago carece de eosinófilos por lo que su presencia en el esófago denota siempre enfermedad. El esófago es un órgano inmunológicamente activo con capacidad para reclutar células inflamatorias en respuesta a diferentes estímulos. En la EoE, este estímulo es una respuesta alérgica del esófago no mediada por IgE, desencadenada en la mayoría de los casos por alérgenos alimentarios (2,3)

A pesar de su caracterización como una entidad clínico-patológica propia desde hace sólo dos décadas, su prevalencia ha crecido exponencialmente hasta representar en la actualidad el trastorno gastrointestinal eosinofílico más frecuente en nuestro medio (4). Es la principal causa de disfagia en niños y adultos jóvenes y la segunda causa de esofagitis crónica después de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (5,6). La EoE es especialmente prevalente en los países occidentales y en las regiones con un mayor nivel de desarrollo socioeconómico, afectando a individuos de cualquier raza, sexo y edad (7). La enfermedad es más frecuente en niños y adultos jóvenes, con una prevalencia de al menos un caso por cada 2.000 habitantes en Europa y EEUU (7-9). Una revisión sistemática con metaanálisis, publicada en el año 2016, que

resumía todos los estudios de base poblacional disponibles hasta esa fecha, mostró una incidencia global de 3,7 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, mientras que la prevalencia media estimada fue de 22,7 casos por 100.000 habitantes. Los autores, además, mostraron un aumento progresivo en la incidencia y prevalencia de la EoE cuando se analizaron los datos obtenidos a partir de 2008 (4). En el caso particular de nuestro país, dos estudios recientes realizados en el periodo de 2007 a 2016 han determinado una incidencia anual para todas las edades en torno a 10 nuevos casos/100.000 habitantes y año, y una prevalencia de 82-112 pacientes/100.000 habitantes, lo que supone que la enfermedad afecta en la actualidad al menos a uno de cada 1.000 españoles (4,10).

1.2. Fisiopatología de la EoE.

La EoE es un proceso inflamatorio multifactorial de la mucosa esofágica que ocurre en sujetos con una predisposición genética, y que combina:

1.2.1) Una barrera mucosa esofágica deficiente.

1.2.2) Una reacción inmunitaria anormal a los aeroalérgenos y trofoalérgenos mediada por interleucinas Th2; y finalmente

1.2.3) Lesiones esofágicas inmediatas y dismotilidad, asociada con remodelación y fibrosis secundarias.

1.2.1. La respuesta inflamatoria epitelial: una barrera mucosa esofágica deficiente.

En los últimos años, el papel potencial de la inmunidad innata en la EoE es cada vez más relevante. En contraste con la inmunidad adaptativa que es altamente específica, el sistema inmunológico innato reconoce y responde a las agresiones ambientales y patógenos externos sin la necesidad de una respuesta antígeno-específica. Las células epiteliales esofágicas se han revelado como las principales células efectoras, capaces de iniciar fenómenos inflamatorios en la EoE, no sólo a través de la liberación de quimiocinas como la eotaxina-3, que participa en el reclutamiento de eosinófilos, sino también al promover el reclutamiento hacia el esófago de células T asesinas naturales (NKT) y mastocitos (11-13). Así mismo, los cambios en la composición del microbioma esofágico descritos tanto en niños como en adultos con EoE, se han reconocido como un factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad (14-18). Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores transmembrana de tipo I, que se expresan tanto en células epiteliales como en células de la lámina propia, y tienen la capacidad de distinguir entre microbios patógenos y comensales por el reconocimiento de patrones microbianos (19). En los seres humanos hay un total de 11 TLR diferentes (nombrados de TLR1 a TLR11), cada uno con diferentes especificidades que, una vez estimuladas, activan las vías de transducción de señales intracelulares mediadas por MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinasas y NFκB (*Nuclear Factor-Kappa B*), lo que finalmente desencadena una respuesta inmunitaria inflamatoria (tabla 1). La mayoría de los TLRs se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tipos celulares del sistema inmune (20), incluyendo células dendríticas,

macrófagos, NKT, mastocitos, neutrófilos y linfocitos T y B; aunque también se encuentran en células que no forman parte directa del sistema inmune, como fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos. Los TLR juegan un papel central en el inicio y mantenimiento de la actividad inmune innata, pero además los TLRs, actúan como vínculo entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, ya que de su señalización depende la activación y maduración de las células presentadoras de antígenos y las células T reguladoras (Tregs) (21, 22).

Tabla 1. TLRs descritos en humanos, ubicación celular y ligandos.

TLR	Ubicación	Células	Ligandos conocidos (Patrón microbiano)	Ubicación ligandos
TLR1	Superficie celular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B	Lipopéptidos	Bacterias
TLR2	Superficie celular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos	Glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácido lipoteicoico y otros	Bacterias
TLR3	Intracelular	Células dendríticas y linfocitos B	RNA de doble cadena	Virus
TLR4	Superficie celular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, linfocitos B y células epiteliales	Lipopolisacáridos, fibrinógeno, ácido hialurónico, proteínas y otros	Bacterias
TLR5	Superficie celular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales	Flagelina	Bacterias
TLR6	Superficie celular	Monocitos, macrófagos, mastocitos y linfocitos B	Lipopolisacáridos	Bacterias
TLR7	Intracelular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B	RNA cadena simple y otros	Virus
TLR8	Intracelular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos	RNA cadena simple y otros	Virus
TLR9	Intracelular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B	Oligonucleótidos, DNA y otros	Bacterias
TLR10	Superficie celular	Monocitos	Hongos	Desconocido
TLR11	Intracelular	Monocitos, macrófagos y células epiteliales	Ácido hialurónico y otros	Bacterias

Tras una agresión a la mucosa esofágica producida por agentes externos (alérgenos, microbios, etc) se induce en el epitelio esofágico una respuesta inflamatoria (23). Las células epiteliales del esófago expresan TLRs (24,25) y estos receptores inducen la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a los patrones microbianos asociados al patógeno (24, 26). Cuando un TLR se une a su ligando, se dispara una cascada inflamatoria intracelular, que permite activar la expresión de genes de citoquinas, creando así un ambiente de inflamación que ayudará a reclutar otras células del sistema inmune. Las células epiteliales derivadas de pacientes con EoE pueden producir citoquinas proinflamatorias como RANTES (CCL5), un factor quimiotáctico para linfocitos T, eosinófilos y basófilos (27), CXCL16

(12), que actúan en la migración y activación de células NKT, así como en la producción de eotaxina-3, IL33 y TSLP.

En los últimos años, múltiples estudios han investigado las vías de señalización mediadas por los TLRs en diferentes enfermedades alérgicas, reconociéndose un papel predominante de TLR 2, 4 y 9, por ejemplo, en el asma bronquial (28-30) y en alergia alimentarias IgE mediadas (31, 32). Sin embargo, pocos estudios han abordado su papel potencial en la EoE. En el año 2018, Arias *et al.* (33), estudiaron la expresión de los TLR y sus mediadores en 10 pacientes con EoE activa y después de ser sometidos a tratamiento dietético. Estos autores observaron un aumento de expresión de TLR1, TLR2, TLR4 y TLR9 en la mucosa inflamada de pacientes con EoE activa y una disminución, cuando los pacientes eran sometidos a un tratamiento dietético efectivo.

La pérdida de la integridad de la barrera epitelial en la EoE se atribuye a la desregulación de importantes proteínas estructurales en la mucosa inflamada, incluidas las proteínas de la unión estrecha (Tight Junctions- TJ) (34-36). La TJ es una estructura dinámica compuesta por claudinas transmembrana, ocludina y proteínas citosólicas (es decir, zónula ocludens-1, zónula ocludens-2 y zónula ocludens-3), que conectan la TJ con el citoesqueleto (37-39). La expresión de ocludina y claudina-1 está disminuida en el tejido de biopsias de pacientes con EoE tanto antes como después del tratamiento con glucocorticoides deglutidos (34, 40). Recientemente, Ruffner *et al* (41) han analizado si el epitelio esofágico tiene mecanismos para modular la expresión de la proteína del complejo TJ mediada por TLR 2 y TLR3. Los autores observaron una fuerte expresión de TLR2 y TLR3 en células epiteliales primarias aisladas. Sus datos muestran que la estimulación de TLR2 es más eficaz y precoz que la del TLR3 en aumentar la expresión de las proteínas asociadas a la TJ, como son la claudina-1 y ZO-1. Sin embargo, la estimulación de TLR3 se ha mostrado que activa el NF- κ B, dando lugar a la secreción de IL-8 y TSLP (24,42)

Además, las células epiteliales esofágicas también pueden funcionar como APC no profesionales (43) participando en la activación de la inmunidad adquirida. También están presentes en el epitelio esofágico, las células linfoides innatas (ILC) (12,44), células inmunes residentes en los tejidos y que actúan como grandes reservorios para la producción de citoquinas. Las ILC-tipo 2 expresan CRHT2 y son inducidas por IL33 y TSLP para producir citoquinas de tipo Th2 (IL5 e IL13) (12). Al igual que en otros trastornos alérgicos, es muy probable que el deterioro de la barrera conduzca a la

producción y liberación de alarminas (grupo de moléculas endógenas que son multifuncionales), que tienen funciones fisiológicas dentro de la célula, pero cuando se liberan de células muertas o de células sometidas a estrés endógeno, funcionan activando la inmunidad innata, favoreciendo la liberación de citoquinas (IL33, IL25, TSLP) (45-47).

1.2.2. Una respuesta inmunitaria distinta tipo Th2

La EoE se ha identificado con una respuesta inmunológica de tipo Th2 mediada por linfocitos T CD4+ y llevada a cabo predominantemente por citoquinas como IL4, IL5, IL13, IL15, TSLP y eotaxina-3.

1. 2. 2.1 Citoquinas asociadas a respuesta Th2 en EoE:

TSLP es una citoquina producida por las células epiteliales esofágicas, que actúa conduciendo/dirigiendo a las células dendríticas hacia una respuesta de tipo Th2, constituyendo un nexo entre la activación de las células epiteliales y la respuesta inmune (respuesta inmune innata/respuesta inmune adquirida) (48-50). Sherrill et al. (51), en el año 2010, describieron la expresión de ARNm de TSLP por las células epiteliales primarias esofágicas tras la activación de la vía TLR3. Los basófilos presentes también en el infiltrado eosinofílico expresan el receptor de TSLP, actuando TSLP como un factor de proliferación de los basófilos con un papel complejo, que induce una respuesta inmune Th2, aumenta el reclutamiento de basófilos y células presentadoras de antígeno (CPA) y promueve otras enfermedades alérgicas como la dermatitis atópica y el asma (52-57).

En la EoE, la IL4 es expresada por diversas fuentes celulares como basófilos (tras su activación por TSLP), células Th2 y células NKT (26, 58). La IL4 favorece el viraje de las células T naïve a células Th2 y activa el cambio de clase de las células B para producir IgE, induciendo una respuesta inmune de tipo Th2 (59). Al mismo tiempo modula la función de las células dendríticas hacia una respuesta de tipo Th2.

La IL5 participa en la proliferación, diferenciación, maduración y liberación de eosinófilos y mastocitos y en su eventual migración al epitelio esofágico (59-61). La expresión de IL5, se encuentra aumentada en el esófago de los pacientes con EoE (26,54) y en diferentes modelos murinos, se ha demostrado el papel clave de la IL5 en la EoE. La IL5 participa también en la activación de los linfocitos T y los mastocitos en las reacciones alérgicas crónicas (59).

Sin embargo, la IL13 derivada de células TH2 y eosinófilos activados parece jugar un papel mucho más relevante en el desarrollo de la EoE en humanos (26, 62, 63). Los niveles de IL13, están significativamente más elevados en pacientes con EoE que en los sujetos controles (62,63), y se ha demostrado en diversos estudios de cultivos celulares su efecto directo en la producción de cambios de expresión genética característicos de EoE. La sobreexpresión esofágica de IL13 por las células Th2 aumenta el ligando de quimiocinas 26 (CCL26), la eotaxina-3 y la expresión de periostina (POSTN), el reclutamiento eosinófilo del conjunto circulante y la expresión de calpaína 14 (CAPN14) responsables de la producción de STAT6 e IL33 (64,65). También aumenta la supervivencia de los linfocitos T y disminuye la expresión local de desmogleína 1 (DSG1), filagrina (FLG) y el complejo de diferenciación

epidérmica (CDE), lo que altera la barrera epitelial (59,66,67). Así mismo, induce la remodelación de los tejidos promoviendo el depósito de colágeno, la angiogénesis y la hiperplasia eosinofílica (59,68). Los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-IL5 y anti-IL13 han demostrado su capacidad para disminuir la eosinofilia esofágica (60,69,70). Aunque estos estudios no apoyaron el uso clínico de estos fármacos ya que no demostraron una reducción significativa de los síntomas.

La eotaxina-3 (CCL26) es especialmente relevante en el reclutamiento de eosinófilos hacia el esófago en los pacientes con EoE (71). Las eotaxinas son una subfamilia de quimiocinas (que comprende tres moléculas 1, 2 y 3) y que actúan como potentes quimioatrayentes específicos para los eosinófilos a través del receptor de quimiocinas CCR3, que se expresa constitutivamente en estas células (71). En concreto, eotaxina-3 es la que desempeña el papel más relevante en EoE en humanos; en estudios de transcriptomas de células epiteliales del esófago, el gen de la eotaxina-3 es el más intensamente expresado (71). La expresión de eotaxina-3 se correlaciona de manera directa con la densidad de eosinófilos en el tejido y las interacciones IL13, eotaxina-3 y CCR3 han sido sugeridas como la principal vía de activación de la inflamación eosinofílica del esófago (11,54).

La IL15 también se encuentra aumentada, hasta seis veces en los tejidos y dos veces en el suero, en pacientes con EoE en comparación con sujetos controles (72). Se produce predominantemente por monocitos, macrófagos y células dendríticas y actúa sobre los linfocitos T para producir quimiocinas que estimulan los eosinófilos (59). La IL15 es una citoquina con una similitud estructural con la IL2 que se une y señala a través de un complejo

compuesto por la cadena beta del receptor de la IL2/IL15 (CD122) y la cadena gamma común (CD132). La IL15 desempeña un papel importante en la inmunidad antiviral al favorecer el desarrollo, la supervivencia, la proliferación y la activación de múltiples linajes de linfocitos, incluidas las células NKT (72). Recientemente se ha demostrado que la IL15 apoya las respuestas inflamatorias alérgicas de tipo Th2, posiblemente promoviendo localmente la síntesis de IgE frente a alérgenos en pacientes con EoE (11,67,72,73).

1.2.2.2. Células inmunes asociadas a la respuesta Th2.

El infiltrado inflamatorio que caracteriza la EoE está constituido por varios tipos celulares que contribuyen a la inmunopatología de la enfermedad:

Los eosinófilos son células sanguíneas originadas en la médula ósea que participan en la respuesta inmunológica frente a parásitos y en las reacciones de hipersensibilidad alérgicas. La presencia de eosinófilos (y mastocitos intraepiteliales), que suelen estar ausentes en la lámina propia y la submucosa esofágica, define a la EoE (59,64). Los eosinófilos además de constituir el componente inflamatorio mayoritario en la EoE, contribuyen de manera relevante a la fisiopatología de la enfermedad, actuando como células efectoras finales ocasionando el daño epitelial asociado a la enfermedad (74). Se reclutan desde la reserva de sangre por quimiotaxis local y son las encargadas de iniciar y mantener la respuesta inflamatoria. Secretan la peroxidasa eosinofílica (POE), la proteína catiónica eosinofílica y la proteína principal de unión (PPU), un antagonista del receptor muscarínico M2, que causa daño celular directo y dismotilidad esofágica, lo que aumenta la flexibilidad de las células del músculo liso (59,64,74,75).

Los mastocitos y los productos de su desgranulación también se encuentran aumentados en el epitelio esofágico de pacientes con EoE (76-78). Participan en la activación eosinofílica, la dismotilidad y la remodelación esofágica, con la aparición de fibrosis. Su patrón de secreción de proteasas y el aumento de la expresión de carboxipeptidasa A3 y triptasa podrían ser específicos de EoE (78).

Las células de Langerhans, las CPA de la capa de queratinocitos, interactúan con los antígenos al comienzo de la cascada patológica. Expresan FcεRI, que correlaciona con el nivel de respuesta Th2 en las patologías atópicas (78-80).

Los basófilos, al igual que los eosinófilos, se originan en la médula ósea y se reclutan por quimiotaxis local. Expresan el receptor de TSLP que a su vez induce, una respuesta inmune Th2, aumenta el reclutamiento de basófilos y CPA (53,54,81).

El infiltrado inflamatorio de la EoE presenta además una alta densidad de linfocitos T, (75% son CD8+), siendo significativamente mayor que en los sujetos sanos y que en los pacientes con reflujo gastroesofágico (44). Además, el epitelio esofágico de los pacientes adultos (82) y niños (83) con EoE presenta una pequeña proporción de linfocitos B (CD20+), que tras su maduración a células plasmáticas, producen y secretan inmunoglobulinas.

Diversos estudios recientes han destacado el papel de las células NKT en el desarrollo temprano de la EoE (12). Estas células participan en las fases iniciales de la respuesta inmune, y pueden contribuir de manera relevante a la generación de tolerancia inmunitaria o autoinmunidad. Las células NKT son atraídas a los tejidos por la quimiocina CXCL16, derivada de células

presentadoras de antígenos y células epiteliales, cuyos niveles se relacionan de manera directa con la densidad de células NKT (84). Las células NKT han sido reconocidas además como la principal fuente de citoquinas Th2 en la EoE, al menos en las formas infantiles (12, 27, 54).

1.2.3. Las Lesiones esofágicas

En las biopsias esofágicas, la disminución de la expresión de DSG1, FLG y el ensanchamiento del espacio intercelular hacen que la barrera esofágica sea más permeable a los antígenos (66, 85, 86). La PPU y el factor de crecimiento tisular (TGF- β), proteínas y mediadores que se secretan por eosinófilos, aumentan la secreción de triptasa, quimasa y enzimas proteolíticas, que contribuyen al daño de la matriz extracelular. La estimulación de los fibroblastos por PPU, TGF- β y la fibrosis se correlaciona con la remodelación esofágica completa e irreversible (87).

La fibrosis asociada con la EoE es debida a la activación de eosinófilos, y la liberación del contenido de las enzimas de sus gránulos citoplasmáticos, concretamente la proteína básica mayor (MBP). La MBP aumenta la expresión del gen del factor de crecimiento de fibroblastos-9 (FGF-9) en biopsias de pacientes con EoE (88). La FGF-9 participa en la respuesta proliferativa secundaria al daño tisular, en la activación de fibroblastos y en el depósito de matriz extracelular. Los pacientes con EoE, presentan un aumento en la densidad de mastocitos en el epitelio y en la lámina propia del esófago (44), que junto con los eosinófilos constituyen las principales fuentes de factor de

crecimiento tisular (TGF-B), citoquina más ampliamente relacionada con la remodelación fibrosa y que contribuye al aumento en la contractilidad de las fibras musculares lisas. Diversos investigadores han demostrado un aumento de remodelación fibrosa por depósito de colágeno subepitelial en niños y adultos con EoE con sobreexpresión de TGF-B, FGF-9, IL5 y la quimiocina CCL28 (89,90).

La remodelación en los tejidos implica el desarrollo de cambios morfológicos y funcionales en el músculo liso (91), como a hipertrofia de la *muscularis mucosae* y de las capas longitudinal y circular de la muscular propia descritas en niños y adultos con EoE (92,93). También han sido descritas en pacientes con EoE la infiltración eosinofílica de la submucosa y del plexo mientérico neuronal (88), con una remodelación esofágica profunda con fibrosis irreversible es la principal complicación en la EoE.

El tejido esofágico de pacientes con EoE muestra también niveles aumentados de diversos factores angiogénicos en comparación con los sujetos controles sanos, incluyendo CD31, factor de von Willebrand, factor vascular de crecimiento epitelial (VEGF-A) y molécula de adhesión celular vascular tipo 1 (ICAM-1) (88). Estas proteínas promueven la neo-vascularización, la remodelación angiogénica y el aumento de la permeabilidad vascular facilitando la llegada desde la médula ósea de células inflamatorias hacia el esófago, que se activan al liberar sus proteínas granulares a nivel local (74).

Por tanto, la fisiopatología de la EoE es compleja, ya que están involucradas diversas vías, con muchas células inmunitarias y citocinas que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad (59).

Como resumen de la fisiopatología de la EoE, podríamos decir que una agresión externa al epitelio esofágico induce la liberación de TSLP/IL33 por las células epiteliales esofágicas, lo que conduce a la estimulación de células Th2, células NK, mastocitos, basófilos e ILC2. La activación de estas células produce la liberación de IL4, que a su vez, induce la diferenciación Th2 de las células y modula la función de las células dendríticas hacia una respuesta de tipo Th2. La IL4 y la IL13 inducidas por las células Th2 inducen la eotaxina-3 (CCL26), principal reclutador de eosinófilos en el esófago y que estimula a los eosinófilos para que secreten IL5. La IL5, secretada por las células Th2 y los mastocitos, participa en la proliferación, diferenciación, maduración y liberación de eosinófilos y mastocitos. Los mastocitos también inducen TGF- β 1 que estimula los eosinófilos y los fibroblastos. IL13 induce la expresión de periostina (POSTN), y la expresión de calpaína 14 (CAPN14) responsables de la producción de STAT6 e IL33 que es responsable, en definitiva, de las principales alteraciones de la función de la barrera epitelial (disminuye la expresión local de desmogleína 1 (DSG1), filagrina (FLG) y el complejo de diferenciación epidérmica). Así mismo, induce la remodelación y fibrosis de los tejidos.

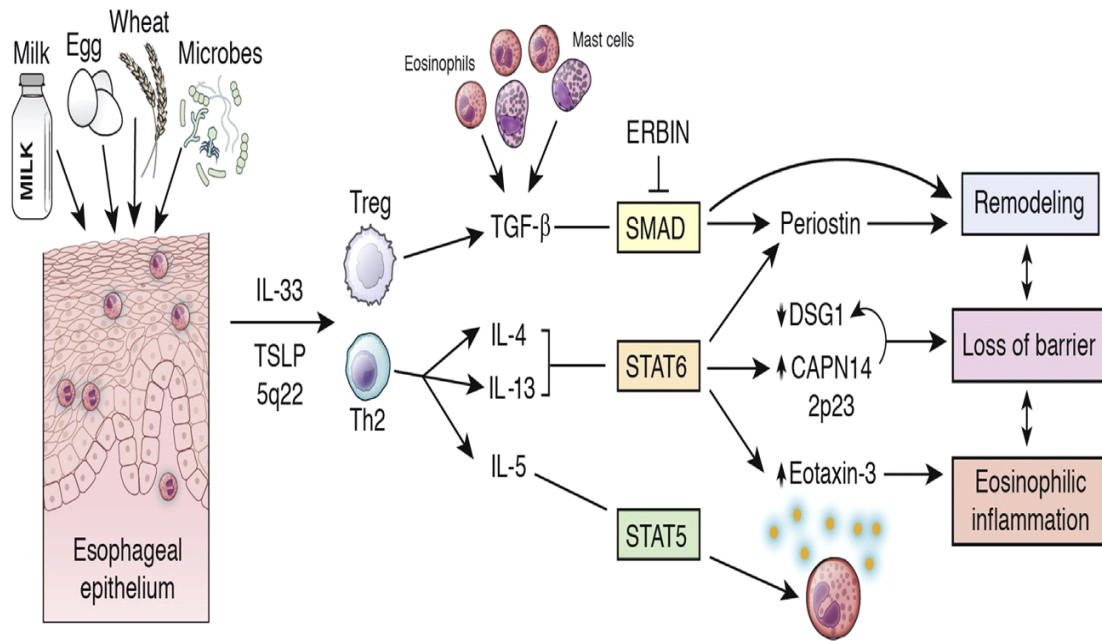


Figura 1. Fisiopatología EoE. Respuesta inflamatoria epitelial. IL-33 (interleucina-33), TSLP (linfopoetina tímica estromal), Treg (células T reguladoras), TGF-β (factor de crecimiento tisular), DSG1 (desmogleina 1).

1.3. Componentes genéticos en la esofagitis eosinofílica.

1.3.1 Variaciones genéticas en enfermedades complejas

Las variantes genéticas pueden estar implicadas en la patogénesis de enfermedades complejas, como la EoE. Las manifestaciones clínicas de la EoE y la respuesta al tratamiento varían de unos individuos a otros y esta variación está determinada, al menos en parte, por factores genéticos. La secuenciación del genoma humano ha permitido la caracterización e identificación de cientos de miles variantes genéticas. La mayoría de estas variantes genéticas están presentes en el 1% de la población y son consideradas variantes polimórficas (94). Entre los diferentes tipos de polimorfismos genéticos, los más frecuentes son cambios de una sola base (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Este tipo de polimorfismo representa hasta el 90% de todas las variaciones del genoma, encontrándose un SNP aproximadamente cada 1.300 pb. Los SNPs que se encuentran próximos en el genoma muestran desequilibrio de ligamiento, es decir, tienden a heredarse juntos formando los denominados bloques de ligamiento (95, 96). La combinación de los SNPs que componen estos bloques es lo que se conoce como haplotipos. Para la identificación de un haplotipo no es necesario el genotipado de todas las variantes que lo integran, sino de un conjunto informativo de las mismas. A los SNPs informativos que caracterizan un haplotipo determinado se les denomina tag SNPs (tSNPs) (97). El Proyecto Internacional HapMap se diseñó con el objetivo de identificar toda la información relativa a los bloques de ligamiento existentes a lo largo del genoma en diferentes poblaciones y estudiar la frecuencia de los tSNPs, e integrarla en una base de datos de dominio público (The International HapMap Consortium, 2005).

Los SNPs pueden estar localizados en la región codificante, en la región reguladora del gen o en la región intergénica y pueden inducir cambios en la proteína, en el patrón de expresión del gen o no tener ningún efecto en el gen. Así, variaciones en la región 5'UTR, pueden alterar los niveles de expresión, ya que es sitio de unión de factores de transcripción, pueden afectar al "splicing" del ARNm, mientras que las variantes localizadas en la región 3'UTR pueden afectar al transporte, estabilidad y vida media del ARNm. Las variaciones que se localizan en un exón pueden generar un cambio sinónimo, si el nuevo codón codifica el mismo aminoácido, o no sinónimo, si el nuevo codón codifica un aminoácido diferente, lo que alteraría la secuencia de la proteína y podría tener consecuencias en su función biológica. También puede generar la aparición de un codón prematuro de parada de la traducción y dar lugar a la síntesis de proteínas truncadas (94).

Existen diferentes estrategias para investigar las asociaciones entre variantes genéticas y enfermedad. Una de las estrategias más usadas es el estudio caso-control que se basan en la comparación de un grupo de individuos que presenta una determinada característica (grupo de casos) con otro sin dicha característica (grupo de controles). Este diseño experimental es uno de los más utilizados para evaluar la asociación entre genes y enfermedades. Hay diversos tipos de estudios de asociación genética que se pueden resumir en dos: los estudios con hipótesis "*a priori*" y los estudios libres de hipótesis. En los estudios con hipótesis "*a priori*" se seleccionan genes "candidatos" entre aquellos que pueden estar directa o indirectamente relacionados con la patología; mientras que en los estudios sin hipótesis *a priori* se realiza un estudio sistemático de parte o de todo el genoma (94, 98). En los últimos años

el desarrollo tecnológico nos ha permitido disponer de herramientas para realizar estudios de genotipado masivo. En el año 2007 surgen los denominados “Genome Wide Association Studies” (GWAS) (99), que son estudios de casos y controles donde se realiza un escrutinio sistemático de los polimorfismos de todo el genoma, es decir son estudios libres de hipótesis. En estos estudios se necesita un gran número de casos y controles para alcanzar un poder estadístico, ya que el elevado número de variantes estudiadas determina que el punto de corte de la significación estadística se establezca en un valor de $p=10^{-8}$ para evitar los errores estadísticos tipo I (falsos positivos)(99). Independientemente del diseño y la estrategia utilizada, la asociación de cada polimorfismo con la enfermedad se determina comparando la distribución de los alelos en el grupo de casos y controles (modelo alélico). Aunque hay que tener en cuenta que existen diferentes modelos de herencia, así tenemos el modelo dominante según el cual, una única copia de la variante de riesgo es suficiente, es decir, el riesgo de los portadores de 2 copias es igual al de los portadores de 1 copia; el modelo recesivo que supone que son necesarias 2 copias de la variante de riesgo y, por tanto, el riesgo de los portadores de 1 copia es igual al de los individuos que tienen 0 copias; el modelo aditivo, según el cual cada copia de la variante de riesgo tiene una influencia sumatoria, es decir, el riesgo de los individuos con 2 copias es el doble del riesgo de los individuos que tienen 1 copia, pero estos también tienen riesgo con respecto a los individuos con 0 copias (94,100)

Otra cuestión es la necesidad de replicación de las asociaciones encontradas en los estudios genéticos. Los estudios genéticos requieren de estudios de replicación en diferentes poblaciones para asegurar su fiabilidad,

es decir, que se trata de una verdadera asociación (que no se ha encontrado por problemas relacionados con el diseño del estudio), y para determinar si la asociación se encuentra en distintas poblaciones (99). Paralelamente, son necesarios estudios funcionales para investigar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la asociación con enfermedad.

1.3.2 Genética de la EoE

La asociación familiar en la EoE ha sido ampliamente estudiada y descrita en la literatura científica, existiendo una asociación principalmente entre hermanos, aunque también se ha descrito para otros grados de parentesco, lo que sin duda apoya una base genética de la enfermedad (101). En los estudios de asociación familiar realizados, la frecuencia de EoE se encuentra elevada entre los familiares de primer grado (102). Los análisis de la concordancia en gemelos han proporcionado también información importante sobre la base genética de la EoE (103). El riesgo de desarrollar enfermedad en las familias de los pacientes con EoE es de un 41% en los gemelos homocigotos, un 22% en los gemelos dicigóticos, y 2,4% en los hermanos versus el 0,055% obtenido en la población general. El alto riesgo de EoE en familiares de pacientes afectados sugiere la hipótesis de la predisposición genética, pero la variabilidad en gemelos dicigóticos apoya la existencia de variables ambientales modificadoras (17,18,104,105).

La epigenética es el proceso por el cual el fenotipo de un sujeto se altera mediante metilación e hidroximetilación, expresión de ARN no codificantes (ARNnc) y modificaciones postraduccionales (PTM) de proteínas histonas sin que se realicen cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN.

La epigenética proporciona un vínculo plausible entre la genética y el medio ambiente, ofreciendo oportunidades para avanzar en el manejo clínico mediante la comprensión de los factores de riesgo ambientales modificables (106). El papel de la epigenética en la EoE, se respalda por un análisis de cohortes de gemelos que muestra la importancia de los factores ambientales (81,0%) en comparación con la heredabilidad (14,5%) en la variabilidad fenotípica (103). La alta concordancia de EoE en gemelos dicigóticos implica exposiciones tempranas en la susceptibilidad (104). Curiosamente, el uso de antibióticos en la infancia, el parto por cesárea, el parto prematuro, la estación del parto, el peso al nacer y la lactancia se han identificado como factores que afectan el desarrollo de la EoE (105). Aunque no conocemos los mecanismos específicos por el cual éstas y otras exposiciones tempranas aumentan o disminuyen el riesgo, todas afectan el microbioma, que influye en el desarrollo del sistema inmunológico y en el desarrollo de la atopia (107-109).

En la Tabla 2 se muestran los genes asociados con EoE identificados mediante estudios GWA hasta la fecha, aunque muchas de estas asociaciones no se han podido replicar. La mayoría de las variantes genéticas descritas se encuentran en regiones intergénicas (36,7%) o regiones intrónicas (42,4%) y sólo el 2,2% de las variantes cambian la secuencia de aminoácidos de los genes. Por lo tanto, la mayoría de las variantes de riesgo asociadas a EoE están fuera de las regiones codificantes de los genes. Las variantes no codificantes se encuentran en promotores de genes, intrones y regiones del genoma con actividad reguladora (por ejemplo, potenciadores, silenciadores o aislantes). Se plantea la hipótesis de que estas variantes afecten la expresión

génica a través de la unión diferencial de factores de transcripción o efectos basados en la cromatina sobre la regulación génica (66,110,111).

Tabla 2. Variantes genéticas relacionadas con la EoE

Localización cromosómica	Variante genética Tag	PMID	Genes y variantes de riesgo	Riesgo de frecuencia alélicas	Valor P	Odds Ratio
1p13.3	rs2000260	25017104	SLC25A24	0.57	7x10 ⁻⁷	1.32
1p36.13	rs28530674	25017104	KIF17	0.04	3x10 ⁻⁷	1.83
	rs2296225	25017104		0.08	1x10 ⁻⁷	1.63
1p32.2	rs11206830	25017104	AC119674.2	0.02	8x10 ⁻⁸	2.16
2p23.1	rs149864795	25407941	CAPN14	0.052	5x10 ⁻¹⁰	2.22
	rs77569859	25017104		0.05	3x10 ⁻¹⁰	1.98
3q26.32	rs6799767	20208534		0.58	4x10 ⁻⁷	1.49
4q21.1	rs13106227	20208534	SHROOM3	0.62	4x10 ⁻⁶	1.52
	rs1986734	20208534		0.49	1x10 ⁻⁶	1.54
5q22.1	rs3806932	20208534	WDR36, TSLP	0.54	3x10 ⁻⁹	1.85
	rs3806933	25017104		0.56	2x10 ⁻⁸	1.37
	rs252716	25407941		0.447	4x10 ⁻¹⁴	1.52
5q23.1	rs2055376	25017104	SEMA6A	0.02	7x10 ⁻⁸	2.30
5q14.2	rs1032757	20208534		0.07	2x10 ⁻⁶	1.96
6p11.2	rs9500256	20208534	AL445250.1	0.58	5x10 ⁻⁶	2.04
8p23.1	rs2898261	25017104	XKR6	0.58	5x10 ⁻⁸	1.35
10p12.31	rs11819199	25017104	MIR4675	0.06	3x10 ⁻⁷	1.62
10q23.1	rs2224865	20208534	MARK2P15 - LINC02650	0.31	9x10 ⁻⁶	1.44
11q13.5	rs61894547	25407941	LRRC32, EMSY, CAPN5	0.043	4x10 ⁻¹¹	2.44
	rs2155219	25017104		0.51	4x10 ⁻⁷	1.37
	rs77301713	25017104		0.02	1x10 ⁻⁷	2.22
11q14.2	rs118086209	25017104	CCDC81	0.02	2x10 ⁻⁷	2.19
11q21	rs1939875	20208534	NR	0.26	3x10 ⁻⁶	1.54
12q13.3	rs167769	20208534	STAT6	0.37	2x10 ⁻⁶	1.36
	rs167769	25407941		0.377	2x10 ⁻⁷	1.35
14q12	rs8008716	25407941	NOVA1	0.087	7x10 ⁻⁸	1.71
15q13.3	rs8041227	25017104	LOC283710, KLF13	0.72	6x10 ⁻¹⁰	1.52
16p13	rs12924112	29904099	CLEC16A	0.301	2x10 ⁻⁹	0.76
16q24.1	rs371915	20208534	MEAK7	0.87	2x10 ⁻⁸	1.90
17q24.3	rs6501384	20208534	CALM2P1 - AC011990.1	0.33	6x10 ⁻⁶	1.41
17q25.3	rs3744790	25017104	TIMP2, CEP295NL	0.8	8x10 ⁻⁷	1.54
18q12.1	rs7236477	20208534	DSG1, DCC	0.03	7x10 ⁻⁶	2.22
	rs9956738	25017104		0.01	4x10 ⁻⁷	2.47
19q13.11	rs3815700	25407941	ANKRD27	0.14	2x10 ⁻⁹	1.62
21q22.3	rs17004598	25017104	HSF2BP	0.01	1x10 ⁻⁷	2.57
22q11.21	rs2075277	25017104	P2RX6	0.09	9x10 ⁻⁷	1.54

Hasta la fecha, los datos respaldan un modelo en el que las variantes de riesgo genético afectan la expresión génica y provocan cambios estructurales y fisiológicos en la función de las células epiteliales e inmunitarias. Se supone que estos cambios conducen a la EoE en el contexto de otros cambios moleculares y fisiológicos mediados por el medio ambiente (112,113).

1.3.3. De la genética a la fisiopatología.

Los componentes genéticos de la patogénesis de EoE son complejos y afectan a múltiples niveles de su fisiopatología

1.3.3.1) Genes implicados en la integridad de la función epitelial esofágica

1.3.3.2) Genes implicados en las respuestas inmunes mediadas por Th2.

1.3.3.3) Interacciones de genes

1.3.3.1. Primer componente: la función de la barrera epitelial.

Rochman *et al* (85), demostraron que aproximadamente el 40% de los genes específicos del epitelio esofágicos implicados fundamentalmente en la queratinización y la diferenciación celular están desregulados en la EoE. El complejo de diferenciación epidérmica (CDE), localizado en el cromosoma 1q21, está formado por un grupo de genes encargados de la diferenciación epitelial y se encuentran desregulados en el transcriptoma de la esofagitis en respuesta a la IL13. Entre los genes EDC se encuentran la FLG e involucrina (IVL). La expresión de FLG está regulada negativamente por la IL13 y disminuida en la mucosa esofágica de pacientes con EoE (11). Se ha

identificado una variante genética en el gen de la (FLG) (2282del4) que aumenta el riesgo de EoE (86,114).

La DSG1 es un componente de cadherina desmosomal transmembrana que facilita las interacciones dependientes de calcio entre las células adyacentes y dan estructura y resistencia mecánica al epitelio. Los autoanticuerpos DSG1 se encuentran en el pénfigo foliáceo y el pénfigo vulgar, enfermedades epiteliales escamosas que presentan una disminución de la adhesión celular, lo que resulta en ampollas epidérmicas, y algunos pacientes presentan infiltración eosinofílica (66). Sherrill *et al.* (66) demostraron que la expresión de DSG1 disminuye en la EoE activa y que la deficiencia de DSG1 en el sistema epitelial esofágico *in vitro* conduce a cambios histológicos que incluyen acantólisis y hendidura intraepidérmica, así como una función de barrera deteriorada. Esta alteración de la función de barrera, también se observa en las biopsias de pacientes con EoE. Dos estudios recientes han demostrado que las familias con mutaciones recesivas en DSG1 tienen un fenotipo de alergia grave, incluyendo un paciente con EoE (115,116).

Las rutas de serina peptidasa también se han relacionado recientemente con EoE. Los inhibidores de la serina proteasa (SERPIN) y los inhibidores de la serina proteasa tipo Kazal (SPINK) fueron las familias de peptidasa más desreguladas en EoE (85). También se ha demostrado que las serinas peptidasas de calicreína están alteradas en EoE (117). Las proteasas juegan un papel clave en la fisiopatología de la EoE, promoviendo la pérdida de la integridad estructural de la mucosa, lo que conduce, a su vez, a un deterioro de la función de barrera.

La integridad de la barrera epitelial esofágica, por tanto, puede estar alterada por varias vías que la desregulan y que posiblemente tengan un efecto aditivo (de sumación) entre ellas, determinando una alteración en la permeabilidad tisular y la captación de alérgenos, que pueden conducir finalmente a una respuesta Th2 inapropiada y disfuncional.

1.3.3.2. Segundo componente: la respuesta inmune Th2.

En el año 2006 Blanchard *et al.* (71), utilizando el enfoque de genes candidatos, identificaron una variante en la región no traducida de CCL26 (codifica eotaxina-3) asociado con EoE. El ARNm y la proteína eotaxina-3 están sobre expresados en células epiteliales del esófago tratadas con IL13 en pacientes con EoE en comparación con controles.

En el año 2010 se realizó el primer estudio de asociación de todo el genoma (GWAS)(118), genotipando a 351 pacientes con EoE y 3.104 controles sanos y evaluando 550.000 polimorfismos. En el cromosoma 5q22, un sólo locus que abarca los genes TSLP y el dominio de repetición WD 36 (WDR36) mostró una asociación significativa con EoE (118). Para determinar cuál de los dos genes de la región estaba asociado con la enfermedad, los autores examinaron los patrones de expresión de ambos genes en biopsias esofágicas demostrando una regulación positiva estadísticamente significativa de la expresión de TSLP en casos de EoE, así como la correlación de la expresión de TSLP con la variante asociada a EoE (51). Los datos de expresión inicial sugirieron que el TSLP pudiera ser el gen causal que subyace a la asociación y trabajos posteriores se han confirmado esta asociación (119,120). El hallazgo de que los individuos homocigotos para el alelo de riesgo (AA) de TSLP tienen una mayor expresión de TSLP en el epitelio esofágico en comparación con los

heterocigotos y los homocigotos (GG) para los alelos protectores se replicó en una muestra independiente. También se ha demostrado que el genotipo de TSLP se correlaciona con una mayor respuesta de basófilos (121) en pacientes con EoE, así mismo, la inhibición de TSLP previene el desarrollo de EoE en modelos murinos. Por otra parte, Sherrill *et al.* han identificado una asociación significativa entre un SNP del receptor de TSLP (TSLP-R) y sujetos masculinos con EoE (51).

En el año 2014 se publicaron los resultados de otros dos GWAS en pacientes con EoE (119,120) replicando la asociación de TSLP con EoE. En estos estudios, además, se identificaron otros genes asociados con un nuevo locus en chr2p23.1 que incluye el gen CAPN14. También se describieron la asociación de tres nuevos loci adicionales, c11orf30-EMSY, STAT6 y ANKRD27 (122). Dos de los genes, c11orf30 y STAT6, se han asociado previamente con enfermedades alérgicas/inflamatorias, mientras que CAPN14 y ANKRD27 parecen específicos de EoE. En la *Tabla 3* se resumen los principales genes que contribuyen al desarrollo de EoE identificados en GWAs: TSLP, CAPN14, EMSY, LRRC32, STAT6 y ANKRD27 (118-120).

Tabla 3. Locus de riesgo genéticos de EoE (estadísticamente significativos y replicados)

Gen	Localización	Odds ratio	Mecanismo genético	Mecanismo patogénico
CAPN14	2p23	1.98	Induce la expresión de CAPN14, probablemente involucrando un mecanismo epigenético	Enzima proteolítica específica del esófago inducida por IL13e involucrada en la homeostasis y reparación epitelial
TSLP WDR36	5q22	0.74	Múltiples alelos de riesgo asociados a la expresión de TSLP	TSLP induce el desarrollo de células Th2 y activa eosinófilos y basófilos
LRRC32 EMSY	11q13	2.49	No descrito	LRRC32 es una proteína de unión y señalización de TGF-beta EMSY participa en la regulación transcripcional
STAT6	12q13	1.5	No descrito	
ANKRD27 PDCD5 RGS9BP	19q13	1.6	No descrito	ANKRD27 PDCD5 involucrada la apoptosis RGS9BP no expresada en esófago ni por células inmunes

CAPN14 (2p23) se encuentra en un “hotspot” epigenético modificado por IL13. La IL13 induce la acetilación de la histona 3 lisina 27 (H3K27) en el promotor CAPN14, y el haplotipo de riesgo asociado a la enfermedad promueve la unión de proteínas nucleares expresadas por las células epiteliales del esófago. CAPN14 produce una disminución de la expresión de DSG1, lo que contribuye junto con otras alteraciones al deterioro de la función de la barrera epitelial esofágica (111,120).

STAT6 (12q13) también se ha demostrado que se asocia independientemente con EoE, se activa por IL4 e IL13, y codifica un factor de transcripción que activa muchos genes identificados dentro de EoE (59,111, 123). El papel de LRCC32 (11q13) (proteína de unión y señalización de TGF-B) en EoE aún se está investigando, se asocia de forma independiente con EoE y está altamente expresado por las células reguladoras T FOXP3 + y juega un papel en la expresión de éste en la superficie de TGF-B (124). Es de destacar que c11orf30 (también vinculado a EMSY) y ANKRD27 se asocian independientemente con EoE; sin embargo, aunque están vinculados al crecimiento de tejidos y la cicatrización de heridas, respectivamente, su papel en la patogénesis de EoE aún no se ha establecido (111,124).

Algunos de los genes asociados con EoE contribuyen a la patogénesis de otras enfermedades atópicas como la dermatitis atópica (c11orf30, FLG) (125), el asma (TSLP, c11orf30, CCL26)(126), la sensibilización alérgica (TSLP, c11orf30, STAT6) (127), la rinitis alérgica (TSLP, c11orf30) (128) y los niveles de IgE sérica total (STAT6) (127).

1.3.3.3 Estudios de interacciones de genes en EoE:

Martin *et al.* (129) describieron la primera interacción gen-gen en EoE al demostrar que la asociación entre EoE y TSLP se fortalecía cuando estaba acompañada por una variante en la IL4, lo que indica que esta interacción puede actuar como un circuito de retroalimentación positiva para aumentar la inflamación alérgica dentro de EoE. Cuando los individuos portaban variantes de riesgo genético de EoE en los loci TSLP e IL4, el riesgo de EoE aumentaba a 3,7, en comparación con 1,3 y 1,6 cuando las variantes de riesgo genético de EoE en TSLP o IL4 se estudiaban de forma aislada, respectivamente. Como el locus de IL4 se ha asociado, en otros estudios, con un mayor riesgo de desarrollar múltiples enfermedades alérgicas, se especuló que un fenotipo atópico subyacente podría estar magnificando los efectos del TSLP. Asimismo, Azouz *et al* (130) buscaron interacciones entre las variantes de riesgo genético de EoE en TSLP y aquellas cercanas a otros genes relacionados con la atopia, identificando una nueva interacción entre variantes genéticas de TSLP y PLAU. Tener ambas variantes de riesgo resultaba en una probabilidad de 2,7 para EoE, en comparación con 1,6 para las variantes de TSLP en ausencia de variantes de PLAU, y 1,3 para las variantes de PLAU en ausencia de variantes de TSLP.

Sin embargo, es importante señalar que el contexto que puede modificar la fuerza de la asociación probablemente no sea estrictamente genético, ya que es probable que los factores ambientales también sean críticos para la asociación de enfermedades de muchos loci de riesgo genético. El mayor riesgo de desarrollar EoE asociado con algunos loci genéticos podría cambiar en función de factores ambientales específicos. En este sentido,

Jensen *et al.* (104), exploraron si los efectos de las variantes genéticas identificadas por los estudios de GWAs asociadas con EoE estaban condicionadas por factores existentes en una primera etapa de la vida. Si bien el tamaño de la muestra en este estudio fue pequeño, se identificó una interacción entre las variantes en CAPN14 y la lactancia materna; el alelo menor de la variante de riesgo genético CAPN14 aumentó el riesgo de desarrollar EoE (OR=5,4) cuando el niño no había recibido lactancia materna en comparación con un menor riesgo asociado con esa variante cuando el niño había realizado lactancia materna (OR=0,43).

1.4. EoE y enfermedades alérgicas

Aunque no es posible identificar un alérgeno específico en todos los pacientes, en general se piensa que la exposición a alérgenos es una característica central de la patogénesis de la EoE. Los estudios de cohortes de los principales centros de referencia han revelado que los alimentos más comúnmente asociados a EoE son la leche, el huevo, la soja y el trigo, que a su vez, coinciden con los alimentos más comúnmente implicados en la alergia alimentaria mediada por IgE (AA-IgE). Al igual que la AA-IgE, el objetivo principal del tratamiento de la EoE es identificar y evitar el alimento causante, siempre que sea posible (131,132).

Se han establecido asociaciones epidemiológicas significativas entre la EoE y algunas enfermedades alérgicas (133). La dermatitis atópica (DA) (134, 135), la AA-IgE, el asma (134-136), la rinitis alérgica (RA) (134,135,137) y el síndrome polen-alimentos de origen vegetal (138, 139) son comorbilidades comunes en los pacientes con EoE. Los pacientes con DA, AA-IgE, asma o RA

tienen un mayor riesgo de ser diagnosticados de EoE en el futuro (140). Los pacientes con AA-IgE desarrollan EoE casi nueve veces más que la población general (141). Además, la relación de riesgo entre la EoE y la RA parece ser bidireccional, ya que cada afección supone un riesgo para el posterior diagnóstico de la otra (140). Esta última observación es coherente con los datos que sugieren que los síntomas de la EoE pueden ser desencadenados también por alérgenos ambientales específicos (26,142,143).

Un metaanálisis ha demostrado la carga atópica en pacientes con EoE, mostrando probabilidades significativamente mayores de padecer DA (OR 2,85, IC del 95%, 1,87-4,34), asma (OR 3,01, IC del 95% 1,96-4,62) y RA (OR 5,09, IC del 95% 2,91-8,90) en aquellos pacientes con EoE en comparación con los individuos sanos (135). También se llevó a cabo un amplio análisis en el que se evaluó a los niños con y sin EoE en una población de la red de atención primaria pediátrica (144). En este estudio, se observó que las tasas de enfermedades atópicas eran significativamente mayores en los sujetos con EoE en comparación con los niños sanos, e incluían RA (60% de EoE frente a 17% sin EoE; OR 7,1, IC 95% 5,8-8,6), asma (60% de EoE frente a 21% sin EoE; OR 5,2, IC 95% 4,3-6,3) y DA (18% de EoE frente a 7% sin EoE; OR 3,1, IC 95% 2,4-4,0). Por último, en una evaluación multicéntrica de pacientes con EoE del Consorcio para la Investigación de Alergias Alimentarias, se observó una enfermedad alérgica concomitante en el 91% de la población del estudio (145).

Tabla 4. Resumen de la frecuencia (y odds ratio) de las enfermedades alérgicas en pacientes con esofagitis eosinofílica entre 2015-2019.

Nº pacientes	Población	Rinitis alérgica	Asma	Dermatitis atópica	AA-IgE	Autor/Año [Ref]
81	Adultos	62%	27%	6%	43%	Dellon et al. 2015 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/45"]
23	niños	57%	57%	30%	30%	Leung et al. 2015 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/46"]
4.423	Ambos	-	OR: 4.0	OR: 3.0	-	Peterson et al. 2015 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/47"]
4.009	Ambos	-	OR: 3.95	-	-	Duffey et al. 2016 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/48"]
53.542 ^a	Ambos	OR: 5.09	OR: 3.01	OR: 2.85	-	González-Cervera et al. 2017 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/21"]
1.795	Niños	-	-	-	68%	Hill et al. 2017 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/28"]
428	Niños	60% OR 7.1	60% OR: 5.2	18% OR: 3.1	-	Capucilli et al. 2018 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/49"]
705	Ambos	60%	45%	46%	67%, 27% ^b	Cehade et al. 2018 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/50"]
950	Adultos	70%	36%	14%	24%	Leigh et al. 2019 [HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6626558/51"]

^a Datos obtenidos de metaanálisis

^b Datos relacionados con anafilaxia inducida por alimentos

La prevalencia global de enfermedades alérgicas específicas en la EoE se representa en la figura 2.

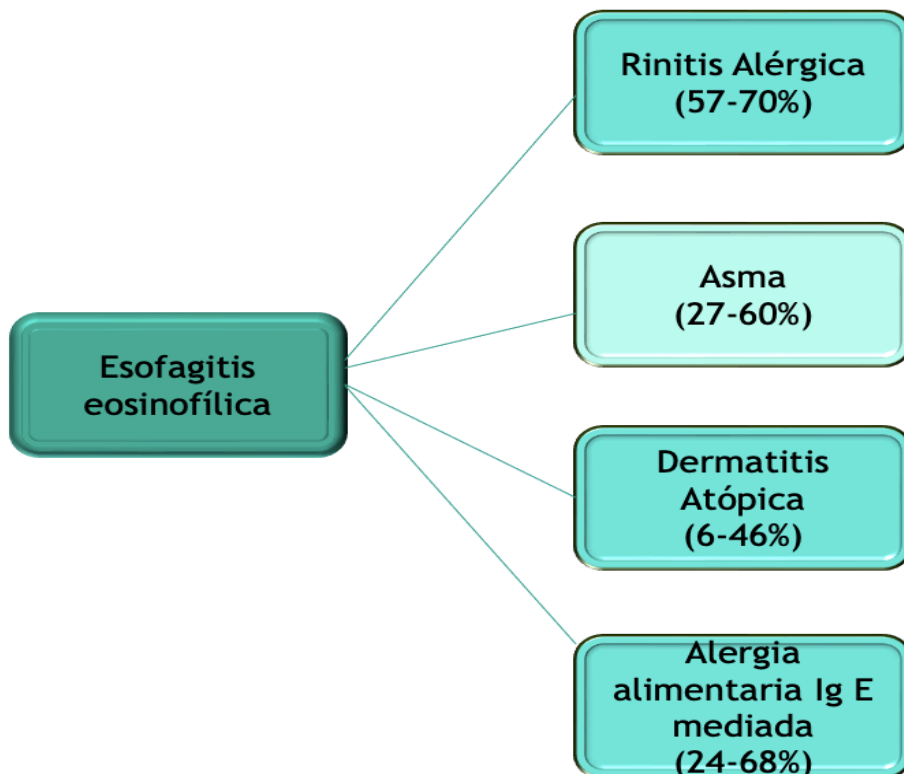


Figura 2. EoE y comorbilidades alérgicas.

Dadas las asociaciones clínicas entre la EoE y las demás manifestaciones alérgicas, la EoE podría considerarse por algunos autores como parte de la marcha alérgica (o atópica) (140,146). La marcha alérgica se refiere a la historia natural de las manifestaciones de la enfermedad alérgica y a la progresión temporal de estas enfermedades a lo largo de la infancia y la vida adulta (147). La edad máxima de diagnóstico de la EoE es de aproximadamente 3 años después de la aparición de la DA, la AA-IgE y el asma (aunque la incidencia real de la EoE puede ser anterior dados los obstáculos conocidos para el diagnóstico) (146). Posteriormente, en un análisis

de más de 130.000 niños de una gran cohorte de atención primaria, se observó que la presencia de DA, AA-IgE, asma y RA se asociaba de forma independiente y acumulativa con el posterior diagnóstico de EoE (140). A pesar de estas observaciones, hay que tener en cuenta que existen diversos grados de presentación de la EoE, y que no siempre se identifica un desencadenante alérgico. Este hecho habla de la complejidad del proceso de esta enfermedad y de la posible existencia de múltiples endotipos de la enfermedad con distintos grados de fisiopatología alérgica (148).

Hipótesis, Objetivos y diseño experimental

Hipótesis de trabajo.

La EoE es una enfermedad inflamatoria crónica que parece deberse a una alteración de la regulación de la respuesta inmune del huésped frente a la microbiota y a otros antígenos intraluminales (especialmente alérgenos alimentarios) en sujetos susceptibles genéticamente, produciéndose alteraciones en la función y regulación del sistema inmune innato y adaptativo, así como una disfunción de la barrera epitelial que daría lugar al proceso inflamatorio y posterior remodelado de este epitelio esofágico.

La hipótesis de este proyecto de investigación es que determinadas variantes de los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG pueden influir en la susceptibilidad a padecer EoE y repercutir en los distintos fenotipos (modos de expresión clínica) de esta enfermedad.

Objetivos:

1. Evaluar la asociación de variantes en los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG con la susceptibilidad a desarrollar EoE en la población española.
2. Evaluar la asociación de las variantes de los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG con las comorbilidades alérgicas asociadas a la EoE.

Diseño experimental

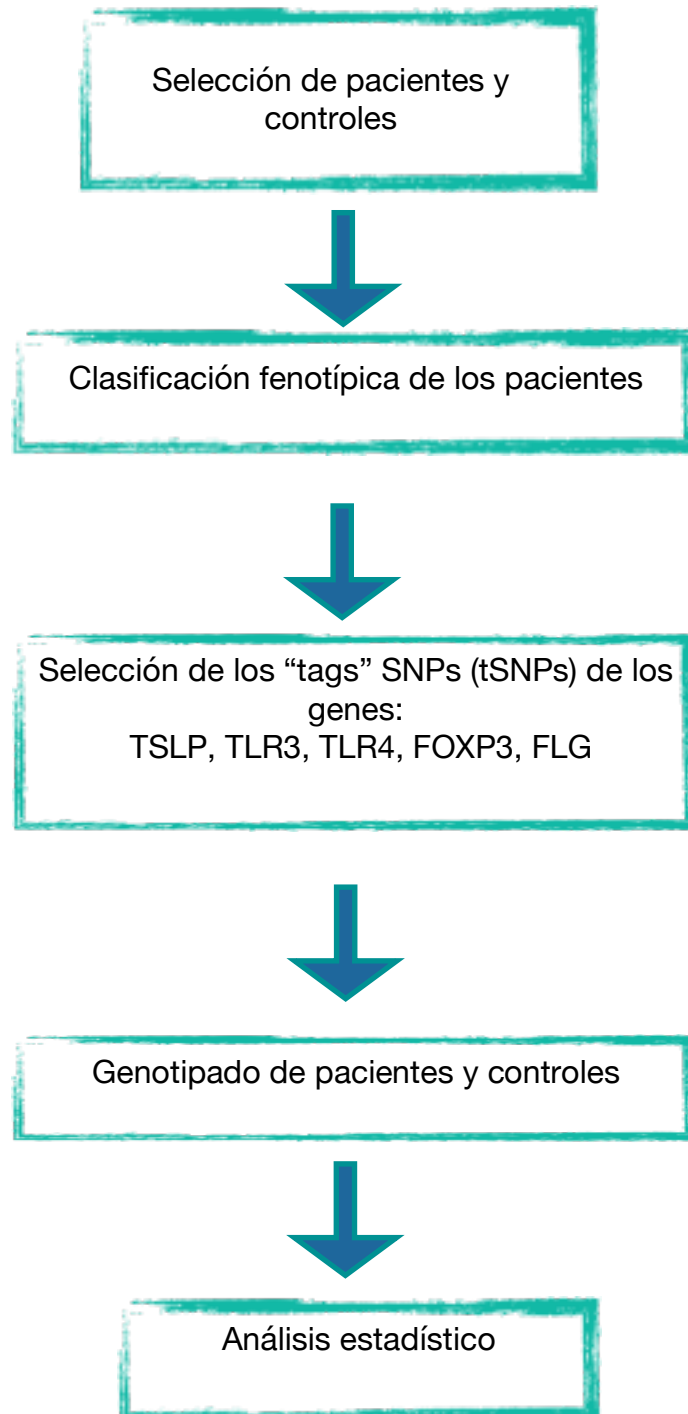
El presente trabajo es un estudio retrospectivo, observacional-analítico, con un diseño de casos y controles. Se incluyeron dos cohortes de pacientes procedentes del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y el Hospital General de Tomelloso (Ciudad Real). En el estudio participaron la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Alergología, UGC de Enfermedades Digestivas y el Servicio de Inmunología (perteneciente a la UGC de Laboratorio) del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla (HUVR) y el Servicio de Enfermedades Digestivas del Hospital General de Tomelloso.

Se seleccionaron cinco genes candidatos en base a su función en la inmunidad innata del huésped y que fueron identificados como relevantes para la fisiopatología de la EoE por trabajos previamente publicados: TLR3, TLR4, FOXP3, FLG y TSLP.

Se realizó un estudio de casos y controles con las siguientes etapas:

1. Selección de pacientes y controles
2. Clasificación fenotípica de los pacientes con EoE.
3. Selección de los “tags” SNPs (tSNPs) de los genes estudiados
4. Genotipado de pacientes y controles
5. Análisis estadístico de asociación

Diagrama de flujo del diseño experimental



Material y Métodos

Material y Métodos

1. Pacientes y controles

Se incluyeron un total de 218 pacientes adultos diagnosticados de EoE, 131 pacientes del área sanitaria del HUVR y 87 del área sanitaria del Hospital General de Tomelloso.

Los criterios clínicos para el diagnóstico de EoE fueron (1,149):

a) Síntomas de disfunción esofágica (disfagia intermitente, impactación alimentaria, dolor torácico, síntomas de reflujo gastroesofágico)

b) Biopsia de mucosa esofágica del tercio proximal y distal con un infiltrado eosinofílico mayor de 15 eosinófilos por campo de alta resolución.

c) Persistencia de infiltrado eosinofílico después de un tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (IBP) a altas dosis al menos durante 8 semanas.

d) Haber descartado otras causas de eosinofilia esofágica.

Se excluyeron pacientes con edad inferior a 18 años o que padecían alguna enfermedad autoinmune (como, por ejemplo: enfermedad celíaca, diabetes mellitus o tiroiditis autoinmune) para evitar el posible factor de confusión de las asociaciones genéticas investigadas (65).

En cuanto al grupo control, se incluyeron a 376 individuos sanos adultos no emparentados (50% hombres) procedentes de donantes voluntarios de médula ósea, con compatibilidad étnica con respecto a los casos, conservados en el Biobanco del Servicio de Inmunología del HUVR.

Consideraciones éticas del estudio

El diseño del estudio fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del HUVR, el 9 de abril de 2012 con el código de registro 2012PI/079 (anexo I). Todos los individuos seleccionados fueron informados del carácter del estudio por el médico responsable y dieron su consentimiento por escrito a la participación en el mismo (anexo II). El protocolo de estudio se ajusta a las pautas de ética de la Declaración de Helsinki de 1975 (150).

Recogida y registro de la información

La recogida de la información se realizó de forma estandarizada utilizando una “hoja de recogida de datos” diseñada específicamente para el estudio. A cada paciente se le asignó, según su centro de procedencia, un código formado por el número del hospital (2 dígitos) seguido de otros 3 dígitos que identificaban al paciente (ej. 01- 001).

Las principales variables recogidas en el estudio fueron las siguientes:

a) Variables demográficas y clínicas. Edad, sexo, fecha de nacimiento, antecedentes patológicos personales e historia detallada sobre la existencia de enfermedad alérgica respiratoria (rinitis y/o asma bronquial) y alergia a alimentos de origen animal o vegetal.

b) Variables relacionadas con los hallazgos del prick-test a aeroalérgenos y trofoalérgenos. Se realizaron pruebas de punción intraepidérmica en la superficie flexora del antebrazo colocando una pequeña cantidad del extracto alérgico (una gota) sobre las que se efectuó una leve punción con una lanceta de punta corta tipo Morrow-Brown. Se utilizó un panel de 17 aeroalérgenos (ácaros del polvo doméstico, epitelios de mamíferos, hongos y pólenes) y 22 alimentos de origen animal y vegetal (leche, huevo, marisco, frutos secos, leguminosas y harinas de cereales) (anexo III). Las pruebas se consideraron positivas si el diámetro de la pápula fue mayor o igual a 3 mm del obtenido con el control negativo. Como control negativo se utilizó suero salino y como control positivo una solución de 10 mg/ml de hidrocloreuro de histamina. La sensibilización a los aeroalérgenos y/o trofoalérgenos se consideró una variable dicotómica y los pacientes con EoE se clasificaron como “fenotipo atópico” o “fenotipo no atópico” según el resultado de la prueba (positividad o negatividad, respectivamente).

c) Variables genéticas (tSNP). Se registró el genotipado de cada uno de los tSNP de los genes estudiados.

2. Métodos

Obtención del ADN de pacientes y controles

Como material de partida, se utilizó sangre periférica obtenida por venopunción y recogida directamente en tubos estériles con EDTA, o ACD como anticoagulante y congelada a -20°C. El ADN fue extraído a partir de células totales con el kit comercial “QIAamp DNA Mini Kit” (Qiagen®) siguiendo

las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ADN se determinó espectrofotométricamente con un NanoDrop2000 (Thermo Scientific, USA). Se consideró aceptable en calidad, las muestras de ADN con ratio de absorbancia 260/280 próximo a 1,8 y la concentración se ajustó a 15 ng/μl. El ADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Selección de los “Tag SNPs”

Utilizamos la base de datos del proyecto HapMap (relase 28, fase II+III, NCBI build 36 assemble, dbSNP b126, <http://www.hapmap.org/index.html.en>) para seleccionar los Tag SNPs (tSNPs) con frecuencia del alelo minoritario (MAF) igual o superior al 0,05 en población CEU, que nos permitieran capturar en cada una de las regiones el 100% de los SNPs con $r^2 > 0,8$. En las siguientes figuras se muestran los SNPs incluidos en el proyecto HapMap y los SNPs con una $MAF \geq 0,05$. El código de colores mostrado en estas figuras es el siguiente: blanco ($r^2 = 0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2 = 1$). Los polimorfismos subrayados son los que se seleccionaron como tSNPs para el estudio de asociación, los otros SNPs están en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,8$) y por tanto pueden excluirse (ver tablas). Los haplotipos se construyeron por combinación de los diferentes tSNPs de cada uno de los genes en los sujetos controles mediante el programa Haploview (versión 4.1), disponible en: www.broad.mit.edu/mpg/haploview/download.php. La asignación de los haplotipos en pacientes y controles se realizó con el programa FamHap disponible en <http://iweb.meb.uni-bonn.de/famhap/>.

Gen TSLP

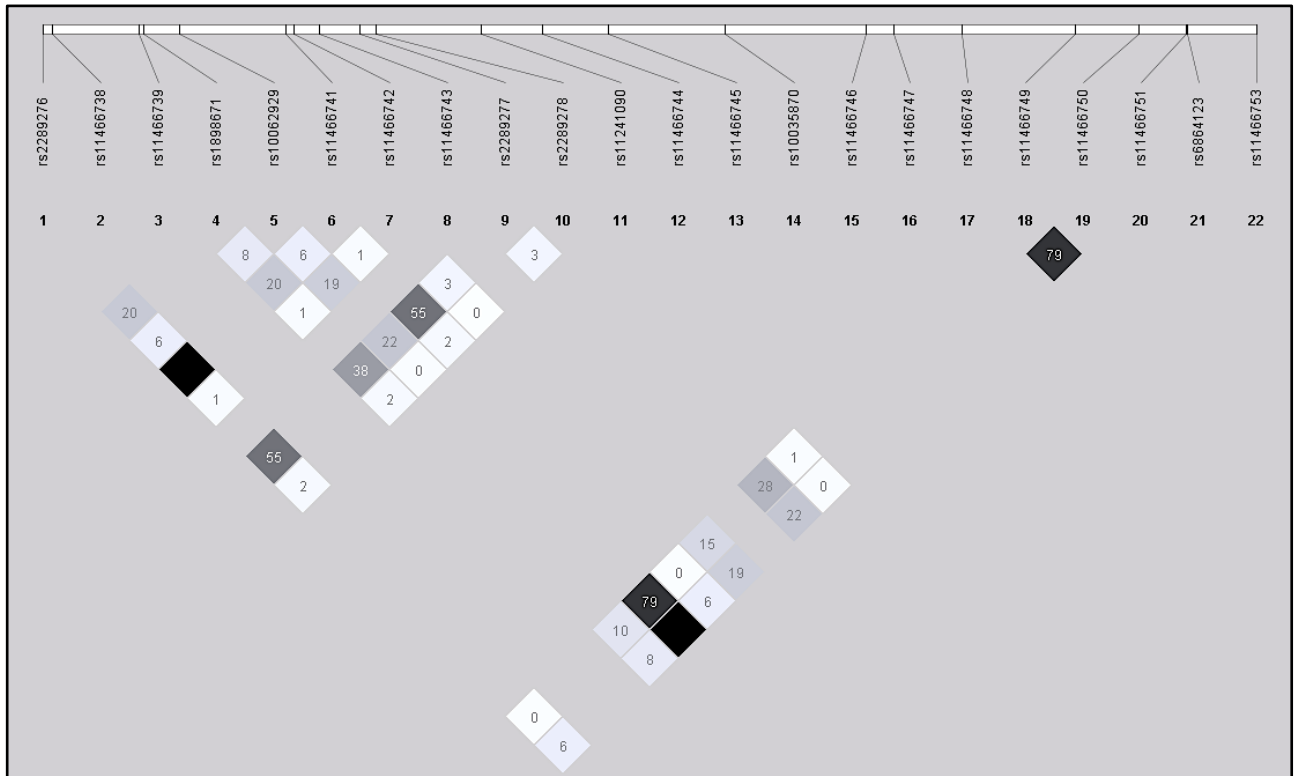


Figura 3. Gen TSLP. En esta figura se muestran todos los SNP incluidos en el proyecto HapMap en la población CEU del gen TSLP. El código de colores es el siguiente: blanco ($r^2=0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2=1$).

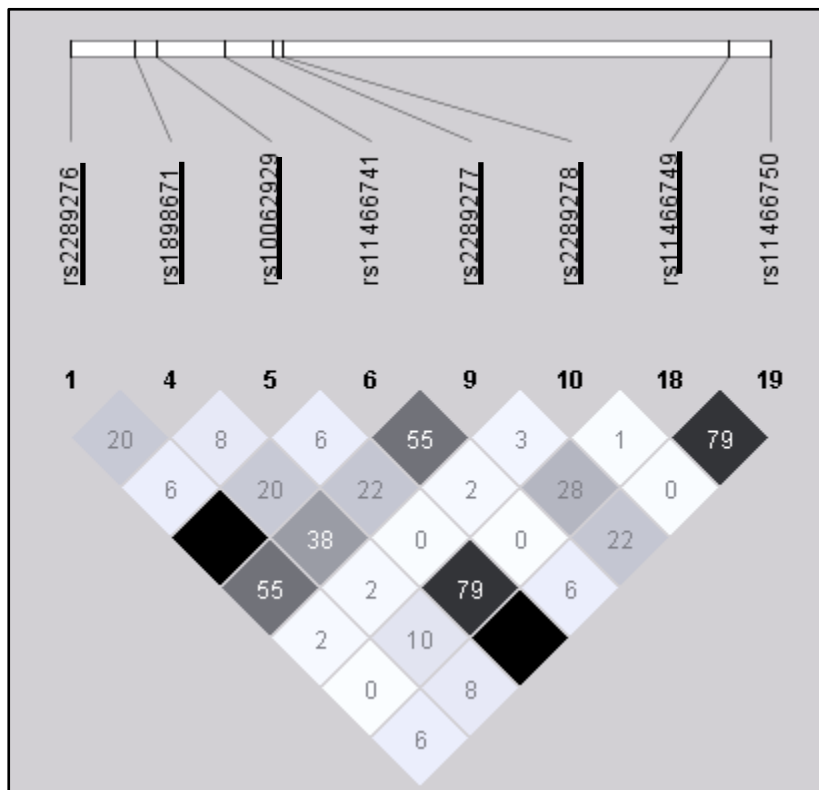


Figura 4: Gen TSLP: En esta figura se muestran los SNPs con una frecuencia del alelo minoritario, MAF $\geq 0,05$ del gen TSLP. Los SNP subrayados son los seleccionados para el estudio.

Tabla 5. SNPs del gen TSLP en desequilibrio de ligamiento con los tSNPs seleccionados.

tSNPs	SNPs con $r^2 = 1$
rs2289276	rs11466741
rs10062929	rs11466750

Gen TLR-3

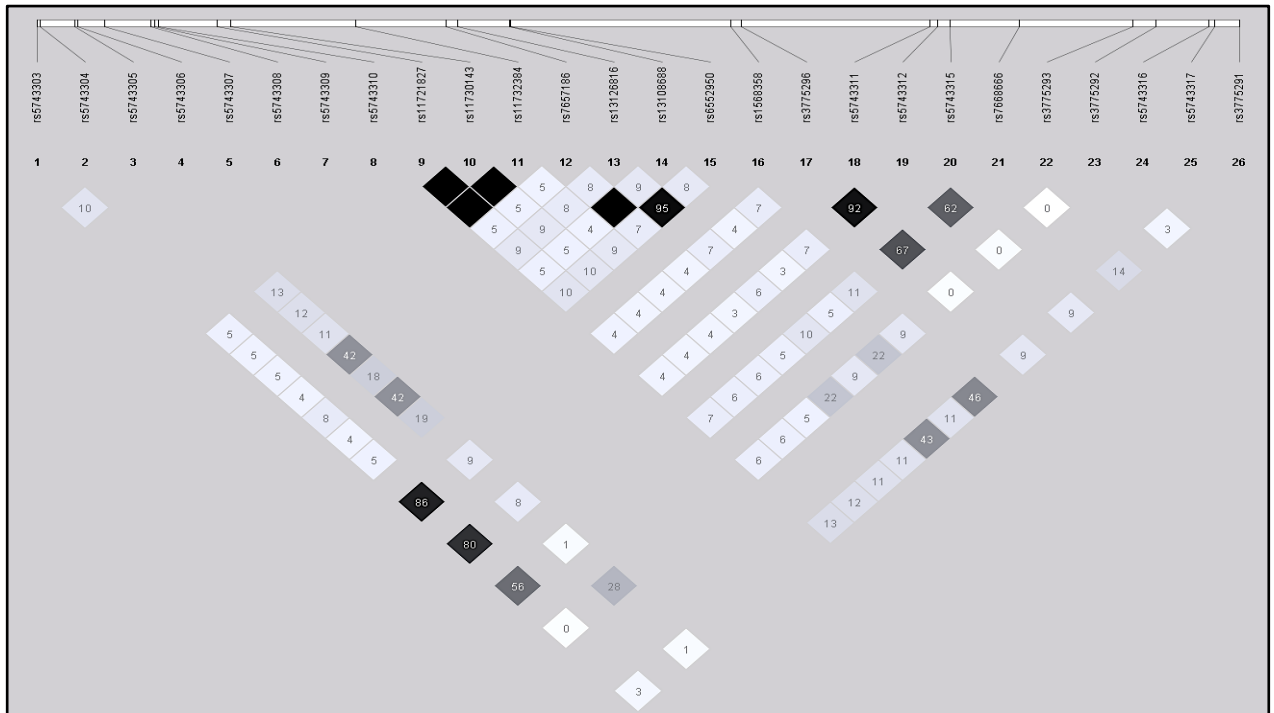


Figura 5. Gen TLR3: SNPs incluidos en el proyecto HapMap en la población CEU. El código de colores es el siguiente: blanco ($r^2=0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2=1$).

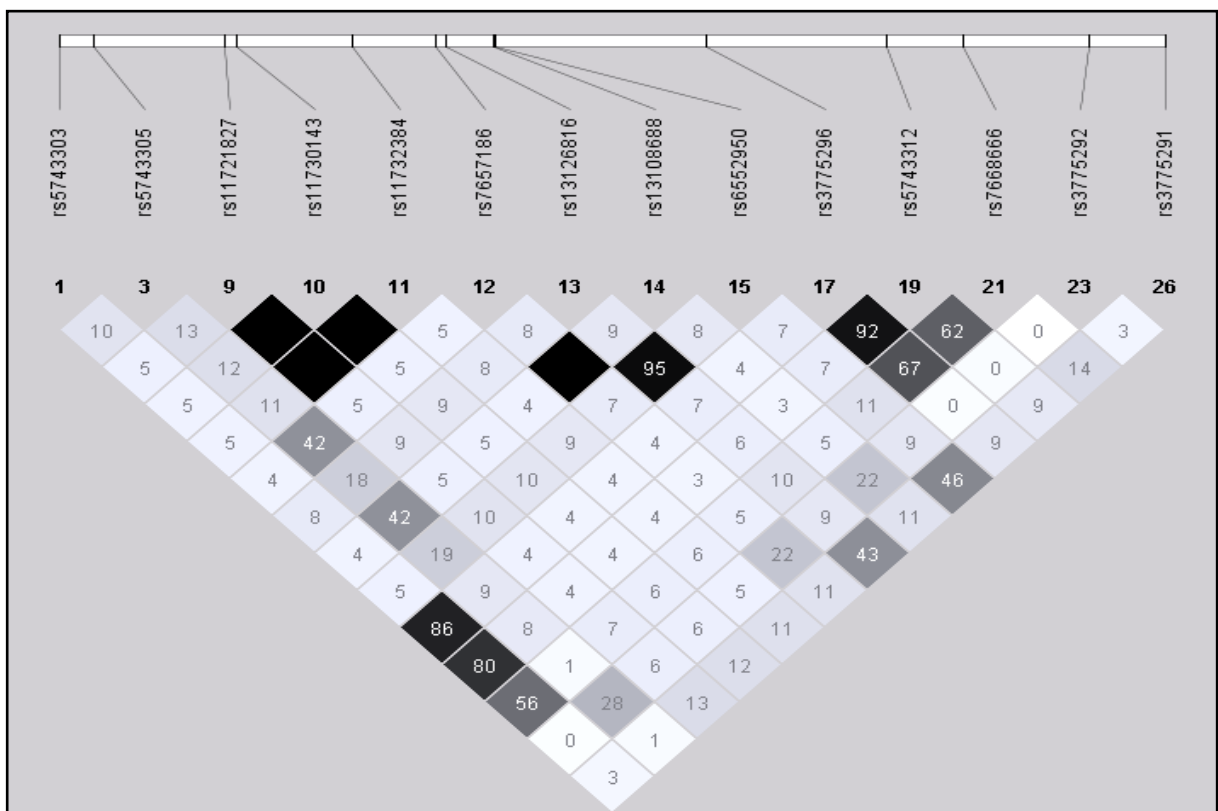


Figura 6. Gen TLR3: SNPs con una frecuencia del alelo minoritario, $MAF \geq 0,05$. Los SNP subrayados son los seleccionados para el estudio.

Tabla 6. SNPs de TLR3 en desequilibrio de ligamiento con los tSNPs seleccionados.

tSNPs	SNPs con $r^2 = 1$
rs5743303	rs5743312, rs3775296
rs11721827	rs11730143, rs11732384
rs7657186	rs13108688
rs13126816	rs6552950

Gen TLR4

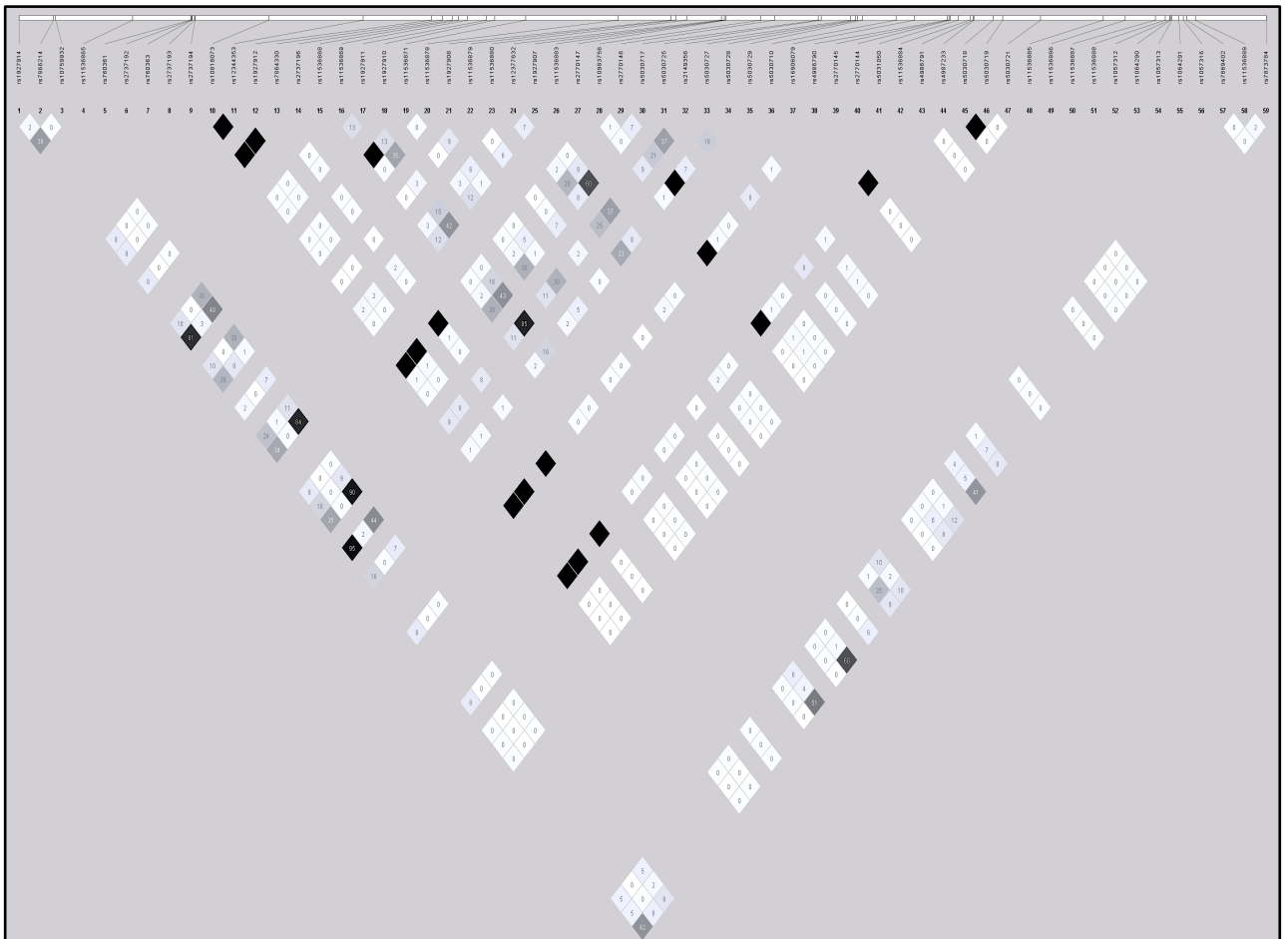


Figura 7. Gen TLR4. SNPs incluidos en el proyecto HapMap en la población CEU. El código de colores es el siguiente: blanco ($r^2=0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2=1$).

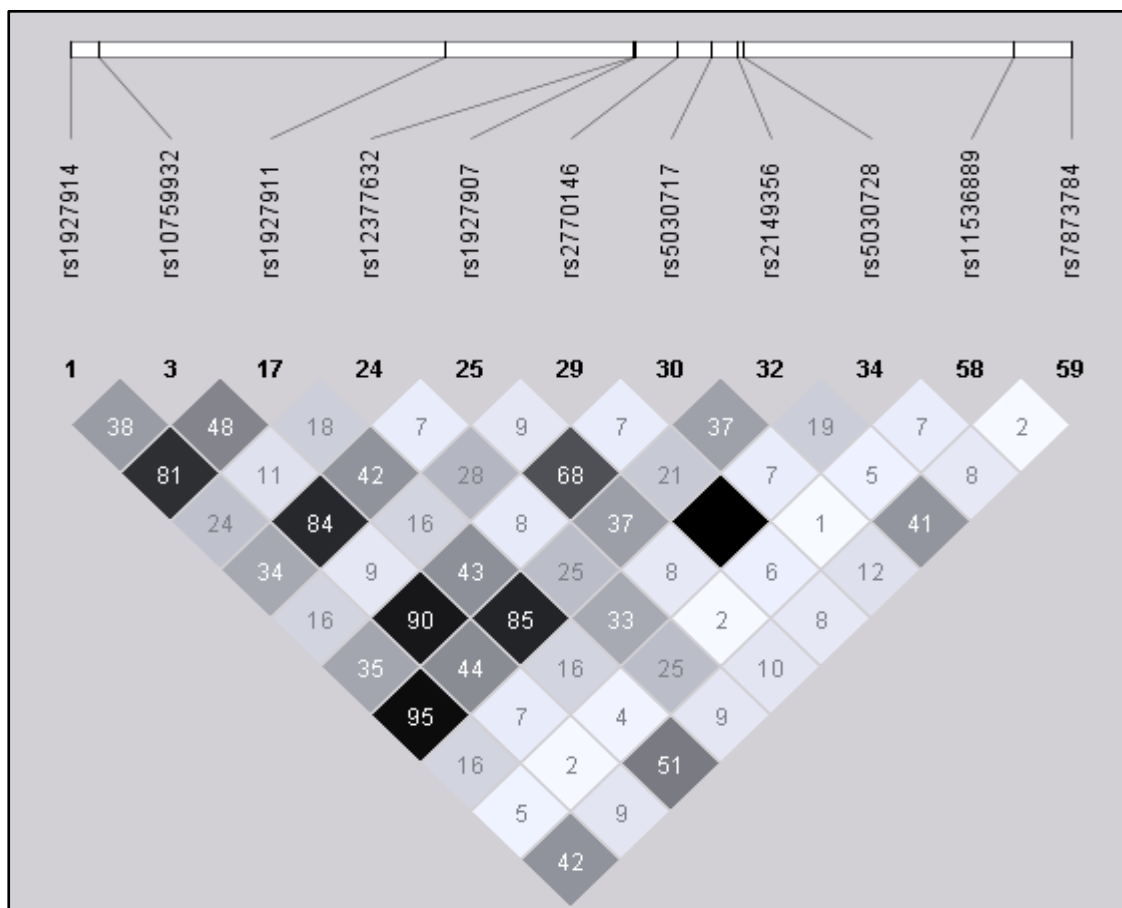


Figura 8. Gen TLR4: SNPs con una frecuencia del alelo minoritario, MAF $\geq 0,05$. Los SNP subrayados son los seleccionados para el estudio.

Tabla 7. SNPs de TLR4 en desequilibrio de ligamiento con los tSNPs seleccionados.

tSNPs	SNPs con $r^2 = 1$
<u>rs1927914</u>	rs2149356, rs1927911
<u>rs10759932</u>	rs1927907, rs5030717
<u>rs5030728</u>	rs2770146

Gen FLG

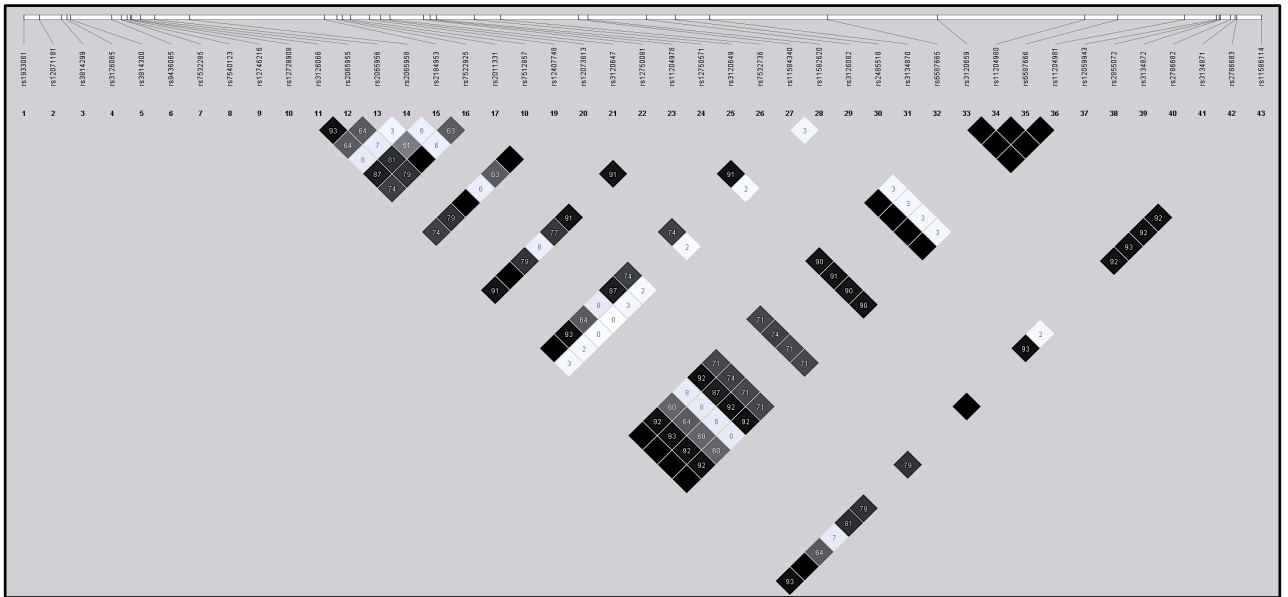


Figura 9. Gen FLG: SNPs incluidos en el proyecto HapMap en la población CEU. El código de colores es el siguiente: blanco ($r^2=0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2=1$).

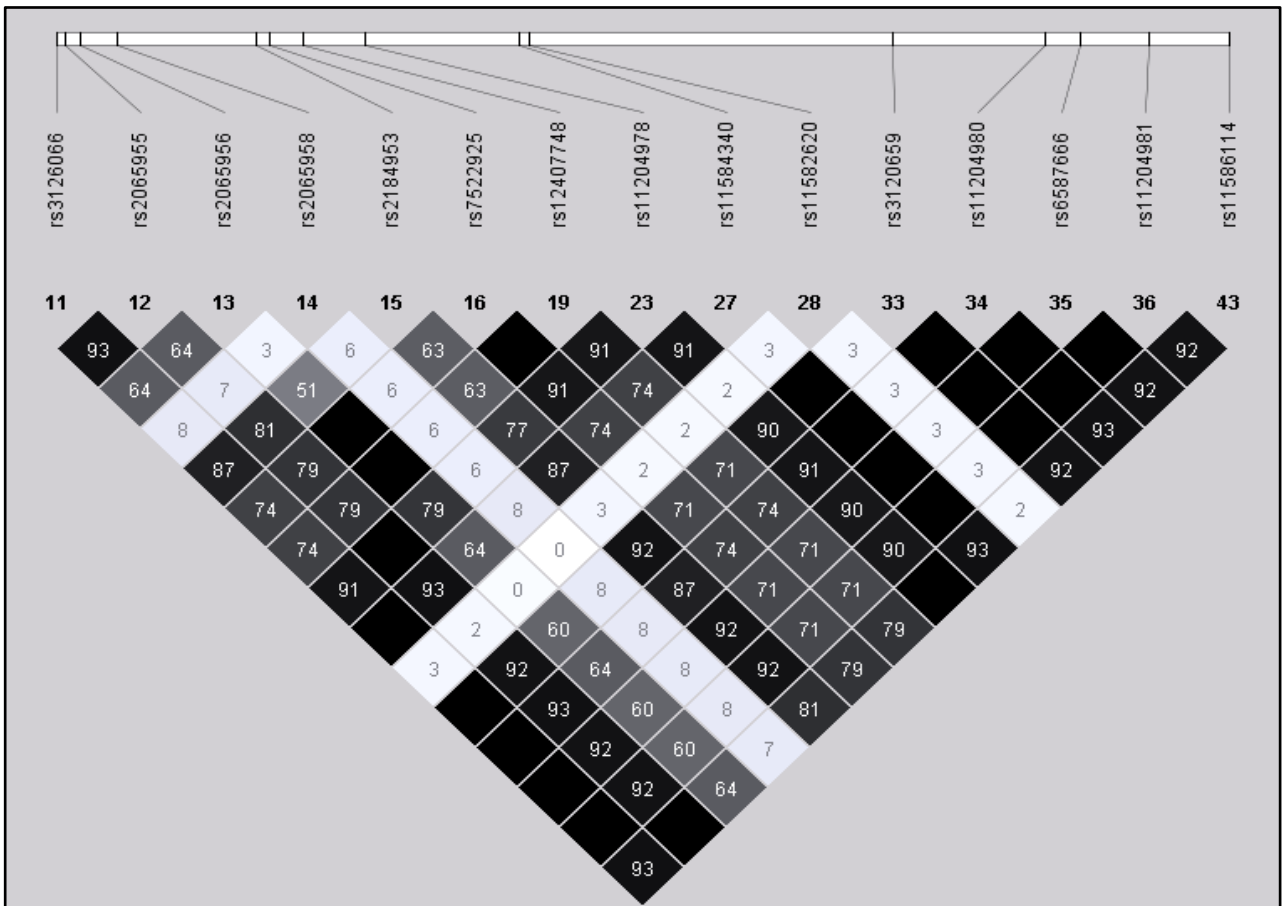


Figura 10. Gen FLG. SNPs con una frecuencia del alelo minoritario, $MAF \geq 0,05$. Los SNP subrayados son los seleccionados para el estudio.

Tabla 8. SNPs en desequilibrio de ligamiento con los tSNPs seleccionados.

tSNPs	SNPs con $r^2 = 1$
rs2065956	rs7522925, rs12407748
rs11204981	rs2184953, rs3126066, rs11584340, rs3120659, rs11204980, rs6587666
rs11586114	rs11204978, rs2065955

Gen FOXP3

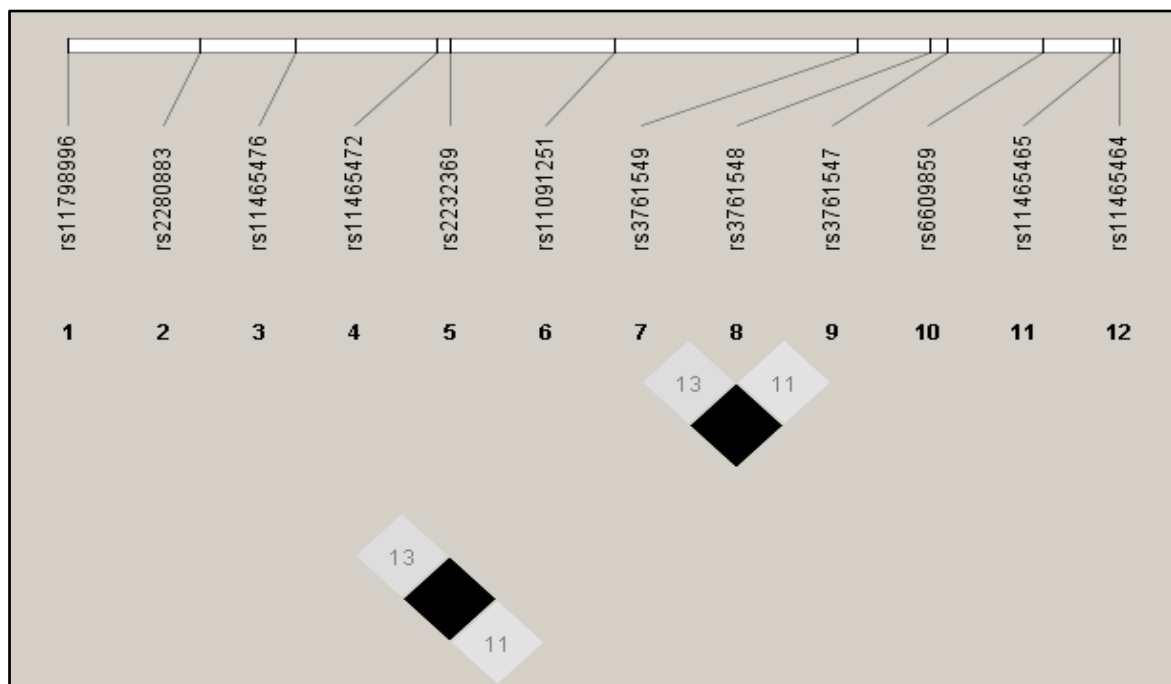


Figura 11. Gen FOXP3. SNP incluidos en el proyecto HapMap en la población CEU. El código de colores es el siguiente: blanco ($r^2=0$), gris ($0 < r^2 < 1$) y negro ($r^2=1$).

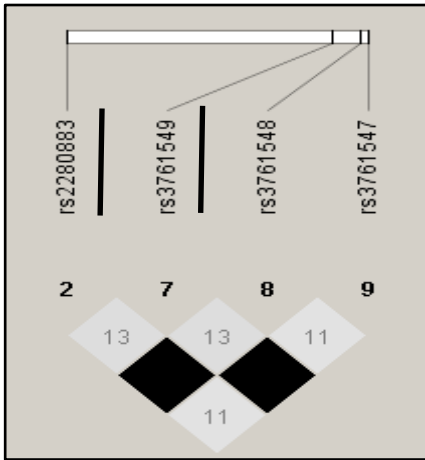


Figura 12. Gen FOXP3: SNP con una frecuencia del alelo minoritario, $MAF \geq 0,05$. Los SNP subrayados son los seleccionados para el estudio.

Tabla 9. SNPs en desequilibrio de ligamiento con los tSNPs seleccionados.

tSNPs	SNPs con $r^2 = 1$
rs2280883	rs3761548
rs3761549	rs3761547

En total se seleccionaron 27 tSNPs que nos permitieron capturar 52 SNPs (Tabla10)

Tabla 10. Tag SNPs incluidos en el estudio. Referencia de los ensayos TaqMan utilizados en cada caso.

Gen	CHR	Ensayo TaqMan AB	tag SNPs	SNPs capturados
TLR3	4	C__27310258_10	rs5743303	rs5743303, rs5743312, rs3775296
		C___393058_10	rs5743305	rs5743305
		C__32209949_20	rs11721827	rs11721827, rs11730143, rs11732384
		C__27310255_20	rs7657186	rs7657186, rs13108688
		C__32209947_10	rs13126816	rs13126816, rs6552950
		C__29419480_10	rs7668666	rs7668666
		C__27482764_10	rs3775292	rs3775292
		C__1731425_10	rs3775291	rs3775291
TLR4	9	C__2704048_10	rs1927914	rs1927914, rs2149356, rs1927911
		C__31783996_10	rs10759932	rs1927907, rs10759932, rs5030717
		C__26954831_10	rs5030728	rs5030728, rs2770146
		Personalizado	rs12377632	rs12377632
		C__31784034_10	rs11536889	rs11536889
		C__29292008_10	rs7873784	rs7873784
FLG	1	C__175680137_10	rs2065956	rs7522925, rs2065956, rs12407748
		Personalizado	rs2065958	rs2065958
		C__1792542_10	rs11582620	rs11582620
		C___1792560_10	rs11204981	rs2184953, rs11204981, rs3126066, rs11584340, rs3120659, rs11204980, rs6587666
		C__1792562_10	rs11586114	rs11586114, rs11204978, rs2065955
TSLP	5	C__3166723_20	rs2289276	rs11466741, rs2289276
		C__11910826_10	rs1898671	rs1898671
		C__30152570_10	rs10062929	rs11466750, rs10062929
		C__15880979_10	rs2289277	rs2289277
		C__15880989_10	rs2289278	rs2289278
		C__31152869_10	rs11466749	rs11466749
FOXP3	X	C__15874601_20	rs2280883	rs3761548, rs2280883
		C__27058744_10	rs3761549	rs3761549, rs3761547

Genotipado de los tSNPs mediante ensayos TaqMan

El genotipado de los tSNPs se realizó utilizando ensayos de discriminación alélica TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystem, Barcelona, España) en un LightCycler 480 (Roche, Barcelona, España). En cada uno de los ensayos se utilizó una pareja de cebadores y dos sondas marcadas con los fluorocromos VIC y FAM complementarias a la región donde se localiza la variación de la secuencia (Figura 13). En la tabla 10 se recoge la información del ensayo empleados de Applied Biosystem. Para los tSNPs rs12377632 y rs2065958 no se disponía de ensayo comercial y fueron diseñado por Applied Biosystems para este trabajo.

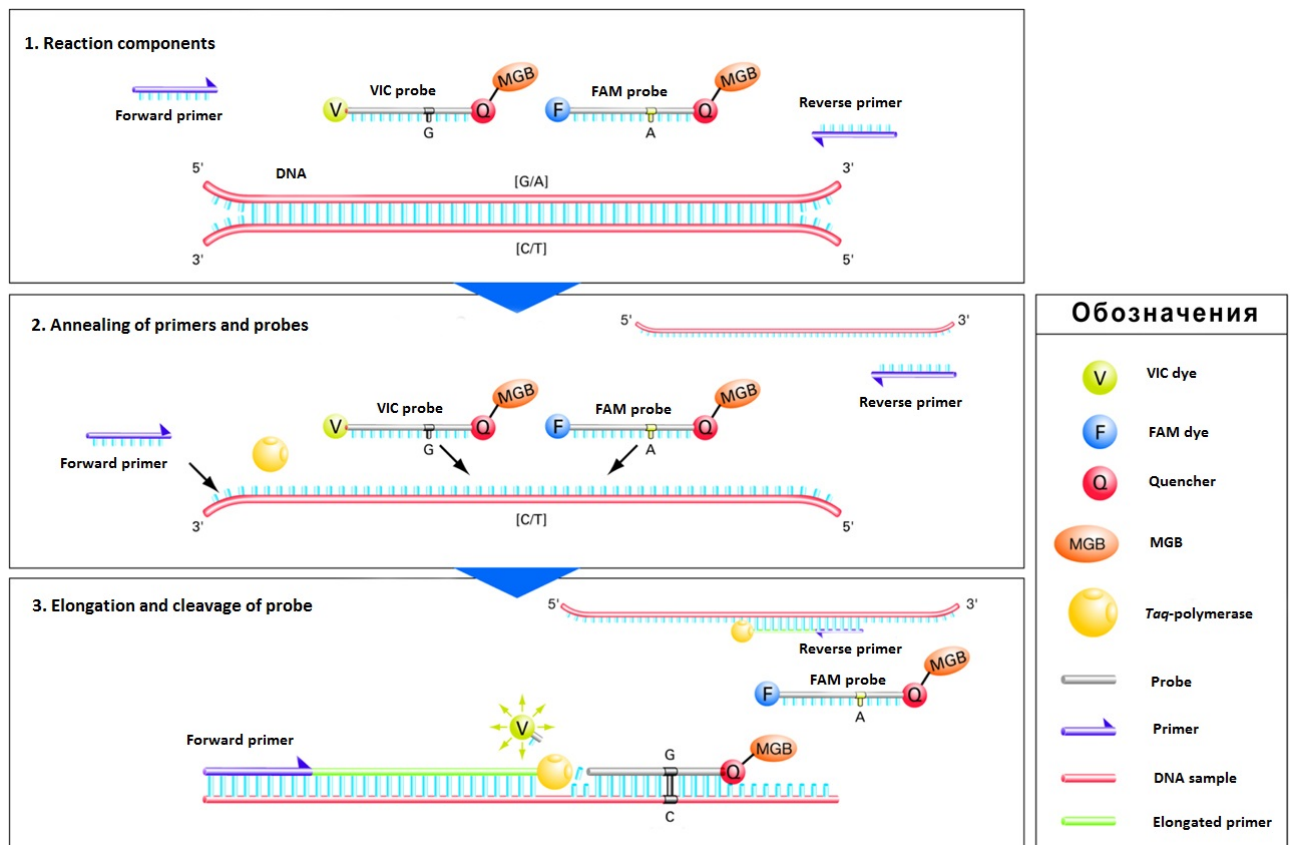


Figura 13. Metodología usada para el genotipado.

Las condiciones y parámetros empleados para la amplificación y discriminación de los alelos fueron las siguientes:

Mezcla de reacción de PCR (Volumen final 5 µl):

0,5 µl de ADN (15 ng/µl)

2,5 µl de TaqMan™ Genotyping Master Mix (Applied Biosystem)

0,125 µl de primers/sondas 40x (ensayos en tabla10)

1,875 µl de agua bidestilada

Parámetros de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Los parámetros generales de amplificación utilizados para todos los tSNPs fueron: 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Después de la amplificación se midió la fluorescencia de VIC y FAM a 60 °C durante 1 minuto. El programa utilizado para la asignación de genotipos fue el “Endpoint Genotyping Analysis” de Roche (Figura 14).

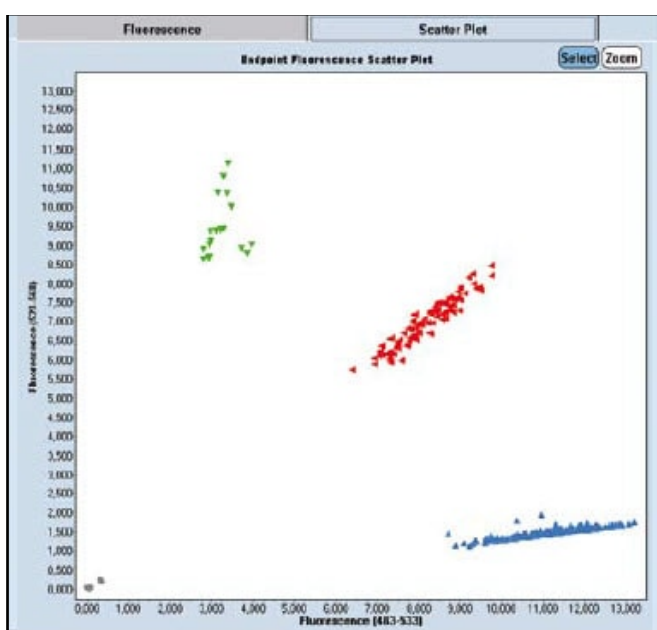





Figura 14. Asignación de genotipos.

-  Muestras homocigotas para el alelo marcado con VIC
-  Muestras homocigotas para el alelo marcado con FAM
-  Muestras heterocigotas

El genotipado de todos los tSNPs incluidos en el estudio se realizó con un éxito del 98% de los pacientes y controles. Se comprobó que la población de estudio se encontraba en Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos analizados ($p > 0,05$). Para verificar la reproducibilidad y precisión inter-experimental el 5% de las muestras se estudiaron por duplicado.

Análisis estadístico

La distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas fueron comparadas mediante el test χ^2 utilizando el programa Haploview y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para que el estudio tuviera más fiabilidad estadística se calculó el valor de $p_{\text{corregido}}$ (p_c), mediante el cálculo de 10.000 permutaciones con el programa Haploview, los valores de $p_c < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los genotipos de cada SNP se evaluaron según modelos dominantes (AA vs. AB+BB; A, alelo mayoritario; B, alelo minoritario) o recesivos (AA+AB vs. BB). Se calcularon los odds ratios (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) y regresión logística utilizando el software OpenEpi v3.01 en línea (<http://www.openepi.com>). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Las interacciones gen-gen se evaluaron utilizando el método de reducción de dimensionalidad multifactorial no paramétrica (MDR) (151,152). Para interpretar los efectos de combinación, se utilizó un análisis basado en la entropía. La entropía de interacciones utiliza la ganancia de información para evaluar si existen interacciones entre dos (o más) variables que se consideraron independientes. La entropía se estima para cada atributo

individual (es decir, efectos principales) y cada combinación de atributos por pares (es decir, efectos de interacción). Por lo tanto, los efectos principales de cada factor se pueden comparar con el efecto de interacción para determinar si las interacciones son aditivas o no aditivas. Existe evidencia de una interacción sinérgica cuando se obtiene un valor positivo combinando dos (o más) variables. A la inversa, hay redundancia o efectos independientes cuando se obtiene un valor negativo por la pérdida de información.

Resultados

Resultados

1.- Características demográficas y fenotipado clínico de los pacientes con EoE.

Se incluyeron 218 pacientes con EoE en el estudio, 170 hombres y 48 mujeres, con una edad media en el momento del diagnóstico de 35,4 años. El 41% padecían como comorbilidad atópica principal una rinoconjuntivitis (RC), el 42% RC y asma bronquial y el 1% de los pacientes asociaban otras comorbilidades (urticaria, dermatitis atópica, etc).

Ciento ochenta y cinco pacientes (84,86 %) eran atópicos. Cincuenta y uno tenían test cutáneos positivos sólo frente a aeroalérgenos y 21 pacientes tenían una sensibilización exclusiva a alimentos de origen animal y/o vegetal. Los 113 pacientes restantes presentaban una sensibilización simultánea a inhalantes y alimentos. Treinta y tres pacientes (15,14 %) fueron no atópicos.

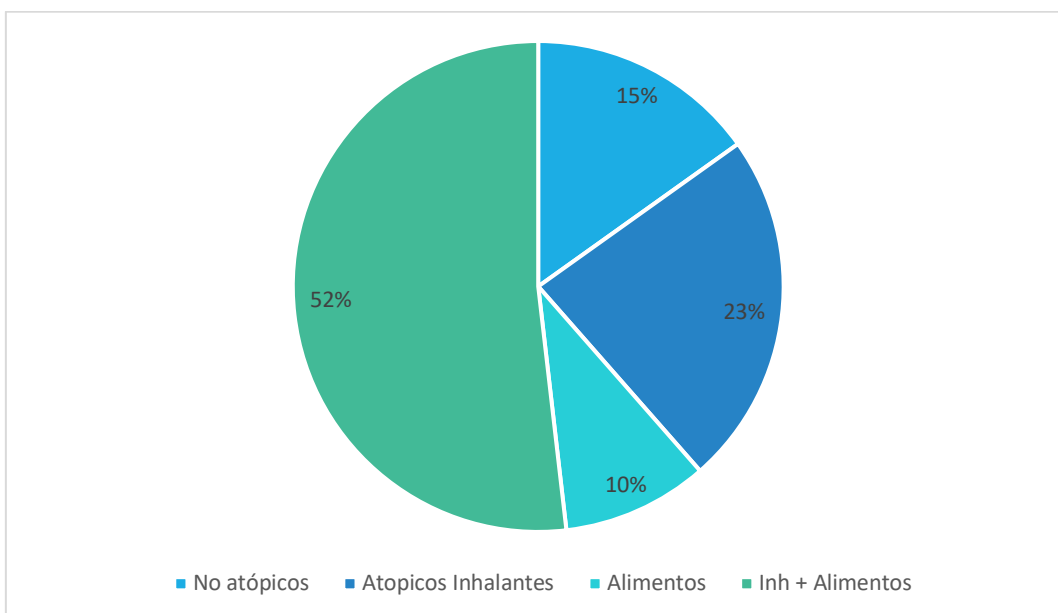


Figura 15. Distribución de los fenotipos clínicos.

2.- Análisis de asociación de las variantes genéticas de los Loci TLR3, TLR4, TSLP, FOXP3, y FLG con EoE.

El genotipado de todos los tSNPs incluidos en el estudio se realizó con un éxito del 98% en pacientes y controles. Las frecuencias genotípicas de todos los tSNPs estudiados estaban en Equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) en la población control, lo que indicaba que el tamaño de muestra era adecuado y no había habido errores en las técnicas de genotipado.

Gen TSLP

En la tabla 11 se muestran las frecuencias en pacientes y controles del alelo minoritario de los tSNPs estudiados en el gen TSLP. Con la excepción del rs2289278, existen diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles ($p_c < 0,05$), destacando rs10062929 y rs2289277 con una $p_c < 0,0001$. La frecuencia de los alelos minoritarios, excepto rs1898671, es mayor en los controles que en los pacientes, por lo que serían factores de protección ($OR < 1$), es decir, los individuos con estos alelos tendrían menos probabilidad de padecer la enfermedad. Por el contrario, el alelo minoritario del rs1898671 sería un factor de riesgo ($OR > 1$).

Tabla 11. Frecuencias de los tSNPs estudiados del gen TSLP en pacientes EoE y controles.

tSNP	MA	Controles	Pacientes	p-valor	p _c -valor	OR (95% IC)
rs2289276	T	0,309	0,233	0,007	0,043	0,68 (0,51-0,90)
rs1898671	T	0,389	0,484	0,002	0,011	1,48 (1,15-1,90)
rs10062929	A	0,123	0,036	6,18x10 ⁻⁶	<1x10 ⁻⁴	0,26 (0,14-0,49)
rs2289277	G	0,431	0,298	1,73x10 ⁻⁵	<1x10 ⁻⁴	0,56 (0,43-0,73)
rs2289278	G	0,046	0,045	ns	ns	
rs11466749	G	0,135	0,071	0,002	0,009	0,49 (0,31-0,77)

MA: Alelo minoritario; p_c: test de 10.000 permutaciones; ns = no significativo p>0,05. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza

Posteriormente se realizó un análisis de haplotipos con todos los tSNPs estudiados utilizando el programa Haploview. Los haplotipos con frecuencia mayor de 0,05 se muestran en la tabla 12. Se puede observar que los haplotipos 1 y 3 son de riesgo (OR>1), mientras que los haplotipos 2 y 4 son de protección (OR<1). También se puede ver que el rs2289277 es el SNP que marca la susceptibilidad para EoE, ya que los haplotipos de riesgo presentan el alelo C, mientras que los haplotipos de protección presentan el alelo G. El resto de SNPs están asociados por disequilibrio de ligamiento, así, en el caso del alelo A del rs10062929 y el alelo G del rs11466749, siempre van asociados al alelo G del rs2289277. Por tanto, el estudio de rs2289277 nos indicaría si un individuo presenta susceptibilidad para EoE.

Tabla 12. Frecuencias de los haplotipos en pacientes EoE y controles sanos construidos con la combinación de todos los SNPs estudiados con frecuencia >0,05. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza

Haplotipos							Controles	Pacientes	p-valor	OR (IC 95%)
	r	r	r	r	r	r				
	s	s	s	s	s	s				
	2	1	1	2	2	1				
	2	8	0	2	2	1				
	8	9	0	8	8	4				
	9	8	6	9	9	6				
	2	6	2	2	2	6				
	7	7	9	7	7	7				
	6	1	2	7	8	4				
			9			9				
1	C	T	C	C	C	A	0,39	0,48	0,0028	1,47 (1,14-1,89)
2	T	C	C	G	C	A	0,29	0,22	0,0113	0,69 (0,51-0,92)
3	C	C	C	C	C	A	0,13	0,17	0,0386	1,45 (1,03-2,05)
4	C	C	A	G	C	G	0,12	0,06	0,0034	0,50 (0,31-0,81)

Seguidamente, estudiamos el modelo de herencia de los dos SNP con $p_c < 0,000$, rs10062929 y rs2289277, y para ello calculamos las frecuencias genotípicas (tabla 13). El rs10062929 sigue un modelo de herencia dominante, basta con tener un único alelo A para actuar como factor de protección. Por el contrario, el rs2289277 sigue un modelo de herencia recesivo, sólo los individuos homocigotos para el alelo G tienen factor de protección. Relacionando estos resultados con los de los haplotipos, podríamos concluir que aquellos individuos que tengan una copia del haplotipo 4 tendrían menor

riesgo de padecer la enfermedad, mientras que con respecto al haplotipo 2, sería necesario ser homocigotos para tener menor riesgo.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas de los rs10062929 y rs2289277 en pacientes EoE y controles.

SNP	Genotipos	Controles	Pacientes	p-valor	OR (IC 95%)
rs10062929	CC	0,771	0,934		
	CA+AA	0,229	0,066	4,24x10 ⁻⁶	0,23 (0,11-0,46)
rs2289277	CC+CG	0,807	0,940		
	GG	0,193	0,060	3,27x10 ⁻⁵	0,26 (0,13-0,51)

Gen TLR3

En la tabla 14 se muestran las frecuencias del alelo minoritario de los tSNPs estudiados en el gen TLR3. Existen diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles ($p < 0,05$), en los polimorfismos rs5743305 y rs3775292, pero después de calcular la p_c , únicamente el rs3775292 seguía asociado estadísticamente ($p_c < 0,05$). La frecuencia de los alelos minoritarios en ambos era mayor en los controles que en los pacientes, por lo que serían factores de protección ($OR < 1$), es decir, los individuos con estos alelos tendrían menos probabilidad de padecer la enfermedad.

Tabla 14. Frecuencias de los SNPs estudiados del gen TLR3 en pacientes EoE y controles.

tSNP	MA	Controls	Patients	p	p _c	OR (95% CI)
rs5743303	T	0.192	0.210	0.5072	ns	
rs5743305	A	0.415	0.344	0.0172	0.0584	
rs11721827	C	0.082	0.077	0.7728	ns	
rs7657186	A	0.251	0.194	0.0247	ns	
rs13126816	A	0.246	0.305	0.0298	ns	
rs7668666	A	0.276	0.273	0.9166	ns	
rs3775292	C	0.271	0.196	0.0039	0.0288	0.65 (0.49-0.87)
rs3775291	T	0.309	0.334	0.3732	ns	

MA: Alelo minoritario; p_c: test de 10.000 permutaciones; ns = no significativo p>0,05
OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza

Posteriormente se realizó el análisis de haplotipos y en la tabla 15 se muestran los haplotipos con frecuencia mayor de 0,05. Se puede observar que el haplotipo 2 es el único asociado estadísticamente con la enfermedad, y dado que la OR obtenida es <1 (OR=0,64 IC 95% = 0,45-0,89) sería un factor de protección de la enfermedad. Este haplotipo es el único portador del alelo C del rs3775292, que confirmaría la asociación de éste tSNP con la enfermedad.

Tabla 15. Frecuencias de los haplotipos en pacientes EoE y controles sanos construidos con la combinación de todos los SNPs estudiados.

Haplotipos									Controles	Pacientes	p-valor	OR (IC 95%)
	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs	rs				
	574	57	11	765	13	766	377	377				
	330	433	72	718	126	866	529	529				
	3	05	18	6	816	6	2	1				
			27									
1	A	T	A	G	A	C	G	T	0,194	0,211		
2	A	A	A	A	G	C	C	C	0,183	0,126	0,0095	0,64 (0,45-0,89)
3	T	T	A	G	G	A	G	C	0,147	0,154		
4	A	T	C	G	G	C	G	C	0,072	0,076		
5	A	A	A	G	G	C	G	T	0,075	0,069		
6	A	A	A	G	G	A	G	C	0,057	0,057		
7	A	A	A	A	G	C	G	C	0,052	0,048		

Estudiamos el modelo de herencia del rs3775292 y para ello calculamos las frecuencias genotípicas (tabla 16). El rs3775292 sigue un modelo de herencia dominante, basta con tener un único alelo C para actuar como factor de protección. Relacionando estos resultados con los de los haplotipos, podríamos concluir que aquellos individuos que sean heterocigotos para el haplotipo 2 tendrían menor riesgo de padecer la enfermedad.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas de los rs3775292 en pacientes EoE y controles.

SNP	Genotipos	Controles	Pacientes	p-valor	OR (IC 95%)
rs3775292	GG	0,529	0,648		
	CG+CC	0,471	0,352	0,0023	0,609 (0,432-0,859)

Gen TLR4

En la tabla 17 se muestran las frecuencias del alelo minoritario de los tSNPs estudiados en el gen TLR4. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en la distribución de las frecuencias de alelos para ninguno de los tSNPs.

Tabla 17 Frecuencias de los SNPs estudiados del gen TLR4 en pacientes EoE y controles.

SNP	MA	Controls	Patients	p	p _c	OR (95% CI)
rs1927914	G	0,314	0,331	0,5716		
rs10759932	C	0,120	0,122	0,9323		
rs5030728	A	0,269	0,259	0,7167		
rs12377632	C	0,372	0,356	0,7197		
rs11536889	C	0,144	0,140	0,8567		
rs7873784	C	0,145	0,136	0,6823		

MA: Alelo minoritario; p_c: test de 10.000 permutaciones; ns = no significativo p>0,05. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza

Gen FLG

En la tabla 18 se muestran las frecuencias del alelo minoritario de los tSNPs estudiados en el gen FLG. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas, en la distribución de las frecuencias de alelos para ninguno de los tSNPs.

Tabla 18. Frecuencias de los SNPs estudiados del gen FLG en pacientes EoE y controles.

SNP	MA	Controls	Patients	p	p _c	OR (95% CI)
rs2065956	T	0,185	0,192	0,822		
rs2065958	C	0,202	0,189	0,111		
rs11582620	G	0,111	0,109	0,9170		
rs11204981	A	0,172	0,154	0,3188		
rs11586114	A	0,120	0,155	0,1148		

MA: Alelo minoritario; p_c: test de 10.000 permutaciones; ns = no significativo p>0,05

Gen FOXP3

En la tabla 19 se muestran las frecuencias del alelo minoritario de los tSNPs estudiados en el gen FOXP3. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias de alelos para ninguno de los tSNPs estudiados.

Tabla 19. Frecuencias de los SNPs estudiados del gen FOXP3 en pacientes EoE y controles.

SNP	MA	Controls	Patients	p	p _c	OR (95% CI)
rs2280883	T	0,497	0,517	0,6084		
rs3761549		0,105	0,086	0,9323		

MA: Alelo minoritario; p_c: test de 10.000 permutaciones; ns = no significativo p>0,05

En resumen, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélica y haplotípicas de los tSNPs estudiados en los genes de TLR4, FLG y FOXP3. Sin embargo, si había diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas y haplotípicas en 5 tSNPs localizados en el gen TSLP (rs2289276, rs1898671, rs10062929, rs2289277 y rs11466749) y un tSNP localizado en el gen TLR3 (rs3775292).

3.- Análisis de asociación de las variantes genéticas de los loci TLSP y TLR3 con EoE estratificado por género.

Debido a que la prevalencia de la EoE es mayor en hombres que en mujeres, con una proporción 3:1, para descartar un posible sesgo atribuible al género de los individuos en los estudios de asociación de los genes TSLP y TLR3, se realizó un análisis estratificado por género en los pacientes con EoE y en los controles (tabla 20).

Con respecto al TSLP, en el grupo de hombres, las diferencias significativas se mantienen sin cambios entre los pacientes y los controles, y sólo el polimorfismo rs2289276 no se asocia después de la corrección de p ($p = 0,013$ y $p_c = 0,065$). Con respecto a TLR3, el polimorfismo rs3775292, sigue estando asociado a la enfermedad en el grupo de hombres.

En el grupo de mujeres, no se encuentran diferencias significativas en la distribución de alelos, únicamente el polimorfismo rs10062929 del gen TSLP está asociado antes de la corrección de p ($p=0,016$, $p_c=0,08$). No obstante, la tendencia en la distribución de las frecuencias alélicas de los tSNP de los genes TSLP y TLR3 en el grupo de mujeres es similar a la observada en el grupo masculino, sin embargo, debido al pequeño número de mujeres con enfermedad incluidas en el estudio, el análisis no tenía poder estadístico para demostrar la asociación estadística entre estos genes y la EoE.

Tabla 20. Distribución de las frecuencias alélicas de los SNP estudiados en los genes TSLP y TLR3 después de la estratificación por género.

Gen SNP	A M	Hombres		p	p _c	OR (95% CI)	Mujeres		p	p _c	OR (95 %CI)
		Controles (n=174)	Pacientes (n=170)				Controles (n=191)	Pacientes (n=48)			
TSLP											
rs2289276	T	0.318	0.229	0.01	0.065		0.299	0.244	0.3079	ns	
				3	4						
rs1898671	T	0.366	0.493	0.00	0.006	1.68 (1.22- 2.31)	0.397	0.453	0.3395	ns	
				13	3						
rs10062929	A	0.132	0.038	7.66	0.000	0.26 (0.12- 0.53)	0.113	0.027	0.0167	0.08	0.20 (0.04 - 0.85)
				E- 05	3					07	
rs2289277	G	0.443	0.287	6.13	0.000	0.26 (0.12- 0.53)	0.425	0.333	0.1219	ns	
				E- 05	3						
rs2289278	G	0.042	0.054	0.46	ns		0.053	0.013	0.1287	ns	
				25							
rs11466749	G	0.145	0.065	0.00	0.008	0.26 (0.12- 0.53)	0.128	0.090	0.3429	ns	
				1	4						

SNP: single-nucleotide polymorphism; MA: alelo minoritario; OR(95%CI): odds ratio con 95% de intervalo de confianza; ns: no significativo p>0.05. p_c: test de 10.000 permutaciones, p corregida.

Tabla 20. Distribución de las frecuencias alélicas de los SNP estudiados en los genes TSLP y TLR3 después de la estratificación por género (continuación).

Gen SNP	A M	Hombres		p	p _c	OR (95% CI)	Mujeres		p	p _c	OR (95 %CI)
		Controles (n=174)	Pacientes (n=170)				Controles (n=191)	Pacientes (n=48)			
TLR3											
rs5743303	T	0.200	0.216	0.63	ns		0.175	0.188	0.7914	ns	
				72							
rs5743305	A	0.426	0.348	0.03	ns		0.410	0.330	0.1562	ns	
				53							
rs11721827	C	0.066	0.078	0.51	ns		0.084	0.073	0.5176	ns	
				52							
rs7657186	A	0.253	0.189	0.04	ns		0.250	0.208	0.3951	ns	
				5							
rs13126816	A	0.233	0.291	0.09	ns		0.264	0.356	0.0870	ns	
				0							
rs7668666	A	0.280	0.288	0.82	ns		0.263	0.219	0.3700	ns	
				0							
rs3775292	C	0.284	0.190	0.00	0.028	0.59	0.258	0.218	0.4277	ns	
				3	2	(0.41- 0.84)					
rs3775291	T	0.286	0.323	0.28	ns		0.333	0.375	0.4429	ns	
				9							

SNP: single-nucleotide polymorphism; MA: alelo minoritario; OR (95% CI): odds ratio con 95% de intervalo de confianza; ns: no significativo p>0.05. p_c: test de 10.000 permutaciones, p corregida.

4.- Estudio de interacción entre los genes de TSLP y TLR3

Para descartar si la asociación de los genes TSLP y TLR3 con la susceptibilidad a la EoE detectada en el análisis individual de cada gen, fuese debido a un posible sesgo atribuible al genotipo del otro gen, y estimar la fuerza de asociación de cada gen de una manera independiente, es decir eliminando la posibilidad de que un gen confunda el efecto del otro, se realizó una prueba de regresión logística entre los dos polimorfismos con la mayor significación estadística (rs10062929 del TSLP y rs3775292 del TLR3). En ambos polimorfismos, como hemos comentado con anterioridad, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y los controles en un modelo dominante (tablas 13 y 16 respectivamente). Por lo tanto, los pacientes y los controles portadores del alelo C (CG o CC) en rs3775292 se clasificaron como TLR3+. Del mismo modo, los individuos portadores del alelo A (AA o AC) en rs10062929 se clasificaron como TSLP+. Los individuos con 0 copias de ambos alelos SNPs (TLR3-/TSLP-) se utilizaron como grupo de referencia. En el estudio de regresión logística se observa una susceptibilidad menor a EoE estadísticamente significativa en individuos portadores de genotipo TLR3+/TSLP- y TLR3-/TSLP+ en comparación con individuos portadores del genotipo TLR3-/TSLP- con OR=0,66 (p=0,036) y 0,23 (p=0,00014), respectivamente. Además, la susceptibilidad a la EoE se reduce sustancialmente entre individuos que portaban TLR3+ / TSLP+ con un OR= 0,16 (p=0,0001) (Tabla 21). Estos resultados demuestran una asociación individual de cada gen la enfermedad.

Para complementar los análisis de regresión logística, se utilizó el programa MDR para evaluar las interacciones gen-gen y analizar si la

interacción observada entre ambos genes, tenía un efecto epistático al encontrarse en la misma ruta biológica. En el análisis encontramos un valor de ganancia de interacción negativa (IG=-4.52%) (Tabla 22). Este valor negativo ocurrió porque el porcentaje de entropía eliminada por la interacción de TLR3 y TSLP fue 3.36% menos que la suma del porcentaje de entropía eliminada por cada gen (0.78% y 7.09%, respectivamente). Este resultado sugiere que la interacción de ambos genes tenía redundancia, es decir, que ambos genes se asociaban independientes con la EoE.

Tabla 21 Frecuencias de combinaciones de rs3775292 (TLR3) y rs10062929 (TSLP) en pacientes con EoE y controles

	TLR3- / TSLP-	TLR3+ / TSLP-	TLR3- / TSLP+	TLR3+ / TSLP+
Pacientes (n=218)	127 (58.25%)	77 (35.33%)	9 (4.13%)	5 (2.29%)
Controles (n=360)	145 (40.27%)	132 (36.65%)	46 (12.77%)	37 (10.27%)
OR (95% CI)	1	0.66 (0.44-0.96)	0.23 (0.10-0.53)	0.16 (0.05-0.47)
p	<0.0001	0.036	0.00014	0.00010

OR, 95% IC y valor de p fueron calculados usando un test de regresión logística

Tabla 22. La ganancia de información estimada para cada locus individual y la combinación de ambos loci.

Attributes	Information gain by each locus						Information gain by combination of both loci			Interaction gain
	H(A)	H(A C)	H(B)	H(B C)	I(A;C)	I(B;C)	H(AB)	H(AB C)	I(AB;C)	IG(A;B;C)
TLR3	1.2493	1.2414			0.0078 (0.78%)					
TSLP			0.9629	0.892		0.0709 (7.09%)				
TLR3 / TSLP							0.9987	0.9651	0.0336 (3.36%)	-0.0452 (-4.52%)

H(A), H(B), H(AB): Entropy attributed to TLR3 and TSLP individually and the combination of both loci

H(A|C), H(B|C), H(AB|C): Conditional entropy attributed to TLR3 and TSLP individually and the combination of both loci

$I(A;C)=H(A)-H(A|C)$: Information gain (percentage of entropy removed) by TLR3 attribute (main effect)

$I(B;C)=H(B)-H(B|C)$: Information gain (percentage of entropy removed) by TSLP attribute (main effect)

$I(AB;C)=H(AB)-H(AB|C)$: Information gain (percentage of entropy removed) by the combination of both attributes (interaction effect)

$IG(A;B;C)=I(A;C)+I(B;C)-I(AB;C)$: Interaction gain by the combination of both attributes

5.- Estudio de asociación entre los genes TSLP y TLR3 y el fenotipo

atópico

Finalmente, se investigaron las posibles asociaciones entre los genes TSLP y TLR3 y el fenotipo alérgico de los pacientes con EoE. En la tabla 24 se muestran las frecuencias alélicas de los tSNPs. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre TSLP y la sensibilización a los alérgenos alimentarios o inhalantes. Sin embargo, se encontró que 2 tSNP en el gen

TRL3, rs11721827 y rs5743303, estaban asociados a sensibilización a los aeroalergenos y los alimentos, respectivamente. La frecuencia del alelo rs11721827C fue significativamente mayor entre los pacientes con EoE sensibilizados a aeroalergenos (9,4% vs. 1,1% en pacientes no sensibilizados, $p_c=0,025$, OR=9,67). En contraste, la frecuencia del alelo rs5743303T fue más baja entre los pacientes con EoE que estaban sensibilizados a los alimentos (17,5 vs. 28,5%; $p_c=0,048$; OR=0,53) (Tabla 23).

Tabla 23. Frecuencias alélicas menores de los SNP estudiados en el gen TLR3 en pacientes con EoE

TLR3 SNP	AM	Aeroalergenos		p	p _c	OR (95%CI)	Alergia alimentaria		p	p _c	OR (95%CI)
		Negativo (n=54)	Positivo (n=164)				Negativo (n=84)	Positivo (n=134)			
rs5743303	T	0.255	0.199	0.2521	ns		0.285	0.175	0.014	0.048	0.53 (0.32-0.88)
rs5743305	A	0.362	0.351	0.8575	ns		0.331	0.367	0.4906	ns	
rs11721827	C	0.011	0.094	0.0071	0.0255	9.67 (1.29-72.28)	0.038	0.092	0.0603	ns	
rs7657186	A	0.196	0.204	0.8569	ns		0.190	0.208	0.6861	ns	
rs13126816	A	0.315	0.303	0.8297	ns		0.294	0.314	0.698	ns	
rs7668666	A	0.277	0.268	0.873	ns		0.308	0.250	0.2329	ns	
rs3775292	C	0.234	0.196	0.4262	ns		0.223	0.196	0.5358	ns	
rs3775291	T	0.394	0.326	0.2337	ns		0.346	0.342	0.9308	ns	

SNP: single-nucleotide polymorphism; MA: alelo minoritario; OR (95%CI): odds ratio con 95% de intervalo de confianza; ns: no significativo $p>0.05$. p_c:test de 10.000 permutaciones

Discusión

Discusión

En este estudio, hemos analizado la asociación de 5 genes relacionados con la inmunidad innata o la integridad de la mucosa esofágica con la susceptibilidad de desarrollar EoE. Hemos descrito por primera vez una asociación del gen TLR3 con susceptibilidad a padecer EoE y replicamos, también por primera vez, la asociación del gen TSLP con susceptibilidad a EoE en una población europea (153).

La fisiopatología de la EoE se ha definido por una respuesta inmune Th2 inducida por ciertos trofoalérgenos, que en contacto con la mucosa esofágica, conducen a eosinofilia tisular y sistémica, inflamación de las mucosas, disfunción epitelial y fibrosis subepitelial a largo plazo (1). La disfunción de la barrera epitelial juega un papel fundamental en este proceso porque promueve la exposición continua a los alérgenos y a la microbiota en la luz esofágica, lo que estimula, a su vez, a las células epiteliales y leucocitos para liberar quimiocinas y citocinas (63,154,155). Así, la fisiopatología de la EoE no se define únicamente por la inflamación predominante de eosinófilos, sino también por una morfología y funciones anormales de la barrera epitelial (85). Como consecuencia del aumento de la permeabilidad del epitelio esofágico se perpetúa la enfermedad, al permitir que los alérgenos y microbios penetren a través de la barrera mucosa (59).

El sistema inmune innato desempeña un importante papel en la regulación de las interacciones entre microbiota y la inmunidad del huésped. Cada vez son más los estudios que han demostrado que la EoE podría asociarse a cambios en la composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota esofágica (14,108,156,157). Los TLRs representan uno de los

mecanismos de reconocimiento de la microbiota mejor estudiados y su papel en múltiples enfermedades inmunológicas y alérgicas es motivo de constante investigación (30,33,158). Los TLRs son una familia de receptores transmembrana y/o intracelulares responsables, entre otras funciones, del reconocimiento de patógenos implicados en la respuesta inflamatoria, y constituyen un nexo de unión entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. Las células de sistema inmunitario innato procesan además los antígenos y los presentan a los linfocitos. La activación y maduración de estas células presentadoras de antígenos y de las células T reguladoras dependen, en parte, de las vías de señalización mediadas por TLRs. Una de las vías de activación de los mastocitos depende también de la señalización mediada por TLRs. De esta forma, los TLRs podrían influir decisivamente en la homeostasis inmune de la mucosa esofágica y en la pérdida de la tolerancia que se produce en la EoE. Por lo tanto, las interacciones de la microbiota esofágica con los componentes del sistema inmune innato a través de los TLRs y sus vías de señalización y conexión con el sistema inmune adaptativo podrían desempeñar un papel relevante en la fisiopatología de la EoE.

Son varios los estudios que han puesto de manifiesto una expresión elevada de TLR2 y TLR3 en las células epiteliales esofágicas comparando individuos con y sin EoE (25). Otros autores han demostrado que los pacientes con EoE activa tienen una sobreexpresión de TLR1, TLR2, TLR4 y TLR9 en las biopsias de la mucosa esofágica en comparación con los controles sanos, que vuelve a la normalidad después de la remisión inducida tras la retirada empírica de 6 alimentos (33). Este estudio, sin embargo, no muestra cambios en la expresión de TLR3 y TLR6.

La estimulación de TLR2 aumenta la expresión de proteínas implicadas en la integridad de la barrera epitelial (TJ, Claudina-1 y Zo- 1), TLR3 no se implica en esta vía, pero sin embargo, la estimulación de TLR3 se ha demostrado que activa el NF- κ B, dando lugar a la secreción de IL8 y TSLP (24). Por lo tanto, aunque la estimulación de la vía TLR3 no afecte a la función de barrera en este estudio, esto no excluye la que la vía de TLR3 pueda activar otros mecanismos efectores innatos epiteliales adicionales que no hayan sido analizados.

En este trabajo, hemos investigado la asociación de TLR3 y TLR4 con susceptibilidad a padecer EoE. Hemos demostrado que TLR3 está asociado con la susceptibilidad a EoE. Dos SNPs, rs5743305 y rs3775292, están asociados a EoE antes de corregir la "p", sin embargo, después de la corrección el rs5743305 pierde la significación estadística, $p_c=0,058$, aunque posiblemente aumentado el tamaño muestral (número de pacientes y controles) pueda llegar a la significación. Los alelos minoritarios del rs5743305(A) y rs3775292(C), son alelos de protección, es decir, los individuos con estos alelos tendrían menos probabilidad de sufrir la enfermedad. En el estudio de haplotipos se observa que sólo uno de los haplotipos mayoritarios es portador del alelo rs3775292(C), y el estudio de asociación nos muestra que la susceptibilidad está fuertemente influenciada por este haplotipo, lo que confirmaría la asociación del alelo rs3775292(C) con la enfermedad. El alelo rs3775292(C) sigue un modelo de herencia dominante, es decir basta con tener un único alelo C para actuar como factor de protección, por tanto, podríamos concluir que aquellos individuos que sean heterocigotos para este haplotipo tendrían menor riesgo de padecer la enfermedad. El rs3775292 está localizado en una región intrónica,

tratándose, por tanto, de un polimorfismo que no produce cambios de aminoácido en la proteína. Esto indicaría que la asociación de este polimorfismo con la enfermedad no sería debido a alteraciones funcionales en la proteína sino a los niveles de expresión. Esto podría explicar, al menos en parte, que en estudios de expresión genética realizado en biopsias de pacientes con EoE, el TLR3 se encuentre sobre expresado (41), aunque serían necesarios nuevos estudios de expresión génica con mayor número poblacional para comprobar estos resultados.

TLR3 se expresa en las células epiteliales del esófago humano (159). Es un TLR que detecta nucleótidos y es activado por ARN bicatenario procedente de virus. Actúa a través del adaptador TRIF/TICAM1, provocando la activación de NFK-B, la translocación nuclear de IRF3, la secreción de citocinas y la respuesta inflamatoria (24). Además de la activación por ARN viral, TLR-3 puede ser activado por ARNm endógeno liberado por células necróticas. Es decir, las células epiteliales del esófago humano pueden detectar señales de peligro endógenas, en parte debido a la señalización de TLR3. Diversos estudios demuestran que TLR3 es un sensor endógeno de necrosis y daño tisular, en ausencia de activación viral (160). Esto apoyaría el concepto de que la lesión epitelial juega un papel inductor en la patogénesis de la esofagitis y una explicación de por qué las células epiteliales tienen la capacidad de detectar el estrés y la lesión celular, funcionando como células efectoras inmunes innatas en el inicio de la inflamación esofágica (59). El hecho de que ciertos polimorfismos del gen TLR3 esté asociado con EoE, apoyaría el hecho de que las células epiteliales esofágicas en estos individuos genéticamente predispuestos pueden inducir, por sí mismas, el inicio de la

respuesta inflamatoria ante determinadas agresiones, como el propio ácido gástrico, cualquier alteración en la microbiota, y/o ciertos trofoalérgenos.

En nuestro estudio, examinamos también la posible asociación de susceptibilidad para el desarrollo de EoE con el gen TLR4, pero no encontramos asociaciones estadísticamente significativas. TLR4 se ha relacionado en múltiples estudios experimentales en animales y en humanos con una susceptibilidad a padecer alergia alimentaria y asma bronquial (161, 162), pero no se ha descrito ninguna asociación con EoE. La señalización de la flora bacteriana a través de TLR4 juega un papel en la inhibición de la hiperreactividad alérgica a alérgenos alimentarios que no se pueden sustituir mediante la señalización a través de otros receptores que reconocen otros patrones de “reconocimiento de patógenos” (TLR2, TLR5, y TLR9). TLR4 es estimulado por los lipopolisacáridos presentes en las bacterias gram negativas, aunque puede ser activado por algunos alérgenos que muestran homología estructural mediante un mecanismo de mimetismo molecular (163,164). La activación de TLR4 aumenta la actividad de FCεRI y promueve la expresión de citoquinas tipo Th2 implicadas en las respuestas eosinofílicas (165). Sin embargo, a pesar de que la fisiopatología de la EoE se haya relacionado con alergias alimentarias no hemos encontrado asociaciones entre los SNPs de TLR-4 estudiados y la susceptibilidad de desarrollar EoE.

Otro de los hallazgos más relevantes de este estudio es que se establece una relación entre el gen TSLP y susceptibilidad a EoE en la población española, ya que constituye el primer estudio de replicabilidad de estos resultados realizado en Europa, confirmando la implicación de este gen en la patogenia de la enfermedad. Las células epiteliales esofágicas producen

TSLP en respuesta a la activación de estas células por receptores TLR3 (51). TSLP ha sido identificado en múltiples estudios de genes candidatos, así como en los tres GWAS realizados hasta la fecha, como el principal gen candidato implicado en la patogénesis de la EoE (118-120). Hemos identificado diferentes SNPs del gen TSLP relacionados con la susceptibilidad a EoE. Los alelos minoritarios del rs10062929(A) y rs2289277(G), son alelos de protección, con una asociación estadística muy significativa ($p_c < 10^{-5}$). Estos resultados son concordantes con los publicados previamente en población norteamericana, en los que se identificaron a estos alelos asociados con una menor susceptibilidad a la enfermedad (51). En cuanto a los haplotipos, el estudio de asociación realizado nos muestra que la susceptibilidad está fuertemente influenciada por el rs2289277, ya que todos los haplotipos que portaban el alelo rs2289277(G) eran haplotipo de protección en pacientes con EoE. El rs2289277 está localizado en el intrón 2 por lo que se trata de un polimorfismo que no produce cambio de aminoácido en la proteína. Esto indica que la asociación de este polimorfismo con la enfermedad no es debido a alteraciones funcionales en la proteína TSLP. Sin embargo, el rs2289277 está en desequilibrio de ligamiento ($r^2=1$) con el rs3806933, el cual se encuentra en la región promotora. Este SNP parece crear un sitio de unión para el factor de transcripción AP-1 (proteína de activación 1) (166,167). En estudios funcionales, se ha observado que los individuos homocigotos para el alelo minoritario rs3806933(G), en desequilibrio de ligamiento con rs2289277(G), tienen menor expresión de ARN mensajero del gen TSLP que los individuos CC o CG (167). Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, los individuos homocigotos para el alelo

rs2289277(G) tendrían menor expresión de TSLP y por lo tanto menor activación de la respuesta Th2.

El estudio del papel del gen TSLP en enfermedades inflamatorias alérgicas constituye un área de intensa investigación. Los avances obtenidos acerca de la función de TSLP demuestran que puede ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de las enfermedades alérgicas y, más concretamente, en la EoE. Los datos publicados recientemente demuestran la eficacia del anti-TSLP, "Tezepelumab", un fármaco biológico que actúa sobre la inflamación Th2 previa, en pacientes con asma grave no controlada (168). TSLP actúa sobre numerosas células inmunitarias induciendo la producción de citocinas Th2, lo que en última instancia provoca eosinofilia en las vías respiratorias, hiperreactividad bronquial y remodelación de las vías respiratoria (169,170). En un ensayo clínico en fase 3, los pacientes que recibieron Tezepelumab, tuvieron un número significativamente menor de exacerbaciones y una mejor función pulmonar, control del asma y calidad de vida relacionada con la salud, independientemente del número de eosinófilos basales, aunque los beneficios fueron mayores en los pacientes con eosinófilos basales ≥ 300 células/ μ L (168). Se ha demostrado que tezepelumab bloquea el desarrollo de eosinofilia esofágica y las impactaciones alimentarias en modelos murinos de EoE (121), sin embargo, el tezepelumab no ha sido estudiado aún en pacientes con EoE (121).

Dado que la barrera epitelial forma parte importante de la fisiopatología de la EoE, estudiamos también la asociación de genes relacionados con la integridad de la mucosa esofágica con EoE, cómo la filagrina. El gen de la filagrina se localiza en la región cromosómica 1q21 dentro del complejo de

diferenciación epidérmica, una región que también alberga genes que codifican para otras proteínas importantes de la función de barrera normal de la epidermis (112). En una revisión sistemática y metaanálisis publicado en el año 2009, se describió que los defectos del gen de la filagrina aumentan el riesgo de desarrollar sensibilización, eccema atópico o dermatitis atópica y rinitis alérgica (86). Este trabajo subraya la importancia de los defectos del gen de la filagrina para aumentar el riesgo de sensibilización y el desarrollo de una variedad de fenotipos clínicos alérgicos, muy probablemente a través de la exposición a alérgenos a través de la piel. En un análisis de transcriptoma en pacientes con EoE, se ha observado que el ARNm de la filagrina se encuentra notablemente reducido en el esófago de pacientes EoE en comparación con las biopsias de pacientes sanos (171).

En este trabajo no hemos encontrado asociación entre el gen de la filagrina y EoE. Otros trabajos si han encontrado asociación, y se ha descrito un polimorfismo, 2282del4 relacionado con la pérdida de función de la proteína filagrina en pacientes con EoE (172), sin embargo, las respuestas epiteliales en EoE no son intrínsecas al epitelio, sino más bien secundarias a los efectos de IL13, que regula la expresión de genes EDC (filagrina e involucrina), apoyando un modelo de interacción coordinada entre IL13 y los genes del grupo del complejo de diferenciación epitelial en la esofagitis eosinofílica (172).

Otro de los campos explorados en este estudio fue la asociación del gen FOXP3 con EoE. FOXP3 interviene en la regulación de la respuesta inmune mediada por células T reguladoras en pacientes atópicos y alérgicos (173). FOXP3, es el marcador molecular principal de las células T reguladoras, un factor regulador de la transcripción, que participa directamente en la función y

desarrollo de las células reguladoras T CD4+ humanas y murinas (174). Se ha descrito un aumento en el número de linfocitos T esofágicos y células T reguladoras en pacientes con EoE en comparación con pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico y controles sanos (175). Los eosinófilos periféricos de los pacientes con EoE tienen capacidad supresora de células T y expresan FOXP3. Sin embargo, estos eosinófilos parecen tener una capacidad supresora de células T deteriorada en comparación con los eosinófilos circulantes en controles sanos (173). Debido a esta función del gen FOXP3, hemos estudiado la posible relación de este gen con EoE. No hemos encontrado ninguna evidencia de asociación entre el gen FOXP3 y la EoE. Un análisis reciente de todo el genoma identificó que FOXP3 regula la transcripción de más de 5.000 genes en células T reguladoras (176), lo que ilustra la extrema complejidad de dilucidar las posibles funciones de este factor de transcripción en la salud y la enfermedad humanas.

En la mayoría de los estudios poblacionales de EoE existe una mayor frecuencia de la enfermedad en los hombres con respecto a las mujeres, que viene a suponer que entre los primeros se produce el doble de casos, con un OR: 2,01 (IC95%: 1,63–2,48) (4). Por este motivo, hemos estudiado la asociación de los genes TLR3 y TSLP con la EoE estratificado por sexo. La asociación entre TLR3 y TSLP y la susceptibilidad con EoE fue estadísticamente significativa sólo para pacientes masculinos, hecho que muy probablemente se debe al bajo número de mujeres con EoE incluidas en nuestro estudio. Aunque no exista una significación estadísticamente con el sexo femenino, no podemos descartar un rol equivalente para TLR3 y TSLP en ambos sexos, ya que la tendencia de las frecuencias se comporta por igual en

todos los SNPs en ambos géneros. Es decir, que la dirección del riesgo de enfermedad (OR) era similar en pacientes masculinos y femeninos. Probablemente aumentando el tamaño de la población en estudio, obtendríamos un resultado estadísticamente significativo.

Como hallazgos más relevantes del estudio, hemos descrito un nuevo locus de susceptibilidad de EoE en el gen TLR3 y confirmamos los previamente descritos en el gen de TSLP. Para descartar si la asociación de los genes TSLP y TLR3 con la susceptibilidad a la EoE detectada en análisis individuales de cada gen, fuese debido a un posible sesgo atribuible al otro gen, y estimar la fuerza de asociación de cada gen de una manera independiente, realizamos una prueba de regresión logística. Nuestros resultados apoyan la asociación de forma independiente de TSLP y TLR3 con EoE. Hemos demostrado que cuando el modelo dominante de ambos polimorfismos de TLR3 y TSLP (llamados en nuestro estudio TLR3+ y TSLP+) están presentes, actúan de manera independiente como factor de protección frente a la enfermedad (OR=0,66 y 0,23 respectivamente). Por otra parte, observamos que cuando ambos polimorfismos están presentes en un individuo (TLR3+/TSLP+), el nivel de protección que confieren frente a la enfermedad aumenta de forma significativa. (OR=0,16).

La interacción de varios genes con EoE ha sido previamente demostrada. Un estudio reciente investigó la relación entre atopía, EoE y riesgo genético [66]. En este estudio, se evaluaron 63 genes asociados con atopía y EoE, tanto en individuos atópicos como no atópicos. Los resultados sugirieron una interacción mecanicista gen-gen mediante la cual los genes relacionados con la atopía y los genes específicos de EoE (en particular los de IL4 y TSLP)

cooperan sinérgicamente para aumentar el riesgo de EoE. Es decir, la susceptibilidad genética del desarrollo de EoE está mediada por genes asociados con atopia común y genes específicos de EoE que, cuando están presentes juntos, actúan sinérgicamente para aumentar la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades alérgicas.

TSLP y TLR3 se encuentran en la misma línea biológica, TLR3 se ha reconocido como un regulador clave de expresión y función de TSLP (51). TLR3 reconoce ARN bicatenario, que se encuentra en algunos virus. La estimulación de las células epiteliales primarias del esófago con poli I: C (un mimético de dsRNA) induce la expresión de ARNm de TSLP. En esta línea estudiamos la posible interacción epistática entre los genes de TLR3 y TSLP utilizando el método MDR (Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial) (151). Epistasis es una circunstancia en la que la expresión de un gen se ve afectada por la expresión de uno o más genes heredados de forma independiente. La epistasis se presenta entre genes que se encuentran en la misma ruta bioquímica o reguladora, como es el caso de TLR3 y TSLP. En este caso, hemos estudiado si la acción de TLR3, que se encuentra al inicio de la ruta, modifica la acción de TSLP.

En nuestro estudio, el análisis de entropía de interacción no reveló epistasis estadística entre los genes TLR3 y TSLP ($IG=-4,52\%$). Si bien la ausencia de epistasis estadística no implica necesariamente ausencia de epistasis biológica (genética), nuestros resultados sugieren un efecto no epistático entre ambos loci (TSLP y TLR3). Es decir, aunque ambos genes se encuentran en la misma ruta, las interacciones de ambos genes tienen redundancia o efectos independientes.

Las asociaciones clínicas y epidemiológicas entre la EoE y otras comorbilidades alérgicas están bien establecidas (133). Del 68 a 70% de los pacientes con EoE tienen asociadas comorbilidades atópicas, como la dermatitis atópica, alergia alimentaria mediada por IgE, asma y rinitis alérgica, cada una de estas manifestaciones alérgicas implica un riesgo individual y acumulativo para el diagnóstico posterior de EoE (135,140). La exposición a alérgenos es una característica central de la patogénesis de la EoE, aunque no se identifique un alérgeno específico en cada paciente. Este hecho viene apoyado por la remisión de la enfermedad tras realización de dietas elementales, por el empeoramiento estacional que se ha visto en algunos pacientes con EoE, y cuando no es posible identificar un alérgeno como responsable, la respuesta adecuada a los corticoides de forma tópica, al igual que en otras enfermedades alérgicas como la rinitis alérgica, el asma y la dermatitis atópica.

La relación entre estas afecciones es probablemente el resultado de características genéticas, ambientales e inmunológicas compartidas, que pueden dar lugar a la existencia de distintos endotipos de esofagitis, aún por definir (figura 16). Por ejemplo, es probable que haya un subconjunto de pacientes con EoE que estén significativamente predispuestos a desarrollar EoE como resultado solamente de su genética. Sin embargo, otros pueden requerir de factores ambientales y/o inflamación de tipo Th2 concurrente en un lugar distinto al esófago para potenciar el desarrollo de la EoE. Los estudios futuros deben centrarse en establecer las contribuciones relativas de estos "determinantes alérgicos" al desarrollo de la EoE, con especial atención a los

mecanismos inmunológicos que vinculan una manifestación alérgica con el desarrollo de otra (133).

A

Genética EoE

B

Factores ambientales
Genética EoE

C

Factores ambientales Inflamación T2
Genética EoE

Figura 16. Endotipos en EoE.

Con el objetivo de estudiar la relación entre los genes de TSLP y TLR3 con el fenotipo atópico, examinamos la asociación de ambos genes con la sensibilización a aeroalergenos y alimentos en los pacientes con EoE. Con respecto al gen TSLP, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre TSLP y la sensibilización a los alérgenos alimentarios o

inhalantes en pacientes con EoE. En nuestro estudio, el gen TSLP se asocia con EoE de forma independiente al fenotipo atópico de estos pacientes. Sin embargo, hemos encontrado dos SNPs en el gen TRL3, rs11721827 y rs5743303, estadísticamente asociados con sensibilización a los aeroalergenos y a los alimentos, respectivamente, lo que sugiere la posibilidad de que las dos variantes puedan actuar como marcadores de variantes endotípicas en la EoE. Al igual que sucedía con el SNP rs3775292, estos SNPs están localizados en regiones intrónicas, tratándose, por tanto, de polimorfismos que no producen cambios de aminoácido en la proteína y la influencia de estas variantes podría estar relacionadas con los niveles de expresión del ARNm o formas alternativas de la proteína traducida.

Nuestros resultados demuestran una asociación del gen TLR3 con la patogenia de la EoE, tanto con la susceptibilidad como con las distintas variantes fenotípicas. Esto parece indicar que determinados alelos de TLR3 estén implicados en la sensibilización tanto a aeroalérgenos como alimentos en pacientes genéticamente predispuestos. En base a todo esto, proponemos que la activación del sistema inmunológico innato en el epitelio esofágico que involucra la señalización TLR3 y la expresión de ARNm de TSLP, interactúa con respuestas alérgicas adaptativas desencadenadas por alérgenos.

Con los resultados de nuestro estudio, proponemos un modelo fisiopatológico, que por primera vez en la literatura explicaría la activación desde la barrera epitelial, y como un daño en ésta es capaz de activar en primera instancia a la respuesta inmune innata y posteriormente la activación de una respuesta de tipo Th2, ampliamente descrita con anterioridad en la EoE y que dará paso en definitiva a todas esas alteraciones y disfunciones en la

barrera epitelial que darían lugar a la EoE. Proponemos que diversos factores medioambientales (como alteraciones en la microbiota, existencia de reflujo gástrico, infecciones, alérgenos alimentarios y aeroalérgenos) inducirían en individuos predispuestos genéticamente, por agresión directa a las células epiteliales esofágicas la activación de los receptores TLR3 en las células epiteliales esofágicas. La activación de TLR3 como señal de daño endógeno de las células esofágicas, induciría la liberación de diversas señales de alarma (TSLP, IL15, IL33), que conduciría a través de ILC2 y basófilos, a una respuesta inmune Th2 orquestada por la liberación de citocinas (fundamentalmente IL4, IL5, IL9 y IL13). TSLP juega un papel importante en la promoción de la diferenciación de células Th2 al inducir la capacidad de polarización Th2 de las células dendríticas (45,46). Variantes del gen TSLP aumentan la respuesta Th2 (45), se asocian a un mayor riesgo de EoE y además los niveles de TSLP son significativamente más altos en pacientes con EoE (118).

Las células Th2 activadas producen citocinas como IL4, IL5 e IL13. IL4 promueve la diferenciación de células T en células Th2 y B, que eventualmente conduce a la secreción de IgE. IL5 e IL13 inducen la secreción de eotaxina-3 por las células epiteliales. El gen de la eotaxina-3, induce el reclutamiento de eosinófilos en el esófago. IL13 reduce los niveles de expresión de genes del complejo de diferenciación epidérmica (EDC), DSG-1, filagrina e involucrina, lo que debilita la función de barrera del epitelio esofágico. IL13 induce también la producción de CAPN-14 (enzima proteolítica específica del esófago), que a su vez inhibe la expresión de DSG-1 contribuyendo a la pérdida de la integridad de la barrera epitelial. Así mismo la IL13 induce la remodelación esofágica,

depósitos de colágeno y angiogénesis. Al mismo tiempo, los eosinófilos y mastocitos activados localmente producen TGF-1, que desencadena cambios en la pared esofágica, que a su vez está mediada por fibroblastos y periostina, lo que conduce a disfunción del músculo liso. Es decir, originándose los efectos posteriores de las citoquinas afectando a la remodelación y disfunción del epitelio, la lámina propia, la submucosa y el músculo liso (hiperplasia, alteración de la barrera; fibrosis en la lámina propia y submucosa; y dismotilidad del músculo liso dentro de la muscularis interna y externa) característicos de la EoE.

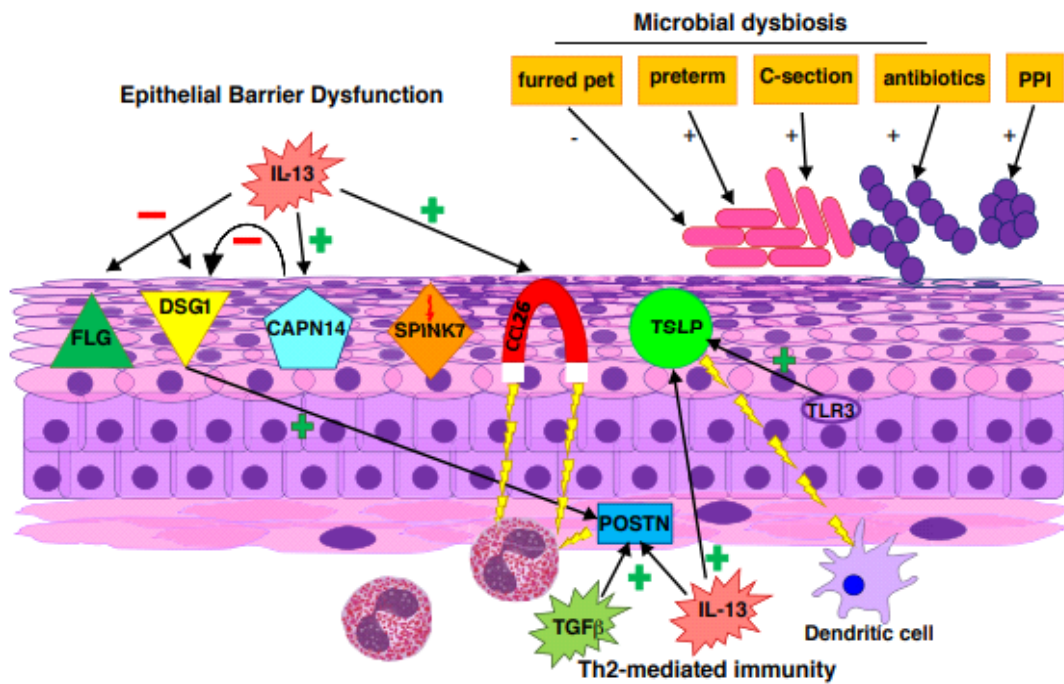


Figura 17. Modelo fisiopatológico de la EoE. La alteración de la integridad de la función de barrera epitelial parece ser fundamental para la fisiopatología de la EoE. FLG (filagrina), DSG1 (desmogleína-1), CAPN14 (calpaína 14), SPINK7 (inhibidores de la serina proteasa tipo Kazal), CCL26 (eotaxina 3), TSLP (linfopoetina tímica estromal), POSTN (periostina), TLR3 (receptor tipo Toll 3), TGFβ (factor de crecimiento tisular), IL-13 (interleucina-13).

Conclusiones

Conclusiones

- En este estudio se describe por primera vez en la literatura una asociación del gen TLR3 con la susceptibilidad a padecer EoE. Este hallazgo supone un hecho de relevancia científica ya que proporciona un paso clave inicial en la fisiopatología de la EoE, a través la activación de la respuesta inmune innata en las células epiteliales esofágicas, que desencadenará posteriormente una respuesta inflamatoria tipo Th2 propia de la EoE.
- Demostramos, también por primera vez la replicación de la asociación del gen TSLP con susceptibilidad a la EoE, en una población europea.
- Asumimos un rol equivalente para TLR3 y TSLP en ambos sexos. En el análisis estratificado por sexos de ambos genes sólo es estadísticamente significativo en los hombres, aunque la tendencia de frecuencias es la misma en el grupo de las mujeres que en los hombres.
- Aunque ambos genes relacionados con EoE (TLR3 y TSLP) se encuentran en la misma línea biológica, en el estudio de interacción de ambos genes demostramos un efecto independiente de ambos genes en la susceptibilidad de desarrollar EoE.
- Hemos examinado la asociación de ambos genes (TLR3 y TSLP) con la sensibilización a aeroalergenos y alimentos en los pacientes con EoE concluyendo que:
 - El gen TSLP se asocia con EoE de forma independiente al fenotipo atópico de estos pacientes.

- Describimos por primera vez en la literatura, que variantes en el gen TLR3 están estadísticamente asociadas con sensibilización a los aeroalérgenos y a los alimentos, sugiriendo la posibilidad de que estas variantes puedan actuar como marcadores de los diferentes endotipos de la EoE.
- Por último, proponemos un nuevo modelo fisiopatológico de la EoE, a través de la activación de los TLR3 en las células epiteliales esofágicas.

Resumen

Resumen

1. Introducción:

La EoE es una enfermedad inflamatoria crónica, en cuyo origen existe una alteración de la regulación de la respuesta inmune del huésped frente a la microbiota y a otros antígenos intraluminales (especialmente alérgenos alimentarios) en sujetos susceptibles genéticamente, produciéndose alteraciones en la función y regulación del sistema inmune innato y adaptativo, así como una disfunción de la barrera epitelial que daría lugar al proceso inflamatorio y posterior remodelado de este epitelio esofágico.

2. Hipótesis y Objetivos:

La hipótesis de este proyecto de investigación es que determinadas variantes de los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG pueden influir en la susceptibilidad a padecer EoE y repercutir en los distintos fenotipos (modos de expresión clínica) de esta enfermedad.

3. Objetivos:

1. Evaluar la asociación de variantes en los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG con la susceptibilidad a desarrollar EoE en la población española.
2. Evaluar la asociación de las variantes de los genes TSLP, TLR3, TLR4, FOXP3 y FLG con las comorbilidades alérgicas asociadas a la EoE.

4. Material y Métodos:

Pacientes y controles:

Se incluyeron un total de 218 pacientes adultos de raza caucásica diagnosticados de EoE, 131 pacientes del área sanitaria del HUVR (Sevilla) y 87 del área sanitaria del Hospital General de Tomelloso (Ciudad Real) y 376 donantes de médula ósea sanos de raza caucásica. Para evitar los efectos de confusión de las asociaciones genéticas investigadas con otras afecciones, se excluyeron pacientes EoE que tenían otras afecciones autoinmunes (es decir, enfermedad celíaca, diabetes mellitus y trastornos tiroideos).

Fenotipado de los pacientes:

A todos los pacientes se les realizó una entrevista con el objetivo de detectar comorbilidades atópicas (rinitis, asma, dermatitis atópica) y un estudio alergológico, pruebas de punción cutánea (SPT) con un panel de 17 aeroalérgenos y 22 alimentos de origen animal y vegetal, con el objetivo de detectar comorbilidades atópicas (rinitis, asma, dermatitis atópica) y clasificar a los pacientes en dos fenotipos principales (atópicos y no atópicos).

Estudio genético:

Se seleccionaron 27 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) en cinco genes candidatos previamente identificados como relevantes para la fisiopatología EoE en base a su función en la respuesta inmune innata (TLR3, TLR4, FOXP3, FLG y TSLP). Se utilizó la base de datos del proyecto HapMap para seleccionar los Tag SNPs (tSNPs) con frecuencia del alelo minoritario (MAF) igual o superior al 0,05 en población CEU, que nos permitieran capturar

en cada una de las regiones el 100% de los SNPs con $r^2 > 0,8$. De acuerdo con las reglas anteriores, se seleccionaron 27 tSNP que nos permitieron capturar 52 SNP.

El genotipado se realizó utilizando TaqMan® SNP Genotyping Assays en un LightCycler. Para verificar la reproducibilidad y precisión inter-experimental, el 8% de las muestras se duplicaron. Se impuso en el análisis una tasa de control de calidad de muestra del 90% y una tasa de éxito de genotipado de SNP del 90%.

5. Resultados:

Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas y haplotípicas en 5 tSNP ubicados en el locus TSLP y un tSNP ubicado en el locus TLR3, demostrándose una asociación estadística positiva con EoE. Se analizaron las interacciones entre los loci TLR3 y TSLP. Los individuos TLR3+/TSLP- y TLR3-/TSLP+ mostraron una susceptibilidad significativamente reducida a EoE en comparación con los individuos TLR3-/TSLP- (OR=0,66, $p=0,036$ y OR=0,23, $p=0,00014$, respectivamente). Asimismo, los individuos TLR3+/TSLP+ mostraron una menor susceptibilidad de desarrollar EoE (OR=0.16, $p=0.0001$). Sin embargo, la ganancia de interacción atribuida a la combinación de ambos genes fue negativa (IG= -4,52%), lo que indica redundancia o efecto independiente. Además, se encontró que el locus TLR3 estaba asociado con la sensibilización a

aeroalérgenos y alimentos en pacientes con EoE (OR=9,67, pc=0,025 y OR=0,53, pc=0,048, respectivamente).

No se encontraron diferencias significativas en el resto de los genes estudiados (TLR4, FOXP3 y filagrina).

6. Conclusiones:

- Se describe por primera vez en la literatura una asociación del gen TLR3 con la susceptibilidad a padecer EoE.
- Demostramos, también por primera vez la replicación de la asociación del gen TSLP con susceptibilidad a la EoE, en una población europea.
- En el estudio de interacción de ambos genes (TLR3y TSLP) demostramos que las interacciones de ambos genes tienen redundancia o efectos independientes en la susceptibilidad de desarrollar EoE.
- Describimos por primera vez en la literatura, que variantes en el gen TLR3 están estadísticamente asociadas con sensibilización a los aeroalérgenos y a los alimentos, sugiriendo la posibilidad de que estas variantes puedan actuar como marcadores de los diferentes endotipos de la EoE.

Bibliografía

Bibliografía:

1. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á, von Arnim U, Bredenoord AJ, Bussmann C, et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterol J*. 2017;5(3):335-58.
2. Simon D, Cianferoni A, Spergel JM, Aceves S, Holbreich M, Venter C, et al. Eosinophilic esophagitis is characterized by a non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy*. 2016;71(5):611-20.
3. Chehade M, Aceves SS. Food allergy and eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(3):231-7.
4. Arias Á, Pérez-Martínez I, Tenías JM, Lucendo AJ. Systematic review with meta-analysis: the incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(1):3-15.
5. Dellon ES, Hirano I. Epidemiology and Natural History of Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*. 2018;154(2):319-32.e3.
6. Prasad GA, Alexander JA, Schleck CD, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Elias RM, et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1055-61.
7. Straumann A, Simon HU. Eosinophilic esophagitis: escalating epidemiology? *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):418-9.
8. Dellon ES, Jensen ET, Martín CF, Shaheen NJ, Kappelman MD. Prevalence of eosinophilic esophagitis in the United States. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(4):589-96 e1.
9. Hruz P, Straumann A, Bussmann C, Heer P, Simon HU, Zwahlen M, et al. Escalating incidence of eosinophilic esophagitis: a 20-year prospective, population-based study in Olten County, Switzerland. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128(6):1349-50.e5.
10. Arias Á, Lucendo AJ. Prevalence of eosinophilic oesophagitis in adult patients in a central region of Spain. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2013;25(2):208-212.
11. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M, Abonia JP, Wu YY, Lu TX, et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1292-300.
12. Lexmond WS, Neves JF, Nurko S, Olszak T, Exley MA, Blumberg RS, et al. Involvement of the iNKT cell pathway is associated with early-onset eosinophilic esophagitis and response to allergen avoidance therapy. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(5):646-57.
13. Arias Á, Lucendo AJ, Martínez-Fernández P, González-Castro AM, Fortea M, González-Cervera J, et al. Dietary treatment modulates mast cell phenotype, density, and activity in adult eosinophilic oesophagitis. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(1):78-91.
14. Harris JK, Fang R, Wagner BD, Choe HN, Kelly CJ, Schroeder S, et al. Esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128346.
15. Benitez AJ, Hoffmann C, Muir AB, Dods KK, Spergel JM, Bushman FD, et al. Inflammation-associated microbiota in pediatric eosinophilic esophagitis. *Microbiome*. 2015;3:23.
16. Jensen ET, Kappelman MD, Kim HP, Ringel-Kulka T, Dellon ES. Early life exposures as risk factors for pediatric eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(1):67-71.
17. Jensen ET, Dellon ES. Environmental factors and eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(1):32-40.

18. Dellon ES, Shaheen O, Koutlas NT, Chang AO, Martin LJ, Rothenberg ME, et al. Early life factors are associated with risk for eosinophilic esophagitis diagnosed in adulthood. *Dis Esophagus*. 2021;34(2).
19. Jiménez-Dalmaroni MJ, Gerswhin ME, Adamopoulos IE. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2016;15(1):1-8.
20. Satoh T, Akira S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6).
21. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):985-92.
22. van Egmond M, Vidarsson G, Bakema JE. Cross-talk between pathogen recognizing Toll-like receptors and immunoglobulin Fc receptors in immunity. *Immunol Rev*. 2015;268(1):311-27.
23. Fillon S, Robinson ZD, Colgan SP, Furuta GT. Epithelial function in eosinophilic gastrointestinal diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2009;29(1):171-8, xii-xiii.
24. Lim DM, Narasimhan S, Michaylira CZ, Wang ML. TLR3-mediated NF- κ B signaling in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(6):G1172-80.
25. Mulder DJ, Lobo D, Mak N, Justinich CJ. Expression of toll-like receptors 2 and 3 on esophageal epithelial cell lines and on eosinophils during esophagitis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(3):630-42.
26. Straumann A, Bauer M, Fischer B, Blaser K, Simon HU. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a T(H)2-type allergic inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):954-61.
27. Jyonouchi S, Smith CL, Saretta F, Abraham V, Ruymann KR, Modayur-Chandramouleeswaran P, et al. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(1):58-68.
28. Zuo L, Lucas K, Fortuna CA, Chuang CC, Best TM. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD. *Front Physiol*. 2015;6:312.
29. Gangloff SC, Guenounou M. Toll-like receptors and immune response in allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;26(2):115-25.
30. Bezemer GF, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, et al. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*. 2012;64(2):337-58.
31. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Tiittanen M, Savilahti E. Infiltration of Foxp3- and Toll-like receptor-4-positive cells in the intestines of children with food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(4):367-76.
32. Tunis MC, Marshall JS. Toll-like receptor 2 as a regulator of oral tolerance in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:606383.
33. Arias Á, Vicario M, Bernardo D, Olalla JM, Fortea M, Montalban-Arques A, et al. Toll-like receptors-mediated pathways activate inflammatory responses in the esophageal mucosa of adult eosinophilic esophagitis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9(4):147.
34. Simon D, Page B, Vogel M, Bussmann C, Blanchard C, Straumann A, et al. Evidence of an abnormal epithelial barrier in active, untreated and corticosteroid-treated eosinophilic esophagitis. *Allergy*. 2018;73(1):239-47.
35. Warners MJ, Vlieg-Boerstra BJ, Verheij J, van Hamersveld PHP, van Rhijn BD, Van Ampting MTJ, et al. Esophageal and Small Intestinal Mucosal Integrity in Eosinophilic Esophagitis and Response to an Elemental Diet. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(7):1061-71.
36. Katzka DA, Tadi R, Smyrk TC, Katarya E, Sharma A, Geno DM, et al. Effects of topical steroids on tight junction proteins and spongiosis in esophageal epithelia of patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(11):1824-9.e1.

37. Zeisel MB, Dhawan P, Baumert TF. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut*. 2019;68(3):547-61.
38. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(9):564-80.
39. FARQUHAR MG, PALADE GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 1963;17:375-412.
40. Abdounour-Nakhoul SM, Al-Tawil Y, Gyftopoulos AA, Brown KL, Hansen M, Butcher KF, et al. Alterations in junctional proteins, inflammatory mediators and extracellular matrix molecules in eosinophilic esophagitis. *Clin Immunol*. 2013;148(2):265-78.
41. Ruffner MA, Song L, Maurer K, Shi L, Carroll MC, Wang JX, et al. Toll-like receptor 2 stimulation augments esophageal barrier integrity. *Allergy*. 2019;74(12):2449-60.
42. Chandramouleeswaran PM, Shen D, Lee AJ, Benitez A, Dods K, Gambanga F, et al. Preferential Secretion of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) by Terminally Differentiated Esophageal Epithelial Cells: Relevance to Eosinophilic Esophagitis (EoE). *PLoS One*. 2016;11(3):e0150968.
43. Mulder DJ, Pooni A, Mak N, Hurlbut DJ, Basta S, Justinich CJ. Antigen presentation and MHC class II expression by human esophageal epithelial cells: role in eosinophilic esophagitis. *Am J Pathol*. 2011;178(2):744-53.
44. Lucendo AJ, Navarro M, Comas C, Pascual JM, Burgos E, Santamaría L, et al. Immunophenotypic characterization and quantification of the epithelial inflammatory infiltrate in eosinophilic esophagitis through stereology: an analysis of the cellular mechanisms of the disease and the immunologic capacity of the esophagus. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(4):598-606.
45. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(4):289-93.
46. Oyoshi MK, Larson RP, Ziegler SF, Geha RS. Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(5):976-84, 84.e1-5.
47. Johnston LK, Hsu CL, Krier-Burris RA, Chhiba KD, Chien KB, McKenzie A, et al. IL-33 Precedes IL-5 in Regulating Eosinophil Commitment and Is Required for Eosinophil Homeostasis. *J Immunol*. 2016;197(9):3445-53.
48. Liu YJ. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol*. 2009;101:1-25.
49. Wang J, Xing F. Human TSLP-educated DCs. *Cell Mol Immunol*. 2008;5(2):99-106.
50. Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*. 2005;6(10):1047-53.
51. Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, Blanchard C, Collins MH, Putnam PE, et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):160-5.e3.
52. Davis BP, Rothenberg ME. Mechanisms of Disease of Eosinophilic Esophagitis. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:365-393. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044241.
53. Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, Kim BS, Headley MB, Doering TA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*. 2011;477(7363):229-33.
54. Inage E, Furuta GT, Menard-Katcher C, Masterson JC. Eosinophilic esophagitis: pathophysiology and its clinical implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;315(5):G879-G886. doi:10.1152/ajpgi.00174.2018.
55. Hui CC, Rusta-Sallehy S, Asher I, Heroux D, Denburg JA. The effects of thymic stromal lymphopoietin and IL-3 on human eosinophil-basophil lineage commitment: Relevance to atopic sensitization. *Immun Inflamm Dis*. 2014;2(1):44-55.
56. Holgate ST. The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol*. 2007;28(6):248-51.

57. Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):238-44; quiz 45-6.
58. Blanchard C, Rothenberg ME. Basic pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2008;18(1):133-43; x.
59. Davis BP. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology.* 2018;55(1):19-42.
60. Clayton F, Peterson K . Eosinophilic Esophagitis: Pathophysiology and Definition. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America.* 2018;28(1): 1-14.
61. O'Byrne PM, Inman MD, Parameswaran K . The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2001;108(4):503-8.
62. Yamazaki K, Murray JA, Arora AS, Alexander JA, Smyrk TC, Butterfield JH, et al. Allergen-Specific In Vitro Cytokine Production in Adult Patients with Eosinophilic Esophagitis. *Digestive Diseases and Sciences.* 2006;51(11):1934-41.
63. Straumann A, Department of Gastroenterology K, Olten, Switzerland, Kristl J, Department of Pharmacology UoB, Bern, Switzerland, Conus S, Department of Pharmacology UoB, Bern, Switzerland, et al. Cytokine Expression in Healthy and Inflamed Mucosa: Probing the Role of Eosinophils in the Digestive Tract. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2022;11(8):720-6.
64. Vinit C, Dieme A, Courbage S, Dehaine C, Dufeu CM, Jacquemot S, et al. Eosinophilic esophagitis: Pathophysiology, diagnosis, and management. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie.* 2019;26(3):182-90.
65. Rothenberg ME. Molecular, genetic, and cellular bases for treating eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2015;148(6):1143-57.
66. Sherrill JD, KC K, Wu D, Djukic Z, Caldwell JM, Stucke EM, et al. Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunology.* 2013;7(3):718-29.
67. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K, Caldwell JM, Collins MH, Ahrens A, et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *J Immunol.* 2010;184(7):4033-41.
68. Zuo L, Fulkerson PC, Finkelman FD, Mingler M, Fischetti CA, Blanchard C, et al. IL-13 Induces Esophageal Remodeling and Gene Expression by an Eosinophil-Independent, IL-13R α 2-Inhibited Pathway. 2010.
69. Rothenberg ME, Wen T, Greenberg A, Alpan O, Enav B, Hirano I, et al. Intravenous anti-IL-13 mAb QAX576 for the treatment of eosinophilic esophagitis. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2015;135(2):500-7.
70. Niranjan R, Rayapudi M, Mishra A, Dutt P, Dynda S. Pathogenesis of allergen-induced eosinophilic esophagitis is independent of interleukin (IL)-13. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(6):408-15.
71. Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP, et al. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest.* 2006;116(2):536-47.
72. Zhu X, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, Wang M, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, Mavi P, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, et al. Interleukin-15 Expression Is Increased in Human Eosinophilic Esophagitis and Mediates Pathogenesis in Mice. *Gastroenterology.* 2010;139(1):182-93.e7.
73. Mishra A, Division of Allergy and Immunology UoCCoM, Cincinnati, Ohio, Wang M, Division of Allergy and Immunology UoCCoM, Cincinnati, Ohio, Pemmaraju VR, Division of Allergy and Immunology UoCCoM, Cincinnati, Ohio, et al. Esophageal

- Remodeling Develops as a Consequence of Tissue Specific IL-5-Induced Eosinophilia. *Gastroenterology*. 2008;134(1):204-14.
74. Rieder F, Nonevski I, Ma J, Ouyang Z, West G, Protheroe C, et al. T-helper 2 cytokines, transforming growth factor β 1, and eosinophil products induce fibrogenesis and alter muscle motility in patients with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*. 2014;146(5): :1266-77.e1-9.
 75. Davis BP, Rothenberg ME. Antigen presentation by eosinophils in eosinophilic esophagitis?. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2013;56(3):242.
 76. Abonia JP, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, Blanchard C, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, Butz BB, Division of Allergy and Immunology DoP, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(1):140-9.
 77. Niranjana R, Mavi P, Rayapudi M, Dynda S, Mishra A. Pathogenic role of mast cells in experimental eosinophilic esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(12):G1087-G1094. doi:10.1152/ajpgi.00070.2013.
 78. Caldwell JM, Paul M, Rothenberg ME. Novel immunologic mechanisms in eosinophilic esophagitis. *Current opinion in immunology*. 2017;48: 114-121.
 79. de Fraissinette A, Schmitt D, Thivolet J. Langerhans cells of human mucosa. *The Journal of dermatology*. 1989;16(4): 255-262
 80. Eiwegger T, Akdis CA. IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma. *European journal of immunology*. 2011;41(6): 1535-1538.
 81. Noti M, Wojno ED, Kim BS, Siracusa MC, Giacomini PR, Nair MG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nat Med*. 2013;19(8):1005-13.
 82. Stuck MC, Straumann A, Simon HU. Relative lack of T regulatory cells in adult eosinophilic esophagitis - no normalization after corticosteroid therapy. *Allergy*. 2011;66(5):705-7.
 83. Teitelbaum JE, Nutrition CIPiGa, Fox VL, Nutrition CIPiGa, Twarog FJ, Division of Allergy and Immunology CsH, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, et al. Eosinophilic esophagitis in children: Immunopathological analysis and response to fluticasone propionate. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1216-25.
 84. Montalvillo E, Garrote JA, Bernardo D, Arranz E. Innate lymphoid cells and natural killer T cells in the gastrointestinal tract immune system. *Rev Esp Enferm Dig*. 2014;106(5):334-45.
 85. Rochman M, Travers J, Miracle CE, Bedard MC, Wen T, Azouz NP, et al. Profound loss of esophageal tissue differentiation in patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(3):738-49.e3.
 86. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2006;38(4):441-6.
 87. Gonsalves N, Yang GY, Doerfler B, Ritz S, Ditto AM, Hirano I. Elimination diet effectively treats eosinophilic esophagitis in adults; food reintroduction identifies causative factors. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1451-9.e1; quiz e14-5.
 88. Aceves SS. Remodeling and fibrosis in chronic eosinophil inflammation. *Dig Dis*. 2014;32(1-2):15-21.
 89. Kagalwalla AF, Department of Pediatrics CSMHaNU, Chicago, Ill, Department of Pediatrics JSHoCC, Chicago, Ill, Akhtar N, Department of Biochemistry and Molecular Genetics CoM, University of Illinois at Chicago, Chicago, Ill, Woodruff SA, et al. Eosinophilic esophagitis: Epithelial mesenchymal transition contributes to esophageal remodeling and reverses with treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;129(5):1387-96.e7.

90. Mulder DJ, Pacheco I, Hurlbut DJ, Mak N, Furuta GT, MacLeod RJ, et al. FGF9-induced proliferative response to eosinophilic inflammation in oesophagitis. 2009.
91. Fontillón M, Lucendo AJ. Transmural eosinophilic infiltration and fibrosis in a patient with non-traumatic Boerhaave's syndrome due to eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(11):1762.
92. Fox VL, Nurko S, Teitelbaum JE, Badizadegan K, Furuta GT. High-resolution EUS in children with eosinophilic "allergic" esophagitis. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2003;57(1):30-6.
93. Lucendo AJ. Motor disturbances participate in the pathogenesis of eosinophilic oesophagitis, beyond the fibrous remodelling of the oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24(8):1264-7.
94. Jakobsdottir J, Gorin MB, Conley YP, Ferrell RE, Weeks DE. Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers. *PLoS genetics*. 2009;5(2).
95. Tenesa A, Knott SA, Ward D, Smith D, Williams JL, Visscher PM. Estimation of linkage disequilibrium in a sample of the United Kingdom dairy cattle population using unphased genotypes. *J Anim Sci*. 2003;81(3):617-23.
96. Tenesa A, Navarro P, Hayes BJ, Duffy DL, Clarke GM, Goddard ME, et al. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Res*. 2007;17(4):520-6.
97. Tenesa A, Dunlop MG. Validity of tagging SNPs across populations for association studies. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(3):357-63.
98. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science (New York, NY)*. 1996;273(5281):1516-1517.
99. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(5): 356-369.
100. Rienhoff HY Jr. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England journal of medicine*. 2010;363(2):2077.
101. Collins MH, Blanchard C, Abonia JP, Kirby C, Akers R, Wang N, et al. Clinical, pathologic, and molecular characterization of familial eosinophilic esophagitis compared with sporadic cases. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(6):621-9.
102. Allen-Brady K, Firszt R, Fang JC, Wong J, Smith KR, Peterson KA. Population-based familial aggregation of eosinophilic esophagitis suggests a genetic contribution. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):1138-43.
103. Alexander ES, Martin LJ, Collins MH, Kottyan LC, Sucharew H, He H, et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1084-92.e1.
104. Jensen ET, Kuhl JT, Martin LJ, Langefeld CD, Dellon ES, Rothenberg ME. Early-life environmental exposures interact with genetic susceptibility variants in pediatric patients with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):632-7.e5.
105. Jensen ET, Kuhl JT, Martin LJ, Rothenberg ME, Dellon ES. Prenatal, intrapartum, and postnatal factors are associated with pediatric eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):214-22.
106. Zilbauer M, Zellos A, Heuschkel R, Gasparetto M, Kraiczy J, Postberg J, et al. Epigenetics in Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition: Present Trends and Future Perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(4):521-9.
107. Johnson J, Dellon ES, McCoy AN, Sun S, Jensen ET, Fodor AA, et al. Lack of association of the esophageal microbiome in adults with eosinophilic esophagitis compared with non-EoE controls. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2021;30(1):17-24.
108. Dellon ES. The Esophageal Microbiome in Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*. 2016;151(2):364-5.

109. Jensen ET, Langefeld CD, Zimmerman KD, Howard TD, Dellon ES. Epigenetic methylation in Eosinophilic Esophagitis: Molecular ageing and novel biomarkers for treatment response. *Clin Exp Allergy*. 2020;50(12):1372-80.
110. Chang X, March M, Mentch F, Nguyen K, Glessner J, Qu H, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new eosinophilic esophagitis loci. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(3):988-98.
111. Kottyan LC, Trimarchi MP, Lu X, Caldwell JM, Maddox A, Parameswaran S, et al. Replication and meta-analyses nominate numerous eosinophilic esophagitis risk genes. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(1):255-66.
112. Kottyan LC, Parameswaran S, Weirauch MT, Rothenberg ME, Martin LJ. The genetic etiology of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):9-15.
113. Ryu S, Lee KH, Tizaoui K, Terrazzino S, Cargnin S, Effenberger M, et al. Pathogenesis of Eosinophilic Esophagitis: A Comprehensive Review of the Genetic and Molecular Aspects. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).
114. RA vdO, A S. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;339.
115. Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, Rapaport D, Ishida-Yamamoto A, Isakov O, et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nature Genetics*. 2013;45(10):1244-8.
116. Has C, Jakob T, He Y, Kiritsi D, Hausser I, Bruckner-Tuderman L. Loss of desmoglein 1 associated with palmoplantar keratoderma, dermatitis and multiple allergies. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):257-61.
117. D'Mello RJ, Caldwell JM, Azouz NP, Wen T, Sherrill JD, Hogan SP, et al. LRRC31 is induced by IL-13 and regulates kallikrein expression and barrier function in the esophageal epithelium. *Mucosal Immunol*. 2016;9(3):744-56.
118. Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD, Annaiah K, Martin LJ, Cianferoni A, et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nature Genetics*. 2010;42(4):289-91.
119. Sleiman PM, Wang ML, Cianferoni A, Aceves S, Gonsalves N, Nadeau K, et al. GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci. *Nat Commun*. 2014;5:5593.
120. Kottyan LC, Davis BP, Sherrill JD, Liu K, Rochman M, Kaufman K, et al. Genome-wide association analysis of eosinophilic esophagitis provides insight into the tissue specificity of this allergic disease. *Nat Genet*. 2014;46(8):895-900.
121. Noti M, Wojno EDT, Kim BS, Siracusa MC, Giacomini PR, Nair MG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nature Medicine*. 2013;19(8):1005-13.
122. Kottyan LC, Maddox A, Braxton JR, Stucke EM, Mukkada V, Putnam PE, et al. Genetic variants at the 16p13 locus confer risk for eosinophilic esophagitis. *Genes Immun*. 2019;20(4):281-92.
123. Kottyan LC, Rothenberg ME. Genetics of eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunol*. 2017;10(3):580-8.
124. Lyles J, Rothenberg M. Role of genetics, environment, and their interactions in the pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Immunol*. 2019;60:46-53.
125. Greisenegger EK, Zimprich F, Zimprich A, Gleiss A, Kopp T. Association of the chromosome 11q13.5 variant with atopic dermatitis in Austrian patients. *Eur J Dermatol*. 2013;23(2):142-5.
126. Ferreira MA, Matheson MC, Duffy DL, Marks GB, Hui J, Le Souëf P, et al. Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. *Lancet*. 2011;378(9795):1006-14.
127. Hinds DA, McMahon G, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, Evans DM, et al. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci. *Nat Genet*. 2013;45(8):907-11.

128. Ferreira MA, Matheson MC, Tang CS, Granell R, Ang W, Hui J, et al. Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(6):1564-71.
129. Martin LJ, He H, Collins MH, Abonia JP, Biagini Myers JM, Eby M, et al. Eosinophilic esophagitis (EoE) genetic susceptibility is mediated by synergistic interactions between EoE-specific and general atopic disease loci. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(5):1690-8.
130. Azouz NP, Ynga-Durand MA, Caldwell JM, Jain A, Rochman M, Fischesser DM, et al. The antiprotease SPINK7 serves as an inhibitory checkpoint for esophageal epithelial inflammatory responses. *Sci Transl Med.* 2018;10(444).
131. Spergel JM, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, Wang ML, Verma R, et al. Identification of causative foods in children with eosinophilic esophagitis treated with an elimination diet. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(2):461-7.e5.
132. Kagalwalla AF, Shah A, Li BU, Sentongo TA, Ritz S, Manuel-Rubio M, et al. Identification of specific foods responsible for inflammation in children with eosinophilic esophagitis successfully treated with empiric elimination diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(2):145-9.
133. Capucilli P, Hill DA. Allergic Comorbidity in Eosinophilic Esophagitis: Mechanistic Relevance and Clinical Implications. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;57(1):111-27.
134. Cianferoni A, Spergel J. Eosinophilic Esophagitis: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;50(2):159-74.
135. González-Cervera J, Arias Á, Redondo-González O, Cano-Mollinedo MM, Terreehorst I, Lucendo AJ. Association between atopic manifestations and eosinophilic esophagitis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;118(5):582-90.e2.
136. Simon D, Marti H, Heer P, Simon HU, Braathen LR, Straumann A. Eosinophilic esophagitis is frequently associated with IgE-mediated allergic airway diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(5):1090-2.
137. Sugnanam KK, Collins JT, Smith PK, Connor F, Lewindon P, Cleghorn G, et al. Dichotomy of food and inhalant allergen sensitization in eosinophilic esophagitis. *Allergy.* 2007;62(11):1257-60.
138. Mahdavinia M, Bishehsari F, Hayat W, Elhassan A, Tobin MC, Ditto AM. Association of eosinophilic esophagitis and food pollen allergy syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;118(1):116-7.
139. Letner D, Farris A, Khalili H, Garber J. Pollen-food allergy syndrome is a common allergic comorbidity in adults with eosinophilic esophagitis. *Dis Esophagus.* 2018;31(2).
140. Hill DA, Grundmeier RW, Ramos M, Spergel JM. Eosinophilic Esophagitis Is a Late Manifestation of the Allergic March. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(5):1528-33.
141. Hill DA, Dudley JW, Spergel JM. The Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in Pediatric Patients with IgE-Mediated Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(2):369-75.
142. Lin SK, Sabharwal G, Ghaffari G. A review of the evidence linking eosinophilic esophagitis and food allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(1):26-33.
143. Ram G, Lee J, Ott M, Brown-Whitehorn TF, Cianferoni A, Shuker M, et al. Seasonal exacerbation of esophageal eosinophilia in children with eosinophilic esophagitis and allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015;115(3):224-8.e1.
144. Capucilli P, Cianferoni A, Grundmeier RW, Spergel JM. Comparison of comorbid diagnoses in children with and without eosinophilic esophagitis in a large population. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;121(6):711-6.
145. Chehade M, Jones SM, Pesek RD, Burks AW, Vickery BP, Wood RA, et al. Phenotypic Characterization of Eosinophilic Esophagitis in a Large Multicenter

- Patient Population from the Consortium for Food Allergy Research. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(5):1534-44.e5.
146. Hill DA, Spergel JM. Is eosinophilic esophagitis a member of the atopic march? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;120(2):113-4.
 147. Hill DA, Spergel JM. The atopic march: Critical evidence and clinical relevance. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;120(2):131-7.
 148. Shoda T, Wen T, Aceves SS, Abonia JP, Atkins D, Bonis PA, et al. Eosinophilic oesophagitis endotype classification by molecular, clinical, and histopathological analyses: a cross-sectional study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3(7):477-88.
 149. Dellon ES, Liacouras CA, Molina-Infante J, Furuta GT, Spergel JM, Zevit N, et al. Updated International Consensus Diagnostic Criteria for Eosinophilic Esophagitis: Proceedings of the AGREE Conference. *Gastroenterology.* 2018;155(4):1022-33.e10.
 150. Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2022;310(20):2191-4.
 151. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):138-47.
 152. Moore JH. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4(6):795-803.
 153. Avila-Castellano R, Garcia-Lozano JR, Cimbollek S, Lucendo AJ, Bozada JM, Quiralte J. Genetic variations in the TLR3 locus are associated with eosinophilic esophagitis. *United European Gastroenterol J.* 2018;6(3):349-57.
 154. O'Shea KM, Aceves SS, Dellon ES, Gupta SK, Spergel JM, Furuta GT, et al. Pathophysiology of Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology.* 2018;154(2):333-45.
 155. Hill DA, Spergel JM. The Immunologic Mechanisms of Eosinophilic Esophagitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(2):9.
 156. Parashette KR, Sarsani VK, Toh E, Janga SC, Nelson DE, Gupta SK. Esophageal Microbiome in Healthy Children and Esophageal Eosinophilia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2022;74(5):e109-e14.
 157. Laserna-Mendieta EJ, FitzGerald JA, Arias-Gonzalez L, Ollala JM, Bernardo D, Claesson MJ, et al. Esophageal microbiome in active eosinophilic esophagitis and changes induced by different therapies. *Sci Rep.* 2021;11(1):7113.
 158. Ryu JH, Yoo JY, Kim MJ, Hwang SG, Ahn KC, Ryu JC, et al. Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):549-61.
 159. Lim DM, Wang ML. Toll-like receptor 3 signaling enables human esophageal epithelial cells to sense endogenous danger signals released by necrotic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):G91-9.
 160. Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, Tsakris A, Routsias JG. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(2):165-77.
 161. Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol.* 2004;172(11):6978-87.
 162. Tesse R, Pandey RC, Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. *Allergy.* 2011;66(3):307-16.
 163. Thomas WR. Molecular mimicry as the key to the dominance of the house dust mite allergen Der p 2. *Expert Rev Clin Immunol.* 2009;5(3):233-7.
 164. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature.* 2009;457(7229):585-8.

165. Novak N, Bieber T, Peng WM. The immunoglobulin E-Toll-like receptor network. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(1):1-7.
166. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, et al. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(3):368-74.
167. Turcot V, Bouchard L, Faucher G, Garneau V, Tchernof A, Deshaies Y, et al. Thymic stromal lymphopoietin: an immune cytokine gene associated with the metabolic syndrome and blood pressure in severe obesity. *Clin Sci (Lond).* 2012;123(2):99-109.
168. Menzies-Gow A, Corren J, Bourdin A, Chupp G, Israel E, Wechsler ME, et al. Tezepelumab in Adults and Adolescents with Severe, Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med.* 2021;384(19):1800-9.
169. Peters MC, Wenzel SE. Intersection of biology and therapeutics: type 2 targeted therapeutics for adult asthma. *Lancet.* 2020;395(10221):371-83.
170. Porsbjerg CM, Sverrild A, Lloyd CM, Menzies-Gow AN, Bel EH. Anti-alarmins in asthma: targeting the airway epithelium with next-generation biologics. *Eur Respir J.* 2020;56(5).
171. Politi E, Angelakopoulou A, Grapsa D, et al. Filaggrin and Periostin Expression Is Altered in Eosinophilic Esophagitis and Normalized With Treatment. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 2017;65(1): 47-52.
172. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K, Caldwell JM, Collins MH, Ahrens A, et al. Coordinate Interaction between IL-13 and Epithelial Differentiation Cluster Genes in Eosinophilic Esophagitis. 2010.
173. Lingblom C, Wallander J, Ingelsten M, Bergquist H, Bove M, Saalman R, et al. Eosinophils from eosinophilic oesophagitis patients have T cell suppressive capacity and express FOXP3. *Clin Exp Immunol.* 2017;187(3):455-65.
174. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):227-35; quiz 36-7.
175. Tantibhaedhyangkul U, Tatevian N, Gilger MA, Major AM, Davis CM. Increased esophageal regulatory T cells and eosinophil characteristics in children with eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(2):99-107.
176. Sadlon TJ, Wilkinson BG, Pederson S, Brown CY, Bresatz S, Gargett T, et al. Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(2):1071-81.

Anexos

Relación de anexos:

Anexo I. Informe Comité de Ética de la Investigación Clínica del HUVR, el 9 de abril de 2012 con el código de registro 2012PI/079.

Anexo II. Consentimiento comité biobanco.

Anexo III. Panel de 17 aeroalérgenos y 22 alimentos de origen animal y vegetal.

Anexo IV. Producción científica del doctorando en relación con el tema de investigación.

Anexo I. Informe Comité de Ética de la Investigación Clínica del HUVR, el 9 de abril de 2012 con el código de registro 2012PI/079.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

**INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U.
VIRGEN DEL ROCIO**

El Comité de Ética de la Investigación de centro H.U. Virgen del Rocio de Sevilla, reunido en la Sesión celebrada el día veintiocho de marzo de dos mil doce y según consta en el acta 03/12, ha valorado el estudio presentado por el **Dr. D. Joaquin Quiralte Enriquez**, titulado:

2012PI/079 "La alergia a alimentos en la esofagitis eosinofílica: diseñando un tratamiento eficaz a través del estudio de biomarcadores de actividad clínica, inflamatorios y genéticos".

Cód. 010470

Se emite **INFORME FAVORABLE**

En Sevilla, a nueve de abril de dos mil doce



Fdo.: Javier Bautista Paloma
Presidente

Hospital Universitario VIRGEN DEL ROCIO
AVDA. MANUEL SIUROT S/N - 41013 - SEVILLA

Anexo II. Consentimiento comité biobanco



Consentimiento informado para la donación de muestras biológicas y/o autorización de acceso a datos para un proyecto específico gestionado por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía y uso posterior del sobrante de muestras en otros proyectos.

DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

Apellidos y nombre del/de la Donante:

.....

DNI / NIE:

Apellidos y nombre del/de la representante legal (cuando proceda):

.....

DNI / NIE:

PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas:

Apellidos y nombre

.....

DNI / NIE:

CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. declaro que **he leído y comprendido el documento informativo**, que acompaña a este consentimiento y del que se me ha entregado un ejemplar.

He recibido suficiente información sobre el estudio
..... (Título del proyecto)

y sobre el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía que podrá entregar las muestras y datos para otros proyectos relacionados con la misma línea o área de investigación garantizando siempre el cumplimiento de la legislación vigente.

(Indicar Línea/Área Investigación según capítulos CIE-10):

--

Usted autoriza a que las muestras y datos sobrantes puedan ser cedidas también a proyectos de las siguientes áreas o líneas de investigación:

- Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (A00-B99)
- Neoplasias (C00-D49)
- Enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos y ciertos trastornos que afectan al mecanismo inmunológico (D50-D89)
- Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas (E00-E89)
- Trastornos mentales, del comportamiento y del desarrollo neurológico (F01-F99)

Ejemplar para Biobanco

- Enfermedades del sistema nervioso (G00-G99)
- Enfermedades del ojo y sus anexos (H00-H59)
- Enfermedades del oído y de la apófisis mastoides (H60-H95)
- Enfermedades del aparato circulatorio (I00-I99)
- Enfermedades del aparato respiratorio (J00-J99)
- Enfermedades del aparato digestivo (K00-K95)
- Enfermedades de la piel y del tejido subcutáneo (L00-L99)
- Enfermedades del aparato musculoesquelético y del tejido conectivo (M00-M99)
- Enfermedades del aparato genitourinario (N00-N99)
- Embarazo, parto y puerperio (O00-O9A)
- Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal (P00-P96)
- Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas (Q00-Q99)
- Lesiones traumáticas, envenenamientos y otras consecuencias de causas externas (S00-T88)

Así mismo, consiente que las muestras puedan ser utilizadas para otros fines:

- Docencia
- Control de calidad

He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados se incorporen en el Biobanco de forma:

- Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o
- Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente** (siempre que no se trate de muestras anonimizadas):

- SI
- NO

En caso afirmativo, por favor, indique los medios para hacerlo:

Teléfono: *(indicar número)*.....
 Correo electrónico: *(indicar dirección)*.....
 Otros: *(identificar)*.....

Ejemplar para Biobanco

Autorizo a **recibir información** sobre datos genéticos y/o datos relevantes para mi salud (si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda:

- SI
 NO

Comprendo que puedo retirarme del estudio o retirar las muestras del Biobanco del SSPA:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad a participar en el proyecto informado y al tratamiento de mis muestras y datos en los términos informados.

En _____, a _____ de _____ de _____

EL/LA DONANTE	EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (sólo en caso de incapacidad del/de la donante)
Fdo.:	Fdo.:

PROFESIONAL QUE INFORMA
Fdo.:

Ejemplar para Biobanco

Anexo III. Panel de 17 aeroalérgenos y 22 alimentos de origen animal y vegetal.

1. Panel de alergenitos inhalantes:

Ácaros:

- D. Pteronyssinus
- Glyciphagus

Hongos:

- Alternaria alternata
- Aspergillus

Epitelio de animales:

- Perro
- Gato
- Caballo

Pólenes:

- Olea europea
- Phleum
- Cupressaceas
- Platanus acerifolia
- Artemisia
- Salsola Kali
- Parietaria juadaica
- Prup p 3 (melocotón)

Anisakis

Látex

2. Panel de alimentos de origen animal y vegetal:

A Animal	A. Vegetal	Harinas
Leche	Melón	Avena
Huevo clara	Nuez	Centeno
Huevo yema	Cacahuete	Trigo
Gamba	Lentejas	Maíz
Almeja	Tomate	Arroz
Calamar	Kiwi	Cebada
Bacalao	Melocotón piel	Soja
Merluza		

Anexo IV. Producción científica del doctorando en relación con el tema de investigación.

Artículos publicados:

1. Ávila-Castellano R, García-Lozano JR, Cimbollek S, Lucendo AJ, Bozada JM, Quiralte J. **Genetic variations in the TLR3 locus are associated with eosinophilic esophagitis.** *United European Gastroenterol J.* 2018;6(3):349-357. doi:10.1177/2050640617732643
2. Ávila Castellano Robledo, Stefan Cimbollek, Joaquin Quiralte. Defining the role of food allergy in a populations of adults patients with Eosinophilic Esophagitis. **Inflammations & Allergy- Drug Targets**, 2010; vol9: nº 3.
3. Elisa Gómez Torrijo, Charo González Mendoliola, Manuela Alvarado, Robledo Ávila, Alicia Prieto García, Teresa Balbuena et al. Eosinophilic esophagitis:review and Update. *Frontiers in medicine.* October 2018. Vol 5 Article 247.

Comunicaciones a congresos internacionales:

1. Genetics variants in the TLR3 locus are associated with eosinophilic esophagitis in Spanish population. EAACI Congress 1-5 Junio 2019. Lisboa. (Portugal). Sociedad Europea de Alergología e Inmunología clínica.
2. Genetics variants in the TLSP locus here associated with eosinophilic esophagitis in Spanish population. EAACI Congress 1-5 Junio 2019. Lisboa. (Portugal). Sociedad Europea de Alergología e Inmunología clínica.
3. Clinical food allergy phenotypes in a population patients with eosinophilic esophagitis. XXIX Congress of the European Academy of

Allergy and clinical Immunology. Londres. Reino Unido, 5-9 Junio 2010.

Comunicaciones a congresos nacionales:

1. Estudio De Polimorfismos Genéticos Asociados a la Esofagitis Eosinofílica. Simposium internacional avances y perspectivas en alergia cutánea. SEAIC. Maspalomas 23-26 Octubre de 2019.
2. Tratamiento dietético en Esofagitis eosinofílica: estudio observacional retrospectivo. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Valencia, 24 al 27 de octubre de 2018
3. Fenotipos clínica de alergia alimentaria en una población de pacientes adultos con esofagitis eosinofílica. XVII Congreso de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología clínica. Madrid 10-13 de Noviembre, 2010.

Comunicaciones a congresos regionales:

1. Patrón de sensibilización a alimentos en 14 pacientes con Esofagitis Eosinofílica. XXXVIII Reunión Alergosur. 21,22 y 23 de Mayo de 2009.

Ponencias en congresos nacionales:

1. De ámbito nacional: (3)

- Esofagitis eosinofílica: diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Simposio Internacional de Alergia Alimentaria. 100 años de Inmunoterapia. Barcelona 10-12 Noviembre 2011. 1 hora.
- Enteropatías eosinofílicas: punto de vista alergológico. XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Salamanca. 22 a 25 de Octubre de 2014. 1 hora.
- Dietas en Esofagitis Esosinofílica. Jornadas de la Cloenda de la Societat Catalana d'Àl·lèrgia i Inmunologia Clínica. Barcelona 29 de Mayo de 2015. 1 hora.

2. De ámbito regional: (1)

- Ponencia Alergia Alimentaria. Manejo del paciente con esofagitis eosinofílica. Experiencia de diferentes protocolos de tratamiento. Reunión XLVIII Alergosur. Jaén 20-22 de Junio 2019. Sevilla.

Premios y becas recibidos por el doctorando en relación al tema de investigación:

- Premio de la Convocatoria de Becas de la Fundación Alergosur 2015, otorgado durante la celebración de la XLIV Reunión Alergosur. 28-30 de Mayo 2015. Granada.
Título del proyecto: Estudio de expresión de marcadores inflamatorios en biopsias de pacientes con EoE dependiente de alimentos pre y post intervención dietética.
- Premio de la Convocatoria de Becas de la Fundación Alergosur 2013, otorgado durante la celebración de la XLII Reunión Alergosur, 31-1 Junio

de 2013. Zahara de los Atunes. Título del proyecto: La alergia a alimentos en la Esofagitis Eosinofílica: diseñando un tratamiento eficaz a través de biomarcadores de actividad clínica, inflamatorios y genéticos.

- Premio a la mejor comunicación oral: Patrón de sensibilización a alimentos en 14 pacientes con Esofagitis Eosinofílica. XXXVIII Reunión Alergosur. Jaén 21,22 y 23 de Mayo de 2009.

Genetic variations in the *TLR3* locus are associated with eosinophilic esophagitis

Robledo Ávila-Castellano¹, José-Raúl García-Lozano², Stefan Cimbollek¹, Alfredo J Lucendo^{3,4}, Juan-Manuel Bozada⁵ and Joaquín Quirarte¹

Abstract

Background: Eosinophilic esophagitis (EoE) is an antigen-driven disease mediated by an abnormal immune Th2 response. **Objective:** The objective of this article is to investigate genes associated with regulating immune responses leading to disease susceptibility.

Methods: Twenty-seven tag single nucleotide polymorphisms (tSNPs) selected in five candidate genes (*TLR3*, *TLR4*, *FOXP3*, *FLG* and *TSLP*) were genotyped in 218 EoE patients and 376 controls. Skin prick tests were carried out in EoE patients with a panel of 17 aeroallergens and 22 plant- and animal-derived foods.

Results: Five tSNPs located in the *TSLP* locus and one tSNP located in the *TLR3* locus were significantly associated with EoE. The interactions between *TLR3* and *TSLP* loci were analyzed. *TLR3*+/*TSLP*- and *TLR3*-/*TSLP*+ individuals showed a significantly reduced susceptibility to EoE compared to *TLR3*-/*TSLP*- individuals (OR = 0.66, $p = 0.036$ and OR = 0.23, $p = 0.00014$, respectively). Likewise, *TLR3*+/*TSLP*+ individuals showed the most decreased susceptibility of developing EoE (OR = 0.16, $p = 0.0001$). However, the interaction gain attributed to the combination of both genes was negative (IG = -4.52%), which indicated redundancy or independent effect. Additionally, *TLR3* locus was found to be associated with aeroallergen and food sensitization in EoE patients (OR = 9.67, $p_c = 0.025$ and OR = 0.53, $p_c = 0.048$, respectively).

Conclusion: *TLR3* constitutes a novel genetic susceptibility locus for developing EoE, and the effects would be independent of *TSLP*.

Keywords

Eosinophilic esophagitis, genetic susceptibility, thymic stromal lymphopoietin, Toll-like receptor, single nucleotide polymorphism

Received: 15 June 2017; accepted: 23 August 2017

Key summary

Summary of established knowledge on this subject

1. Eosinophilic esophagitis (EoE) results from an abnormal immune response to food and airborne allergens, which are characterized by a predominantly Th2-type inflammatory response.
2. Thymic stromal lymphopoietin (*TSLP*) has been identified as a major candidate gene involved in the pathogenesis of the disease.
3. Primary esophageal epithelial cells express *TSLP* in response to Toll-like receptor 3 (*TLR3*) signaling.

¹Division of Allergy, UGC Intercentros, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

²Servicio de Inmunología, Unidad de Gestión Clínica "Laboratorios Clínicos," Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

³Department of Gastroenterology, Hospital General de Tomelloso, Tomelloso, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid, Spain

⁵Division of Gastroenterology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

Corresponding author:

José-Raúl García-Lozano, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013-Sevilla, Spain.
Email: jraul.garcia.sspa@juntadeandalucia.es

What are the significant and/or new findings of this study?

1. We have replicated the association of the *TSLP* gene with EoE.
2. This study describes the *TLR3* gene as a novel genetic susceptibility locus for developing EoE for the first time.
3. The *TLR3* gene was found to be associated with aeroallergen and food sensitization in EoE patients.
4. Our results suggest that there is a non-synergic effect between *TSLP* and *TLR3* genes, which suggests that the interaction of both genes have redundancy or independent effects.

Introduction

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory condition that is clinically characterized by symptoms of esophageal dysfunction and histologically characterized by eosinophil-predominant inflammation.¹ The current annual incidence of EoE is estimated to be 7.2 new cases per 100,000 people, and the prevalence in males is approximately 2.5-fold higher than in females.² EoE results from an abnormal immune response to food and airborne allergens, and most patients with EoE also exhibit several atopic diatheses, including allergic rhinitis, bronchial asthma and eczema, which are the most common.³ EoE patients also have a high rate of immunoglobulin (Ig)E-mediated food allergy, which is estimated to be 10 times higher compared to the general population, which suggests that the pathogenesis of EoE and atopy involve common processes^{4,5} characterized by a predominantly T helper 2 (Th2)-type inflammatory response.⁶ EoE today represents one of the most relevant topics in gastroenterology and allergology, but after 20 years of research on the causes of this disorder, a full explanation of the pathophysiology of EoE has yet to be determined. The familiar associations of cases reveal common genetic predispositions that underlie the increased concordance of EoE in monozygotic (58%) and dizygotic twins (36%) compared to siblings (2.4%).⁷ Research on candidate-gene identification and genome-wide association studies (GWAS) have identified multiple genes that are likely contributing to the development of EoE,⁸⁻¹⁰ among which thymic stromal lymphopoietin (*TSLP*) has a predominant position.¹¹ *TSLP* is a cytokine produced by esophageal epithelial cells, which acts by driving dendritic cells (DCs) toward a Th2 response and constitutes an essential link between epithelial cell activation and allergic inflammation.¹² The eosinophilic infiltration of EoE can therefore be considered the consequence of Th2-type inflammation driven by *TSLP* secreted by esophageal epithelial cells, which appears under the influence of a genetic predisposition.^{10,11} In addition to *TSLP*, calpain 14 (*CAPN14*), *EMSY*, *LRR32*, *STAT6*, *ANKRD27* and *CCL26* are known to play relevant roles in the origin of EoE.¹³

However, the same studies of a familiar association and others assessing the effects of early life exposures

on the risk of EoE also demonstrate the substantial influence that the environment (including exposure to dust mites and microorganisms, foods consumed, antibiotic use and even the esophageal microbiota)¹⁴ has through epigenetic mechanisms. Changes in the esophageal microbiota linked to EoE are arising as a novel but potentially essential causative factor in triggering and maintaining EoE¹⁵ with Toll-like receptors (TLRs) as the interaction point between bacteria and mucosal immunity. In fact, the activation and maturation of antigen-presenting cells (APCs) and regulatory T cells (Tregs) depend on TLR-mediated signaling. TLRs are transmembrane pattern recognition receptors located in intestinal epithelial cells and basal lamina that respond to microbial signals and distinguish different types of pathogens from commensal bacteria.¹⁶ Increasing evidence points toward a relevant role for genetic polymorphisms affecting TLR function in inappropriate inflammatory responses.¹⁶ *TLR2*, 4, 6, 7, 8 and 9 are significantly associated with allergic asthma and atopy,^{17,18} and *TLR4*-dependent signals provided by the intestinal commensal flora inhibit the development of allergic responses to food antigens;^{18,19} *TLR3* can signal inflammatory responses in human epithelial cells.^{20,21} Preliminary results have documented changes in the expression levels of several TLRs that reverse after effective dietary therapy.²²

An impairment of immune homeostasis maintained by CD4+CD25+FOXP3+Tregs, which is a subtype of T cell that expresses the interleukin (IL)-2 receptor alpha chain (CD25) and the transcriptional regulator forkhead box P3 (FOXP3) protein, also arises as potentially involved in EoE. Tregs are important components in the immunoregulatory suppression of T cell proliferation and function, which directly or indirectly suppresses effector cells in allergic inflammation, including eosinophils.^{23,24} Tregs cells are significantly increased in the esophageal tissue of EoE patients, which suggests that a negative feedback mechanism exists to regulate an inflammatory response triggered by external stimuli or allergen exposure.²⁵ In this sense, *TLR4* is associated with the amplification of the suppressive function of Tregs and may influence allergic responses to food antigens.¹⁸

On the other hand, polymorphisms in epithelium-specific genes have also been associated with EoE

susceptibility. A loss of function caused by a single nucleotide polymorphism (SNP) in the filaggrin gene (*FLG*) (2282del14) is associated with EoE independent of the atopic status of the patient.²⁶ IL-13, which is a Th2-type cytokine that is over-expressed in esophageal epithelial cells from EoE patients, strongly decreases *FLG* expression.^{26,27}

With this background, our research aims to analyze the role of genes associated in regulating immune responses of patients with EoE. First, we will evaluate whether the *TSLP* loci are associated with a risk for developing EoE in a Spanish Caucasian population. Second, possible associations between *TLR3*, *TLR4*, *FOXP3*, and *FLG* and susceptibility of presenting EoE will be studied.

Patients and methods

Patients

A total of 218 adult patients with EoE (170 males; mean age at diagnosis 35.4 years) and 376 healthy ethnically matched bone marrow donors were selected for this study. To avoid the confounding effects of the genetic associations investigated with other conditions, EoE patients who had other autoimmune conditions (i.e. celiac disease, diabetes mellitus and thyroid disorders) were excluded. All patients and controls were unrelated Spanish Caucasian individuals who were recruited at two Spanish hospitals: Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) and Hospital General de Tomelloso (Ciudad Real). This study was approved by the Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, on April 9, 2012 (Code 2012PI/079). The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a prior approval by the institutions' human research committee. Informed consent for the procedures was obtained from all patients included in the study.

Participants were diagnosed as having EoE if they met the following accepted criteria:²⁸ (i) symptoms related to esophageal dysfunction, (ii) one or more mucosal biopsies that demonstrated at least 15 eosinophils per high-powered field (hpf), (iii) persistence of eosinophilic infiltration after an eight-week trial with a proton-pump inhibitor drug at double doses, and (iv) exclusion of other potential causes of esophageal eosinophilia.

Allergic sensitization tests

To evaluate allergic comorbidities, skin prick tests (SPTs) were carried out in every EoE patient by using standard methods²⁹ with a panel of 17 commonly

distributed aeroallergens (including mites, molds, pollen and animal dander) and 22 plant- and animal-derived food antigens (milk, egg, shrimp, squid, clam, cod fish, chicken meat, walnut, peanut, pepper, tomato, potato, onion, soy, lentil, carrot, peach, kiwi, melon, banana, wheat and rice). SPTs were performed at the flexor surface of the forearm with reactions read out after 15 to 20 minutes. SPTs were positive if the mean wheal diameter was ≥ 3 mm over the negative control. Saline solution and histamine solution were respectively used as negative and positive controls. Sensitization to airborne or food allergens was considered as a dichotomous variable and was exclusively based on the positivity or negativity of skin allergy testing.

SNP selection and genotyping

Genomic DNA was extracted from blood leukocytes using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations and stored at -20°C .

Five candidate genes previously identified as relevant for EoE pathophysiology were selected based on their function in innate host defense: *TLR3*, *TLR4*, *FOXP3*, *FLG* and *TSLP*. Tag single nucleotide polymorphisms (tSNPs) were selected across each locus from the designated set of common SNPs genotyped in the Central European-like Utahns (CEU) population (HapMap Project, Release 28, Phase II+III, National Center for Biotechnology Information (NCBI) build 36 assembly, dbSNP b126; <http://www.hapmap.org>). The tSNPs selection was performed with pairwise $r^2 \geq 0.80$ and minor allele frequency (MAF) ≥ 0.05 using the Haploview v4.0 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/download.php>).³⁰ According to the above rules, 27 tSNPs that permitted us to capture 52 SNPs were selected (Table 1). Genotyping was performed using TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) in a LightCycler 480 (Roche, Barcelona, Spain). To verify inter-experimental reproducibility and accuracy, 8% of the samples were duplicated. A 90% sample quality control rate and 90% SNP genotyping success rate was imposed on the analysis.

Statistical analyses

Allele frequency distributions were compared using the χ^2 test, and a corrected p value (p_c) was calculated from 10,000 permutations (Haploview program). Genotypes of each SNP were assessed according to dominant (AA vs. AB+BB (A, major allele; B, minor allele)) or recessive (AA+AB vs. BB) models. The odds ratios (ORs) with their corresponding 95% confidence intervals (95% CIs) and logistic regression were calculated

Table 1. Tag SNPs included in this study.

Gene	CHR	Tag SNPs	SNPs captured
TLR3	4	rs5743303	rs5743303, rs5743312, rs3775296
		rs5743305	rs5743305
		rs11721827	rs11721827, rs11730143, rs11732384
		rs7657186	rs7657186, rs13108688
		rs13126816	rs13126816, rs6552950
		rs7668666	rs7668666
		rs3775292	rs3775292
		rs3775291	rs3775291
TLR4	9	rs1927914	rs1927914, rs2149356, rs1927911
		rs10759932	rs1927907, rs10759932, rs5030717
		rs5030728	rs5030728, rs2770146
		rs12377632	rs12377632
		rs11536889	rs11536889
		rs7873784	rs7873784
FLG	1	rs2065956	rs7522925, rs2065956, rs12407748
		rs2065958	rs2065958
		rs11582620	rs11582620
		rs11204981	rs2184953, rs11204981, rs3126066, rs11584340, rs3120659, rs11204980, rs6587666
		rs11586114	rs11586114, rs11204978, rs2065955
		rs2280883	rs3761548, rs2280883
FOXP3	X	rs3761549	rs3761549, rs3761547
		rs2289276	rs11466741, rs2289276
TSLP	5	rs1898671	rs1898671
		rs10062929	rs11466750, rs10062929
		rs2289277	rs2289277
		rs2289278	rs2289278
		rs11466749	rs11466749

CHR: chromosome; SNP: single-nucleotide polymorphism; TLR: Toll-like receptor; FLG: filaggrin gene; FOXP3: forkhead box P3; TSLP: thymic stromal lymphopoietin.

using OpenEpi v3.01 software online (<http://www.openepi.com>). *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Gene-gene interactions were evaluated using the non-parametric multifactor dimensionality reduction (MDR) method.^{31,32} To interpret combination effects, an entropy-based analysis was used. Interaction entropy uses information gain to gauge whether interactions between two (or more) variables that were considered independent exist.³³ Entropy is estimated for

each individual attribute (i.e. main effects) and each pair-wise combination of attributes (i.e. interaction effects). Therefore, the main effects of each factor can be compared to the interaction effect to determine whether interactions are additive or non-additive. There is evidence for a synergistic interaction when a positive value is obtained combining two (or more) variables. Conversely, there are redundancy or independent effects when a negative value is obtained by loss of information.³³

Results

Aeroallergen and food sensitization, as estimated by a positive SPT result, were found in 72.22% and 61.46% of the whole series of 218 patients with EoE, respectively. The successful rate of genotyping was >98% for all SNPs included, and genotypes were unequivocally assigned for all the cases except in 11 controls. The study population was found to be in the Hardy-Weinberg equilibrium for all the polymorphisms that were analyzed (*p* > 0.05).

No statistically significant differences were found between EoE patients and control individuals in the distribution of the allelic frequencies of any of the SNPs of *TLR4*, *FOXP3* and *FLG* loci (data not shown). However, five tSNPs located in the *TSLP* locus and one tSNP located in the *TLR3* locus were significantly associated with EoE (Table 2). Since the prevalence of EoE in males is higher than in females, a gender-stratified analysis of EoE patients and controls was carried out to determine whether *TSLP* and *TLR3* variants contribute to this gender bias (Table 3). Significant differences remained unchanged between patients and controls in the male group, and only the rs2289276 polymorphism in the *TSLP* gene was not associated after *p* correction (*p* = 0.013 and *p_c* = 0.065). Regarding female patients, no significant differences in the distribution of alleles were found, and the trend in the distribution was similar to the one observed in the male group. The *TSLP* gene polymorphism rs10062929 was found to be associated before *p* correction (*p* = 0.016).

To further clarify whether the contribution of *TSLP* and *TLR3* loci to EoE susceptibility detected in univariate analyses might have synergistic effects, a logistic regression test was performed to analyze interactions between the two polymorphisms with the highest statistical significance (rs3775292 of the *TLR3* locus and rs10062929 of the *TSLP* gene). In both polymorphisms, statistically significant differences were observed between patients and controls in a dominant model (Table 4). Therefore, patients and controls carrying a C allele (CG or CC) in rs3775292 were classified as TLR3+. Similarly, individuals carrying the A allele

Table 2. Minor allele frequencies of the SNPs studied in the *TSLP* and *TLR3* genes in EoE patients and healthy controls.

Gene SNP	MA	Controls (n = 365)	Patients (n = 218)	p	p _c	OR (95% CI)
TSLP						
rs2289276	T	0.309	0.233	0.0078	0.0429	0.68 (0.51–0.90)
rs1898671	T	0.389	0.484	0.0023	0.0142	1.47 (1.14–1.89)
rs10062929	A	0.123	0.036	6.18E-06	1.0E-05	0.68 (0.51–0.90)
rs2289277	G	0.432	0.298	1.71E-05	1.0E-04	0.67 (0.51–0.90)
rs2289278	G	0.046	0.045	0.941	NS	
rs11466749	G	0.135	0.071	0.0018	0.0106	0.68 (0.51–0.90)
TLR3						
rs5743303	T	0.192	0.210	0.5072	NS	
rs5743305	A	0.415	0.344	0.0172	0.0584	
rs11721827	C	0.082	0.077	0.7728	NS	
rs7657186	A	0.251	0.194	0.0247	NS	
rs13126816	A	0.246	0.305	0.0298	NS	
rs7668666	A	0.276	0.273	0.9166	NS	
rs3775292	C	0.271	0.196	0.0039	0.0288	0.65 (0.49–0.87)
rs3775291	T	0.309	0.334	0.3732	NS	

SNP: single-nucleotide polymorphism; MA: minor allele; EoE: eosinophilic esophagitis; TSLP: thymic stromal lymphopoietin; TLR3: Toll-like receptor 3; OR (95% CI): odds ratio with 95% confidence interval; NS: not significant $p > 0.05$. p_c: corrected p value, 10,000-fold permutation testing.

Table 3. Distribution of allelic frequencies of the SNPs studied in the *TSLP* and *TLR3* genes after stratification by gender.

Gene SNP	MA	Males				Females					
		Controls (n = 174)	Patients (n = 170)	p	p _c	OR (95% CI)	Controls (n = 191)	Patients (n = 48)	p	p _c	OR (95% CI)
TSLP											
rs2289276	T	0.318	0.229	0.013	0.0654		0.299	0.244	0.3079	NS	
rs1898671	T	0.366	0.493	0.0013	0.0063	1.68 (1.22–2.31)	0.397	0.453	0.3395	NS	
rs10062929	A	0.132	0.038	7.66E-05	0.0003	0.26 (0.12–0.53)	0.113	0.027	0.0167	0.0807	0.20 (0.04–0.85)
rs2289277	G	0.443	0.287	6.13E-05	0.0003	0.26 (0.12–0.53)	0.425	0.333	0.1219	NS	
rs2289278	G	0.042	0.054	0.4625	NS		0.053	0.013	0.1287	NS	
rs11466749	G	0.145	0.065	0.0016	0.0084	0.26 (0.12–0.53)	0.128	0.090	0.3429	NS	
TLR3											
rs5743303	T	0.200	0.216	0.6372	NS		0.175	0.188	0.7914	NS	
rs5743305	A	0.426	0.348	0.0353	NS		0.410	0.330	0.1562	NS	
rs11721827	C	0.066	0.078	0.5152	NS		0.084	0.073	0.5176	NS	
rs7657186	A	0.253	0.189	0.0456	NS		0.250	0.208	0.3951	NS	
rs13126816	A	0.233	0.291	0.0908	NS		0.264	0.356	0.0870	NS	
rs7668666	A	0.280	0.288	0.8200	NS		0.263	0.219	0.3700	NS	
rs3775292	C	0.284	0.190	0.0036	0.0282	0.59 (0.41–0.84)	0.258	0.218	0.4277	NS	
rs3775291	T	0.286	0.323	0.2899	NS		0.333	0.375	0.4429	NS	

SNP: single-nucleotide polymorphism; MA: minor allele; TSLP: thymic stromal lymphopoietin; TLR3: Toll-like receptor 3; OR (95% CI): odds ratio with 95% confidence interval; NS: not significant $p > 0.05$.

p_c: corrected p value, 10,000-fold permutation testing.

Table 4. Distribution of genotypes of the SNP rs3775292 (*TLR3*) and rs10062929 (*TSLP*) and dominant and recessive models.

	Controls	EoE patients	Dominant model		Recessive model	
			<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)
<i>TLR3</i> _rs3775292						
CC	28	9	0.0042	0.60 (0.42–0.85)	0.09	0.52 (0.22–1.10)
CG	144	67				
GG	193	142				
<i>TSLP</i> _rs10062929						
AA	6	2	1.1E-6	0.23 (0.11–0.44)	0.36	0.36 (0.01–2.46)
AC	78	13				
CC	276	203				

Model dominant: CC+CG vs GG (*TLR3*) and AA+AC vs CC (*TSLP*).

Model recessive: CC vs CG+GG (*TLR3*) and AA vs AC+CC (*TSLP*).

SNP: single-nucleotide polymorphism; EoE: eosinophilic esophagitis; *TLR3*: Toll-like receptor 3; *TSLP*: thymic stromal lymphopoietin; OR (95% CI): odds ratio with 95% confidence interval.

Table 5. Frequencies of combinations of rs3775292 (*TLR3*) and rs10062929 (*TSLP*) in EoE patients and controls.

	<i>TLR3</i> -/ <i>TSLP</i> -	<i>TLR3</i> +/ <i>TSLP</i> -	<i>TLR3</i> -/ <i>TSLP</i> +	<i>TLR3</i> +/ <i>TSLP</i> +
Patients (<i>n</i> = 218)	127 (58.25%)	77 (35.33%)	9 (4.13%)	5 (2.29%)
Controls (<i>n</i> = 360)	145 (40.27%)	132 (36.65%)	46 (12.77%)	37 (10.27%)
OR (95% CI)	1	0.66 (0.44–0.96)	0.23 (0.10–0.53)	0.16 (0.05–0.47)
<i>p</i>	<0.0001	0.036	0.00014	0.00010

OR (95% CI) and *p* values were calculated using logistic regression.

EoE: eosinophilic esophagitis; *TLR3*: Toll-like receptor 3; *TSLP*: thymic stromal lymphopoietin; OR (95% CI): odds ratio with 95% confidence interval.

(AA or AC) in rs10062929 were classified as *TSLP*+. Individuals with 0 copies of both SNPs alleles (*TLR3*-/*TSLP*-) were used as a reference group. A statistically significant lower susceptibility to EoE was found in individuals carrying *TLR3*+/*TSLP*- and *TLR3*-/*TSLP*+ compared to individuals carrying the *TLR3*-/*TSLP*- genotype with OR = 0.66 (*p* = 0.036) and 0.23 (*p* = 0.00014), respectively. Furthermore, the susceptibility to EoE was reduced substantially among individuals carrying *TLR3*+/*TSLP*+ with an OR = 0.16 (*p* = 0.0001) (Table 5). To complement logistic regression analyses, MDR software was used to further evaluate gene-gene interactions. For analyzing whether the observed interaction between both attributes, *TLR3* and *TSLP*, had or did not have a synergistic effect, we found a negative interaction gain value (IG = -4.52%) (Table 6). This negative value occurred because the percentage of entropy removed by the interaction of both *TLR3* and *TSLP* was 3.36% less than the sum of the percentage of entropy removed by each attribute (0.78% and 7.09%, respectively). This result suggests that the interaction of both genes had redundancy or independent effects.

Finally, the possible associations between *TSLP* and *TLR3* gene polymorphisms and the allergic phenotype of EoE patients was investigated. Case-only phenotype analyses of patients with EoE revealed no association between *TSLP* and sensitization to food or inhalant allergens. In contrast, two SNPs in the *TLR3* locus, rs11721827 and rs5743303, were found to be associated with sensitization to aeroallergens and food, respectively. The frequency of the rs11721827C allele was significantly higher among EoE patients sensitized to aeroallergens (9.4% vs. 1.1% in non-sensitized patients, *p*_c = 0.025, OR = 9.67). In contrast, the frequency of the rs5743303T allele was lower among patients with EoE who were sensitized to food (17.5 vs. 28.5%; *p*_c = 0.048) with an OR of 0.53 (Table 7).

Discussion

This study describes the *TLR3* gene as a novel genetic susceptibility locus for developing EoE for the first time. Additionally, we have replicated the association of the *TSLP* gene with EoE described in an American

Table 6. Information gain estimated for each individual locus and combination of both loci.

Attributes	Information gain by each locus						Information gain by combination of both loci			Interaction gain
	H (A)	H (A C)	H (B)	H (B C)	I (A; C)	I (B; C)	H (AB)	H (AB C)	I (AB;C)	
<i>TLR3</i>	1.2493	1.2414			0.0078 (0.78%)					
<i>TSLP</i>			0.9629	0.892		0.0709 (7.09%)				
<i>TLR3/TSLP</i>							0.9987	0.9651	0.0336 (3.36%)	-0.0452 (-4.52%)

H (A), H (B), H (AB): entropy attributed to *TLR3* and *TSLP* individually and the combination of both loci.

H (A|C), H (B|C), H (AB|C): conditional entropy attributed to *TLR3* and *TSLP* individually and the combination of both loci.

I (A; C) = H (A) - H (A|C): information gain (percentage of entropy removed) by *TLR3* attribute (main effect).

I (B; C) = H (B) - H (B|C): information gain (percentage of entropy removed) by *TSLP* attribute (main effect).

I (AB; C) = H (AB) - H (AB|C): information gain (percentage of entropy removed) by the combination of both attributes (interaction effect).

IG (A; B; C) = I (A; C) + I (B; C) - I (AB; C): interaction gain by the combination of both attributes.

TLR3: Toll-like receptor 3; *TSLP*: thymic stromal lymphopoietin.

Table 7. Minor allele frequencies of the SNPs studied in the *TLR3* gene in EoE patients.

<i>TLR3</i> SNP	MA	Aeroallergens				OR (95% CI)	Food allergy				OR (95% CI)
		Negatives (n = 54)	Positives (n = 164)	p	p _c		Negatives (n = 84)	Positives (n = 134)	p	p _c	
rs5743303	T	0.255	0.199	0.2521	NS		0.285	0.175	0.014	0.048	0.53 (0.32-0.88)
rs5743305	A	0.362	0.351	0.8575	NS		0.331	0.367	0.4906	NS	
rs11721827	C	0.011	0.094	0.0071	0.0255	9.67 (1.29-72.28)	0.038	0.092	0.0603	NS	
rs7657186	A	0.196	0.204	0.8569	NS		0.190	0.208	0.6861	NS	
rs13126816	A	0.315	0.303	0.8297	NS		0.294	0.314	0.698	NS	
rs7668666	A	0.277	0.268	0.873	NS		0.308	0.250	0.2329	NS	
rs3775292	C	0.234	0.196	0.4262	NS		0.223	0.196	0.5358	NS	
rs3775291	T	0.394	0.326	0.2337	NS		0.346	0.342	0.9308	NS	

SNPs: single-nucleotide polymorphisms; *TLR3*: Toll-like receptor 3; EoE: eosinophilic esophagitis; MA: minor allele; OR (95%CI): odds ratio with 95% confidence interval; NS: not significant $p > 0.05$.

p_c: corrected p value, 10,000-fold permutation testing.

cohort of European origin in a Spanish population.⁹⁻¹¹ This result confirms the role played by SNPs in the *TSLP* gene in the pathogenesis of EoE. However, the association between *TSLP* and EoE susceptibility was statistically significant for male patients only, which probably occurred because of the low number of female patients with EoE included in our study. Thus, an equivalent role for *TSLP* in both genders cannot be ruled out since a non-significant trend in SNP frequencies was present in the female group. It is notable that the direction of the disease risk (OR) was similar in this study and previous studies. Therefore, rs2289276, rs10062929, rs2289277 and rs11466749 had an OR < 1 and, in contrast, rs1898671 had an OR > 1.

Since the *TSLP* gene has been identified as a well-established genetic marker that confers risk for developing EoE,⁹⁻¹¹ we analyzed the contribution of *TLR3* in relation to *TSLP* using a logistic regression method. This model suggests that certain alleles of the *TLR3* gene contribute to EoE susceptibility when associated alleles of the *TSLP* gene are absent, whereas *TLR3* could also act as an additional susceptibility factor in individuals with associated *TSLP* alleles. In addition, we used the MDR method^{31,32} to better study the interaction between *TLR3* and *TSLP* genes. MDR is a non-parametric and model-free method alternative to logistic regression that is effective for relatively small sample sizes. The interaction entropy analysis revealed no

statistical epistasis between *TLR3* and *TSLP* genes (IG = -4.52%). Biological epistasis is the result of physical interactions among biomolecules within gene regulatory networks and biochemical pathways.³⁴ In this manner, *TLR3* has been revealed as a key regulator of *TSLP* expression and function.^{20,21} *TLR3* recognizes double-stranded RNA (dsRNA), which is found in some viruses, and the stimulation of primary esophageal epithelial cells with poly I:C (a dsRNA mimetic) induces the expression of *TSLP* messenger RNA (mRNA).¹⁹ Although the absence of statistical epistasis does not necessarily imply absence of biological epistasis, our results suggest a non-synergic effect between both loci, which suggests that the interactions of both genes have redundancy or independent effects.

The present study also examined the effects of *TLR3* SNP polymorphisms when EoE patients expressed aeroallergen or food sensitization because *TLR3* has been shown to be involved in the development of these allergic conditions.^{17,19} We found that different tSNPs were independently associated with aeroallergen and food sensitization (rs11721827 and rs5743303, respectively), which suggests that the two variants could act as markers of the etiological variants. The influence of the hypothetical etiological variants could be related to differences in the 3'UTR region, the post-transcriptional control, mRNA expression levels or alternative forms of the transduced protein, which would affect its function.

Taken together, we highlight a critical role for the *TLR3* locus in the pathogenesis of EoE. We propose that activation of the innate immune system in the esophageal epithelium involving *TLR3* signaling and expression of *TSLP* mRNA is likely to interact with adaptive allergic responses ultimately triggered by allergens. This finding presents *TSLP* and *TLR3* as new potential molecular targets for therapeutic intervention in EoE, which highlights a key role for innate immunity in the development of specific allergic diseases.

The strengths of our research included the analysis of a large series of patients with EoE collected at two referral centers in Spain as well as the selection of a higher number of control individuals, the development of molecular studies to evaluate SNP of the major genetic markers identified as conferring risk to EoE and key factors involved in regulating mucosal immune responses in allergies. The selection of the control group from healthy bone marrow donors is recognized as the most convenient strategy, but it has led to some controversy in the literature since the donors could not completely represent the whole population of the place that they come from. Volunteers who act as donors for organs and tissues are usually healthy people in whom several illnesses have been excluded. For this reason, donors could easily present a better health status than standard populations. Despite those

issues, our control group represents the same populations from where the patients with EoE came from, so we are confident that it does not constitute a drawback for our study.

Finally, since no replication cohort was considered in our study, further studies to reproduce our findings in broader populations and to validate the findings of *TLR3* as a novel genetic susceptibility locus for EoE are warranted.

In conclusion, our research reinforces the role played by *TSLP* polymorphisms in conferring susceptibility to EoE and identifies for the first time that *TLR3* acts as a novel genetic susceptibility locus for developing EoE. This effect would be independent of the previously established association of EoE with *TSLP*.

Acknowledgments

The author contributions are as follows: RAC, JRGL and JQ contributed to the conception and design of the research and performed the experiments, analysis and interpretation of the data; SC, AJL and JMB contributed samples, patient information and analysis and interpretation of the data. RAC, JRGL, AJL and JQ drafted the manuscript. All authors read and approved the final version.

Declaration of conflicting interests

None declared.

Funding

This work was supported by Alergosur, Sociedad Andaluza de Alergología e Inmunología Clínica, El Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and Plan Andaluz de Investigación (PAI CTS-0197).

Ethics approval

This study was approved by the Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla (Code 2012PI/079).

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All participants included in the study consented to the publication of the data extracted from the statistical study. No individual patient data are reported.

References

1. Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á, et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: Evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. *United European Gastroenterol J* 2017; 5: 335–358.
2. Arias Á, Pérez-Martínez I, Tenias JM, et al. Systematic review with meta-analysis: The incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43: 3–15.

3. González-Cervera J, Arias Á, Redondo-González O, et al. Association between atopic manifestations and eosinophilic esophagitis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017; 118: 582–590.
4. Sugnanam KK, Collins JT, Smith PK, et al. Dichotomy of food and inhalant allergen sensitization in eosinophilic esophagitis. *Allergy* 2007; 62: 1257–1260.
5. Aceves SS. Food allergy testing in eosinophilic esophagitis: What the gastroenterologist needs to know. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12: 1216–1223.
6. Straumann A, Bauer M, Fischer B, et al. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a T(H)2-type allergic inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 954–961.
7. Alexander ES, Martin LJ, Collins MH, et al. Twin and family studies reveal strong environmental and weaker genetic cues explaining heritability of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1084–1092.
8. Kottyan LC, Davis BP, Sherrill JD, et al. Genome-wide association analysis of eosinophilic esophagitis provides insight into the tissue specificity of this allergic disease. *Nat Genet* 2014; 46: 895–900.
9. Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD, et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nat Genet* 2010; 42: 289–291.
10. Sleiman PM, Wang ML, Cianferoni A, et al. GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci. *Nat Commun* 2014; 5: 5593.
11. Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM, et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 160–165.
12. Liu YJ. *TSLP* in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 2009; 101: 1–25.
13. Kottyan LC and Rothenberg ME. Genetics of eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunol* 2017; 10: 580–588.
14. Jensen ET and Dellon ES. Environmental and infectious factors in eosinophilic esophagitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015; 29: 721–729.
15. Dellon ES. The esophageal microbiome in eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* 2016; 151: 364–365.
16. Jiménez-Dalmaroni MJ, Gerswhin ME and Adamopoulos IE. The critical role of toll-like receptors—From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2016; 15: 1–8.
17. Kanagaratham C, Camateros P, Flaczyk A, et al. Polymorphisms in TOLL-like receptor genes and their roles in allergic asthma and atopy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2011; 5: 45–56.
18. Bashir ME, Louie S, Shi HN, et al. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004; 172: 6978–6987.
19. Chandramouleeswaran PM, Shen D, Lee AJ, et al. Preferential secretion of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) by terminally differentiated esophageal epithelial cells: Relevance to eosinophilic esophagitis (EoE). *PLoS One* 2016; 11: e0150968.
20. Kato A, Favoreto S, Avila PC, et al. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007; 179: 1080–1087.
21. Lim DM, Narasimhan S, Michaylira CZ, et al. TLR3-mediated NF-(kappa)B signaling in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1172–G1180.
22. Arias Á, Vicario M, Martínez-Fernández P, et al. Increased mucosal expression of Toll-like receptors in adult patients with eosinophilic esophagitis. *United European Gastroenterol J* 2016; 4(5S): A126.
23. Bacchetta R, Gambineri E and Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and *FOXP3* in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 227–235.
24. Akdis M, Blaser K and Akdis CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961–968.
25. Tantibhaedhyangkul U, Tatevian N, Gilger MA, et al. Increased esophageal regulatory T cells and eosinophil characteristics in children with eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. *Ann Clin Lab Sci* 2009; 39: 99–107.
26. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441–446.
27. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K, et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *J Immunol* 2010; 184: 4033–4041.
28. Liacouras CA, Furuta GT, Hirano I, et al. Eosinophilic esophagitis: Updated consensus recommendations for children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 3–20.
29. Castellano Mdel R, Cimbollek S and Quiralte J. Defining the role of food allergy in a population of adult patients with eosinophilic esophagitis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9: 257–262.
30. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263–265.
31. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 138–147.
32. Moore JH. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 795–803.
33. Jakulin A and Bratko I. Analyzing attribute dependencies. In: Lavrač N, Gamberger D, Blockeel H, (eds) *PKDD 2003: 7th European Conference on Principles and Practice of Knowledge Discovery in Databases. Cavtat-Dubrovnik, Croatia, September 2003, Proceedings*. Cavtat, Croatia: Springer-Verlag, 2003, pp.229-240.
34. Moore JH and Williams SM. Traversing the conceptual divide between biological and statistical epistasis: Systems biology and a more modern synthesis. *Bioessays* 2005; 27: 637–646.

MARÍA JOSÉ ROJAS VÍLCHÉZ, SECRETARIA DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

CERTIFICA:

El Proyecto titulado: ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ESOFAGITIS EOSINOFÍLICA DEPENDIENTE DE ALIMENTOS PRE Y POST –INTERVENCIÓN DIETÉTICA.

Investigador: **MARÍA DEL ROBLEDO ÁVILA CASTELLANO**

Ha recibido el Premio de la Convocatoria de Becas FUNDACIÓN ALERGOSUR 2015, otorgado durante la celebración de la XLIV Reunión de ALERGOSUR, celebrada durante los días 28 a 30 de Mayo de 2015 en Granada

Y para que conste, a petición del interesado, expido la presente certificación en Málaga a 10 de Junio de 2015

Fdo.



Dña. M^a José Rojas Vílchez

Secretaría General de ALERGOSUR

Secretaría Técnica de Alergosur:

C/ Curtidores, 1. Colegio Oficial de Médicos de Málaga. 29006 - Málaga
Teléfono: 678 646 709. e-mail:secretaria.alergosur@alergosur.net

ANA DE LA CALLE TORAL, SECRETARIA DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE
ALERGOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

CERTIFICA:


El Proyecto titulado: LA ALERGIA A ALIMENTOS EN LA ESOFAGITIS
EOSINOFÍLICA: DISEÑANDO UN TRATAMIENTO EFICAZ A TRAVÉS DEL ESTUDIO
DE BIOMARCADORES DE ACTIVIDAD CLÍNICA, INFLAMATORIOS Y GENÉTICOS

Investigador: **MARÍA DEL ROBLEDO ÁVILA CASTELLANO**

Ha recibido el Premio de la Convocatoria de Becas FUNDACIÓN ALERGOSUR 2013,
otorgado durante la celebración de la XLII Reunión ALERGOSUR, celebrada
durante los días 31 de Mayo y 1 de Junio de 2013 en Zahara de los Atunes

Y para que conste, a petición del interesado, expido la presente certificación en
Sevilla a 10 de Octubre de 2013

Fdo.



Dña. Ana de la Calle Toral
Secretaria de ALERGOSUR

Sevilla, Junio 2022.