

Ricardo González Tarancón

ESTUDIO DE MUTACIONES EN
EL GEN DE LA FILAGRINA (FLG)
Y POLIMORFISMOS EN EL GEN
DEL RECEPTOR DE LA
VITAMINA D (VDR) Y SU
RELACIÓN CON LA DERMATITIS
ATÓPICA

Departamento

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es

Gilaberte Calzada, Fermina Yolanda
Puzo Foncillas, José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA
FILAGRINA (FLG) Y POLIMORFISMOS EN EL GEN
DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D (VDR) Y SU
RELACIÓN CON LA DERMATITIS ATÓPICA

Autor

Ricardo González Tarancón

Director/es

Gilaberte Calzada, Fermina Yolanda
Puzo Foncillas, José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2020

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA
FILAGRINA (FLG) Y POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL
RECEPTOR DE LA VITAMINA D (VDR) Y SU RELACIÓN
CON LA DERMATITIS ATÓPICA.**

AUTOR:

Ricardo González Tarancón

DIRECTORES:

Dra. Yolanda Gilaberte Calzada

Dr. José Puzo Focillas

Zaragoza, año 2020

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis doctoral me ha hecho comprender hasta qué punto la investigación científica requiere, tanto de la dedicación y fuerza de voluntad personal, como del apoyo y motivación de las personas que nos rodean. Por ello, quisiera dejar constancia de mi agradecimiento a todos aquellos que de forma directa o indirecta han contribuido a la consecución de este trabajo. Sin cada uno de ellos, no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A mis directores, Yolanda y Pepe. Gracias por tanto tiempo y energía dedicados a este proyecto. Gracias por haber confiado en mí, guiarme y motivarme en estos años. Gracias al profesor Miguel Pocovi por tutorizarme en los aspectos fundamentales de esta tesis.

A todos los profesionales que han colaborado en el estudio: pediatras, dermatólogos y médicos de familia, especialmente a la Dra. Sanmartin y a la Dra. Hernández, por el reclutado de pacientes atópicos. A Naiara por ayudarme en el reclutado de controles, y muy especialmente a Fabiola, sin su apoyo no podría haber finalizado este trabajo. Gracias por tú disposición y por tu ayuda desinteresada. A Cristina Ferruz y a *Werfen Group*, por su colaboración y apoyo material.

A todos los niños y a sus familias por prestarse a participar en el estudio.

A todos mis compañeros de trabajo, del Miguel Servet y del Ernest Lluch. A mis amigos, que son muchos, a todos ellos. A Elvira, que me ha sufrido y motivado más que nadie.

Finalmente, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, Adelina y Juan, y a mi hermano, Raúl, que son y serán siempre los principales responsables de mis éxitos. A ellos les debo mi formación académica y personal, mi ilusión por el trabajo y el disfrute de la vida. Gracias a su apoyo incondicional tengo la confianza y la motivación necesaria para afrontar los nuevos retos que se me plantean cada día.

A mis abuelos, Francisco y Pascuala. Allá donde estén, sé que estarán muy orgullosos de ver a su nieto doctor. Éste trabajo se lo dedico a ellos.

RESUMEN

La Dermatitis Atópica (DA) es la enfermedad inflamatoria crónica más prevalente en la población pediátrica. Existen condicionantes genéticos que pueden presentarse como factores de riesgo independientes para el desarrollo de DA.

La presencia de mutaciones de pérdida de función del gen *FLG* han sido identificadas como el principal factor genético predisponente para el desarrollo de DA. No existen estudios que evalúen la asociación de mutaciones en *FLG* en población pediátrica española con DA. Tampoco existen muchos trabajos que estudien la asociación entre la DA y polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, como *VDR* y *CYP24A1*. Dada la relación entre la DA y síndrome metabólico, se plantea estudiar la asociación de estos genes con el perfil lipídico y metabolismo de la vitamina D.

Se ha realizado un estudio observacional, prospectivo de casos y controles, en niños de 0-14 años y fenotipo europeo-Mediterráneo. Se definen dos grupos; como casos niños con diagnóstico de DA y como controles no afectados. En todos ellos se realiza un estudio bioquímico y molecular en el que se analizan las mutaciones más prevalentes en *FLG* (R501X, 2282del4 y R2447X) y determinados polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1*.

Como resultados más destacados del estudio se obtiene que la frecuencia de las mutaciones más prevalentes en el gen *FLG* en población pediátrica española afecta de DA es del 12,6%, una cifra superior a la de otras poblaciones sur y centro europeas. Estas mutaciones suponen un factor de riesgo genético para el desarrollo de DA ya que aumenta la probabilidad de padecerla en 6,81 veces, siendo R501X la mutación más prevalente en población pediátrica española y el único factor de riesgo genético que ha demostrado asociación, ya que las mutaciones R2447X y 2282del4, tienen escaso o nulo protagonismo como factores genéticos predisponentes de DA en la población española.

En el estudio de los polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1* los resultados son variantes, ya que mientras el polimorfismo rs2238136 incrementa el riesgo de DA, el polimorfismo rs2239182 y el haplotipo GCC (rs2239185-G, rs1540339-C, rs2238136-C) se presentan como factores protectores.

Se ha demostrado asociación entre algunos polimorfismos y los parámetros bioquímicos medidos. Para la vitamina D existe asociación positiva con rs2239182 y rs2238136 y negativa con rs2239185-GA y rs2248359-TT. Los polimorfismos rs2239185-AA, rs2239182-CC y rs1540339-CC, se asocian con mayores concentraciones séricas de colesterol total, y rs2296241-AA y rs2248359-TT con mayores niveles de colesterol HDL.

Este estudio permite ampliar el conocimiento sobre el ambiente genético tan complejo que rodea a la DA, y supone una primera aproximación, en este sentido, en la población española. Por otro lado, el diseño experimental y resultados que aquí se muestran, sirven de base para estudios de similares características que puedan realizarse sobre diferentes grupos étnicos, y que permitan abordar, con mayor profundidad, el ambiente genético de la DA.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	7
RESUMEN	9
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	16
ABREVIATURAS.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. ATOPIA	21
1.2. DERMATITIS ATÓPICA	22
1.2.1. DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	22
1.2.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	22
1.2.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	23
1.2.4. FISIOPATOLOGÍA y FACTORES DE RIESGO.....	25
1.2.4.a Pérdida de integridad de la barrera epidérmica.....	25
1.2.4.b Disfunción inmunológica en la Dermatitis Atópica.....	27
1.2.4.c Factores Ambientales: condiciones climáticas y geográficas.....	29
1.2.4.d Factores Ambientales: alérgenos.....	30
1.2.4.e Factores ambientales: estilo de vida.....	30
1.2.4.f Microorganismos.....	31
1.2.5. DIAGNÓSTICO.....	32
1.2.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	34
1.2.7. TRATAMIENTO.....	35
1.3. FILAGRINA	38
1.3.1. INTRODUCCIÓN.....	38
1.3.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA FILAGRINA.....	38
1.3.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FILAGRINA.....	39
1.3.4. CONSECUENCIAS DEL DÉFICIT DE FILAGRINA EN LA BARRERA CUTÁNEA.....	42
1.3.4.a Alteración en la expresión y organización proteica epidérmica.....	42
1.3.4.b Aumento del pH epidérmico y pérdida de hidratación.....	42
1.3.4.c Aumento de la inflamación, el prurito y la inmunoreactividad.....	43
1.3.4.d Alteración en la expresión de lípidos en el estrato córneo.....	43
1.3.4.e Aumento del riesgo de infecciones bacterianas.....	44
1.3.4.f Asociación entre las mutaciones en el gen <i>FLG</i> y niveles de vitamina D.....	44
1.3.5. GEN <i>FLG</i> , MUTACIONES DESCRITAS Y ASOCIACIÓN CON LA DA.....	45

1.3.6.	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN FLG .	48
1.4.	VITAMINA D.....	51
1.4.1.	INTRODUCCIÓN.....	51
1.4.2.	ESTRUCTURA MOLECULAR Y SÍNTESIS DE LA VITAMINA D.....	51
1.4.3.	FUNCION BIOLÓGICA DE LA VITAMINA D.....	54
1.4.4.	CONSECUENCIAS DEL DÉFICIT DE VITAMINA D.....	55
1.4.5.	VITAMINA D, GEN <i>VDR</i> Y RELACIÓN CON LA DA.....	57
1.4.6.	DA, VITAMINA D Y SÍNDROME METABÓLICO.....	59
2.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	63
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1.	DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	73
4.2.	VARIABLES DE ESTUDIO.....	75
4.3.	ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	78
4.4.	ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN <i>FLG</i>	81
4.5.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN <i>VDR</i>	85
4.6.	ANÁLISIS DE DATOS.....	87
4.7.	ASPECTOS ÉTICOS.....	89
5.	RESULTADOS	91
5.1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	93
5.2.	PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN <i>FLG</i>	98
5.3.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO <i>FLG</i> , DA y ATOPIA.....	100
5.4.	PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS EN <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i>	104
5.5.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO <i>VDR</i> , <i>CYP24A1</i> , DA y ATOPIA.....	107
5.6.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS, VIT D y METABOLISMO FOSFOCÁLCICO.....	114
5.7.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y LÍPIDOS SÉRICOS.....	117
6.	DISCUSIÓN.....	119
6.1.	PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN <i>FLG</i>	122
6.2.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO <i>FLG</i> , DA Y ATOPIA.....	126
6.3.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO <i>VDR-CYP24A1</i> , DA Y ATOPIA.....	131
6.4.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D.....	135
6.5.	ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y PERFIL LIPÍDICO	137
7.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	139
8.	FORTALEZAS Y FUTUROS ESTUDIOS.....	143
9.	CONCLUSIONES	147
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
11.	ANEXOS	163

11.1.	ANEXO A: HOJA DE CÁLCULO DE SCORAD	165
11.2.	ANEXO B: VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	167
11.3.	ANEXO C: RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE ARAGÓN	169
11.4.	ANEXO D: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	171
11.5.	ANEXO E: VALOR DE AIC PARA CADA MODELO GENÉTICO Y SNP	175

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Definiciones de DA según distintas sociedades científicas.....	22
Tabla 2.	Nombres utilizados para definir dermatitis atópica a lo largo de la historia.	23
Tabla 3.	Criterios de Hanifin y Rajka para el diagnóstico de la Dermatitis atópica.....	32
Tabla 4.	Criterios de Hanifin y Rajka modificados.....	33
Tabla 5.	Criterios diagnósticos de DA (Consenso <i>American Academy of Dermatology</i> , 2003)...	33
Tabla 6.	Medidas generales preventivas en el tratamiento de la DA.	36
Tabla 7.	Formas de tratamiento de la DA.	36
Tabla 8.	Mutaciones identificadas en FLG asociadas con DA o IV.	48
Tabla 9.	Aporte de vitamina D en determinados alimentos y por exposición a UVB	52
Tabla 10.	Definición del estatus de vitamina D según la <i>Endocrine Society</i> (ENDO).	56
Tabla 11.	Criterios de inclusión y exclusión en el estudio.....	74
Tabla 12.	Variables antropométricas.	75
Tabla 13.	Escala para definir fototipos.....	75
Tabla 14.	Variables relacionadas con el estado de salud y gravedad de la DA.....	75
Tabla 15.	Variables relacionadas con parámetros bioquímicos. (*)	76
Tabla 16.	Mutaciones analizadas en el gen <i>FLG</i>	76
Tabla 17.	Polimorfismos de los genes <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i>	77
Tabla 18.	Principales etapas del protocolo de análisis de mutaciones en <i>FLG</i>	81
Tabla 19.	<i>Primers</i> (Cebadores) utilizados en la PCR de amplificación en el estudio de <i>FLG</i>	82
Tabla 20.	Principales etapas del protocolo de análisis de polimorfismos en <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i>	85
Tabla 21.	Sondas utilizadas en la PCR específica de alelo en el estudio de <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i>	86
Tabla 22.	Modelos de herencia genética posibles en el análisis estadístico de polimorfismos.	88
Tabla 23.	Características descriptivas de la población de estudio.....	93
Tabla 24.	Características clínicas de los grupos de estudio en relación con la atopía.....	94
Tabla 25.	Asociación entre DA y metabolismo fosfocálcico en los grupos de estudio.	95
Tabla 26.	Relación entre niveles de vitamina D y gravedad de la DA estratificados por fototipos	96
Tabla 27.	Asociación entre DA y lípidos séricos en los grupos de estudio.....	97
Tabla 28.	Frecuencia de mutaciones en <i>FLG</i> en los grupos de estudio.	98
Tabla 29.	Características clínicas y genotípicas de los sujetos con mutación identificada en <i>FLG</i>	99
Tabla 30.	Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y DA.	100
Tabla 31.	Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y DA por hospital y grupo.	101
Tabla 32.	Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y severidad de la DA.	101
Tabla 33.	Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y asma.....	102
Tabla 34.	Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y rinitis.....	102

Tabla 35. Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y enfermedades atópicas.	103
Tabla 36. Prevalencia de SNPs en <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i> en los grupos de estudio.	106
Tabla 37. Análisis de asociación entre rs731236 y DA	107
Tabla 38. Análisis de asociación entre rs1544410 y DA	108
Tabla 39. Análisis de asociación entre rs2239185 y DA	108
Tabla 40. Análisis de asociación entre rs2239182 y DA	108
Tabla 41. Análisis de asociación entre rs1540339 y DA	109
Tabla 42. Análisis de asociación entre rs2239179 y DA	109
Tabla 43. Análisis de asociación entre rs3782905 y DA	109
Tabla 44. Análisis de asociación entre rs2238136 y DA	110
Tabla 45. Análisis de asociación entre rs2296241 y DA	110
Tabla 46. Análisis de asociación entre rs2248359 y DA	110
Tabla 47. Asociación entre polimorfismos <i>VDR</i> , <i>CYP24A1</i> y gravedad de la DA.....	111
Tabla 48. Asociación entre polimorfismos de <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i> y otras enfermedades atópicas.	112
Tabla 49. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2239185, rs1540339 y rs2238136.	113
Tabla 50. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2239182, rs2107301 y rs2239179.	113
Tabla 51. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2248359 y rs2296241.	113
Tabla 52. Asociación entre mutaciones <i>FLG</i> y vitamina D.	114
Tabla 53. Asociación entre polimorfismos en <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i> y vitamina D.	115
Tabla 54. Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y metabolismo fosfocálcico.	116
Tabla 55. Asociación entre polimorfismos <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i> y metabolismo fosfocálcico.	116
Tabla 56. Asociación entre genotipo <i>FLG</i> y lípidos séricos.....	117
Tabla 57. Asociación entre genotipo <i>VDR</i> y <i>CYP24A1</i> y lípidos séricos.....	118
Tabla 58. Frecuencias poblacionales de mutaciones para grupo control en <i>FLG</i> en la literatura.	123
Tabla 59. Frecuencias poblacionales de mutaciones en <i>FLG</i> para grupo DA en la literatura. ..	124
Tabla 60. Estudios de asociación entre <i>FLG</i> y DA en la literatura.	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Marcha atópica. Prevalencia de eczema, rinitis y asma.....	21
Figura 2. Rutas inmunológicas en las fases iniciales y avanzadas de la DA.....	28
Figura 3. Esquema de la estructura molecular de la Profilagrina.	39
Figura 4. Estructura de la envoltura cornificada y detalle de un corneodesmosoma.	40
Figura 5. Representación esquemática de la estructura génica de <i>FLG</i>	45
Figura 6. Estructura molecular de los precursores de la vitamina D	53
Figura 7. Protocolo de reacción: PCR de Amplificación	82
Figura 8. Protocolo de reacción: PCR de Secuenciación	82
Figura 9. Análisis e identificación de la mutación R501X.	83
Figura 10. Análisis e identificación de la mutación 2282del4.	83
Figura 11. Análisis e identificación de la mutación R2447X.....	84
Figura 12. Posición de los <i>primers</i> en la PCR específica de alelo	86

ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
1,25(OH)₂D	1,25-(OH) ₂ -vitamina D (calcitriol).
25(OH)D	25-OH-vitamina D (calcidiol).
AAD	<i>American Academy of Dermatology.</i>
ACAAI	<i>American College of Allergy, Asthma and Immunology.</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AEP	Asociación Española de Pediatría.
AIC	Coficiente de información de Akaike.
AUC	Ácido transurocánico.
CNV	Variaciones del número de copias (<i>Copy number variations</i>).
DA	Dermatitis atópica.
DBP	Proteína de unión a vitamina D (<i>vitamina D binding protein</i>).
EA	Eczema atópico.
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology.</i>
EC	Envoltura cornificada.
ENDO	<i>Endocrine Society.</i>
FHN	Factor humectante natural.
FLG	Filagrina.
FLG	Gen de la filagrina.
GWAS	Estudio asociación genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>).
IC	Intervalo de confianza.
IL	Interleuquina (o interleucina).
IFC	Circuito fluídico integrado (<i>Integrated fluidic circuit</i>).
IMC	Índice de masa corporal.
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation.</i>
IOM	<i>American Institute of Medicine.</i>
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood.</i>
IV	Ictiosis vulgar.
JCAAI	<i>Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology.</i>
MAF	Mayor frecuencia alélica (<i>Major allele frequency</i>).
OR	Razón de probabilidades (<i>Odds Ratio</i>).
PCA	Pirrolidona-5-carboxílico.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase chain reaction</i>).
RIQ	Rango intercuartílico.
RUV	Radiación ultravioleta.
RXR	Receptor del retinoide tipo X.
SCORAD	<i>Scoring atopic dermatitis index.</i>
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>).
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).
TSLP	Linfopoyetina Estromal Tímica.
VDR	Receptor de la vitamina D (<i>vitamin D receptor</i>).
VDR	Gen del receptor de la vitamina D (<i>vitamin D receptor gene</i>).
VSI	Variante de significado incierto.
WAO	<i>World Allergy Organization.</i>

1. INTRODUCCIÓN

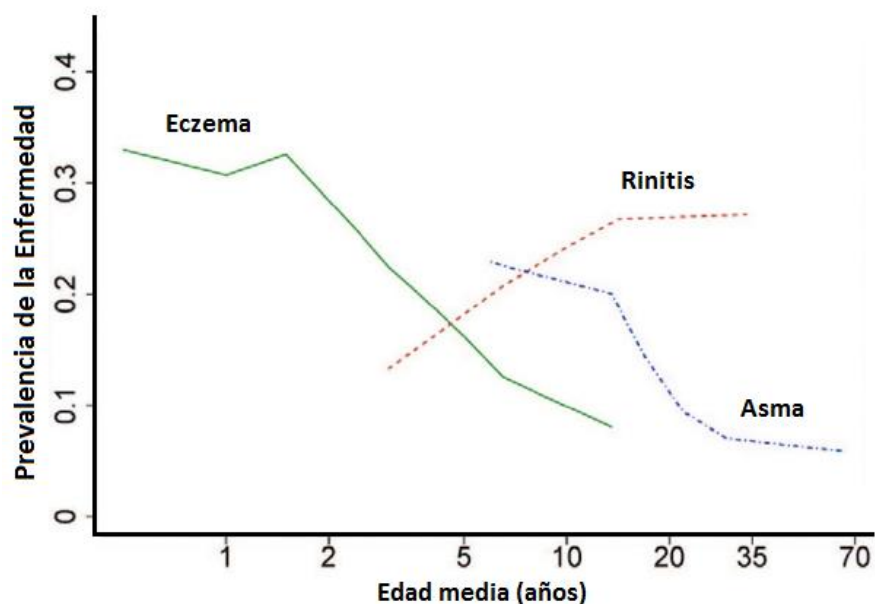
1.1. ATOPIA

La atopia se define como la tendencia personal y/o familiar a la sensibilización y producción de anticuerpos IgE en respuesta a la exposición ordinaria a los alérgenos comunes del ambiente, a los que todos los individuos están expuestos, pero frente a los cuales la mayoría no desarrollan ninguna respuesta (1). Esta condición predispone al desarrollo de las llamadas enfermedades atópicas: asma, rinitis y eczema.

Las enfermedades atópicas se manifiestan típicamente en la infancia o en la adolescencia, y se van sucediendo siguiendo una progresión secuencial conocida como marcha atópica. Este proceso, generalmente comienza con el desarrollo de anticuerpos IgE frente a alérgenos alimentarios, acompañados de síntomas de dermatitis atópica y alergia a los alimentos, seguida por la aparición de rinitis alérgica y finalmente asma (2). En este sentido, la dermatitis atópica precede el desarrollo secuencial de asma y rinitis alérgica, lo que sugiere que tiene un papel iniciador de la marcha atópica (Figura 1).

Figura 1. Marcha atópica. Prevalencia de eczema, rinitis y asma.

*Adaptado de Ker J, Hartert TV. The atopic march: what's the evidence? (2)



1.2. DERMATITIS ATÓPICA

1.2.1. DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La dermatitis atópica o eczema atópico (en adelante DA o EA) es la enfermedad inflamatoria crónica de la piel más prevalente (3). Se caracteriza por cursar en brotes agudos consistentes en un prurito muy intenso, en ocasiones incoercible y una xerosis muy marcada (4). En la literatura revisada, la definición de DA puede ser muy variada según las distintas sociedades científicas (Tabla 1):

Tabla 1. Definiciones de DA según distintas sociedades científicas.

- *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*; La DA o EA es una enfermedad alérgica inflamatoria de la piel que cursa con picor intenso, enrojecimiento, edema, descamación, formación de vesículas, piel muy seca, sensible y fácilmente irritable.
- *Brithish Skin Foundation*; la DA es una condición inflamatoria de la piel. Atopia es el término utilizado para describir condiciones como el eczema, el asma o la rinitis estacional que a menudo tienen base genética.
- *Fondation pour la Dermatite Atopique*; la DA o EA designa las manifestaciones inflamatorias cutáneas recidivantes asociadas a la atopia. Se trata de una dermatosis crónica pruriginosa e inflamatoria que evoluciona a través de brotes.
- *American Academy of Dermatology*; la DA o EA es una enfermedad inflamatoria crónica pruriginosa, más frecuente en niños pero que puede afectar también a adultos. Sigue un curso recurrente y se asocia a menudo con elevaciones de niveles de IgE y una historia personal y familiar de alergias tipo-I, rinitis alérgica y asma.

1.2.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

Aunque la DA se conoce desde hace varios siglos, el recorrido para definir e identificar esta enfermedad ha sido bastante largo y dificultoso en el tiempo. El primer paciente documentado que se sospecha afecto de DA fue el emperador Octavio Augusto (siglo I d.C.) de quien se dice que “...sufría de un prurito tormentoso que le obligaba a rascarse la espalda con un objeto alargado...” (5).

El término eczema (también escrito como eccema) procede del griego (*ēkzema*) y significa etimológicamente “algo que hierve del interior” (*ek-* del interior al exterior,

zema- hervir). Este vocablo comenzó a utilizarse en el siglo II d.C. con Dioscórides para designar a las erupciones cutáneas que sufrían algunos pacientes, pero no fue hasta el siglo VI cuando se acuñó su uso como terminología médica por Aecio de Amida (5).

Entrado el siglo XIX aparecieron distintos nombres diferentes para describir esta enfermedad (Tabla 2). En 1891 Brocq y Jaquet la denominan "neurodermatitis diseminada y del sistema nervioso"; un año más tarde, en 1892, Besnier la llama "prúrigo diatésico, eccematoide liquienoide". En 1933, Wise y Sulzberger proponen el término de dermatitis atópica (o eczema atópico) con el cual se le sigue conociendo en la actualidad.

Tabla 2. Nombres utilizados para definir dermatitis atópica a lo largo de la historia.

Terminología	Autor/es
Eczema	Aecio de Amida
Eczema	Willan
Prurito constitucional	Hebra
Neurodermatitis difusa	Brocq y Jaquet (1891)
Prurigo diatésico	Besnier (1892)
Dermatitis atópica / Eczema atópico	Wise y Sulzberger (1933)
Eczema endógeno	Korting (1954)
AEDS (<i>Atopic Eczema Dermatitis Syndrome</i>)	EAACI task force (2001)
Eczema	WAO consensus (2004)

*Modificado de Ring J., *Atopic Dermatitis: Eczema* (5). EAACI=European Academy of Allergy and Clinical Immunology, WAO=World Allergy Organization

1.2.3. EPIDEMIOLOGÍA.

Debido a que la DA es una enfermedad que se diagnostica en base a criterios clínicos (no concordantes entre diferentes autores) y una multitud de datos obtenidos por la anamnesis y exploración física, resulta difícil valorar los diferentes estudios epidemiológicos que se han publicado respecto a la enfermedad.

Es una patología que afecta con mayor frecuencia a la población infantil, siendo la enfermedad crónica más prevalente en la infancia, afectando al 15-20% de los niños en todo el mundo (6-8). Aunque también puede presentarse en la edad adulta, la prevalencia de la enfermedad es mucho menor (1-3%)(9), con cifras que oscilan desde el 0,3 % al 14,3 % según distintos autores (3, 10, 11).

Actualmente, los datos más valiosos sobre la prevalencia y progresión de la enfermedad provienen del estudio ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) iniciado en el año 1991 y finalizado en 2012 (12). Este estudio se diseñó con un enfoque global, utilizando una metodología uniforme que permitió comparar los resultados de casi dos millones de niños en 100 países distintos. El estudio reveló que la prevalencia global de la enfermedad es cercana al 20%, con grandes variaciones geográficas (del 0,2% al 24,6%) (13, 14). En general, los datos de prevalencia más elevados (>15%) se obtienen en África, Oceanía, América del Sur y países del norte de Europa, y los más bajos (<5%) en Asia, Europa Central y del Este.

En nuestro país no existen datos concluyentes sobre la prevalencia de esta enfermedad. Los datos procedentes del estudio ISAAC arrojan una prevalencia del 6,2% en niños de 6-7 años y del 10,3% en adolescentes (de 12-13 años) (15), algo inferior a la media europea (14,2%) (16). Teniendo en cuenta que el estudio comenzó hace 20 años y de que existen datos fiables de que la prevalencia de la enfermedad se ha duplicado, incluso triplicado en los últimos 50 años en los países industrializados (6, 7), parece razonable pensar que la prevalencia estimada actual sea superior al 20%, aunque no existen datos publicados fiables al respecto.

El inicio de la enfermedad puede ocurrir a cualquier edad, aunque con mayor frecuencia se produce en la primera infancia. Se estima que un 50% de los pacientes desarrollan la enfermedad en el primer año de vida y el 95% dentro de los primeros 5 años (17). Sólo un 17% de los adultos con DA experimenta el inicio de la enfermedad después de la adolescencia (8). Aunque la enfermedad tiene una remisión espontánea antes de llegar a la adolescencia en el 75% de los pacientes; un 25% pueden continuar teniendo síntomas de enfermedad en la edad adulta o recaídas después de algunos años sin síntomas (18).

Finalmente, en referencia a la distribución por sexos, se ha observado un ligero aumento de la frecuencia en mujeres respecto a hombres, del orden de 1,3-1,5 a 1 (19, 20).

1.2.4. FISIOPATOLOGÍA y FACTORES DE RIESGO.

El conocimiento en profundidad de la fisiopatología de la DA todavía es incierto, y la mayoría de los expertos coinciden en que en el desarrollo de esta enfermedad existe una compleja relación entre factores endógenos, inherentes al individuo, responsables de alteraciones de la función barrera epidérmica e hiperactividad del sistema inmune y numerosos factores exógenos condicionantes capaces de desencadenar brotes (21-23).

Se han propuesto dos teorías principales para explicar la etiopatogenia de la DA: la hipótesis de dentro hacia afuera (*inside-out*) y la hipótesis de afuera hacia adentro (*outside-in*) (24). La hipótesis *inside-out* propone que la activación alérgica conduce a una pérdida de integridad de la barrera cutánea que favorece la introducción y presentación de alérgenos y el crecimiento de la microbiota que origina la reacción eccematosa. La hipótesis *outside-in* propone que el defecto primario de la barrera cutánea podría hacer a la piel más susceptible a la desregulación inmune y conduciría a la DA. Estas teorías no son exclusivas, ni excluyentes, de forma que ambas probablemente desempeñan un papel en la patogénesis de la DA (24).

A continuación, se realiza un resumen de la fisiopatología de la enfermedad, así como de los principales factores de riesgo o desencadenantes de la misma:

1.2.4.a Pérdida de integridad de la barrera epidérmica.

Se conoce desde hace tiempo la importancia que tiene la integridad de la barrera epidérmica para el correcto cumplimiento de las funciones de la piel, que incluyen, no sólo la separación física del medio interno y externo, sino también, el establecimiento de la homeostasis de los fluidos corporales, la protección frente a las agresiones mecánicas, alérgenos y toxinas, siendo además un ecosistema que controla las comunidades microbianas que viven en ella.

En esta barrera, tiene un papel protagonista la filagrina, de la que se hablará ampliamente en el siguiente capítulo y es objeto principal de esta tesis doctoral.

La filagrina es la proteína estructural más importante de la piel puesto que dirige la diferenciación terminal de los corneocitos y garantiza la integridad de la epidermis, otorgándole la capacidad de actuar como interfase entre el cuerpo humano y el ambiente que lo rodea.

Las mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la filagrina (*FLG*) se consideran el principal factor de riesgo genético que predispone al desarrollo de DA (25, 26) y constituye la base de la hipótesis *outside-in*. La asociación entre genotipo *FLG* y DA se identificó por primera vez en el año 2006 en un estudio realizado en pacientes afectados de ictiosis vulgar (IV) (27). Este trabajo supuso un cambio en el conocimiento de la enfermedad, al demostrar que la deficiencia de filagrina es un acontecimiento clave en la fisiopatología de la DA ya que conduce a una disfunción de la barrera cutánea, pérdida de agua transepidérmica y xerosis que causa el eccema. Además, existe una mayor penetración de los alérgenos a través de la piel, lo que resulta en una mayor sensibilización alérgica y progresión de la marcha atópica (24, 28).

Desde que se conoce el importante papel de la filagrina en la epidermis, la DA ha pasado a ser considerada como un trastorno primario de la barrera cutánea (28), lejos de la consideración tradicional de patología asociada a disfunción del sistema inmune que se acompañaba de una alteración secundaria en la barrera cutánea. Según este nuevo enfoque patogénico, en todos los pacientes con DA existe un defecto inherente de la barrera que puede estar determinado por distintos mecanismos moleculares, siendo uno de los más importantes y frecuentes las mutaciones en el gen *FLG*.

No obstante, debe tenerse en cuenta, que a pesar del papel protagonista de *FLG* en el estudio de la enfermedad, la DA no es el ejemplo de enfermedad monogénica clásica. Además del gen *FLG*, recientemente, se han identificado hasta 31 loci como factores de riesgo relacionados con la DA en estudios de asociación del genoma (GWAS, *genome-wide association study*) (29). Estos genes están relacionados con la respuesta inmune o con la formación de la barrera epidérmica (30-32).

1.2.4.b Disfunción inmunológica en la Dermatitis Atópica.

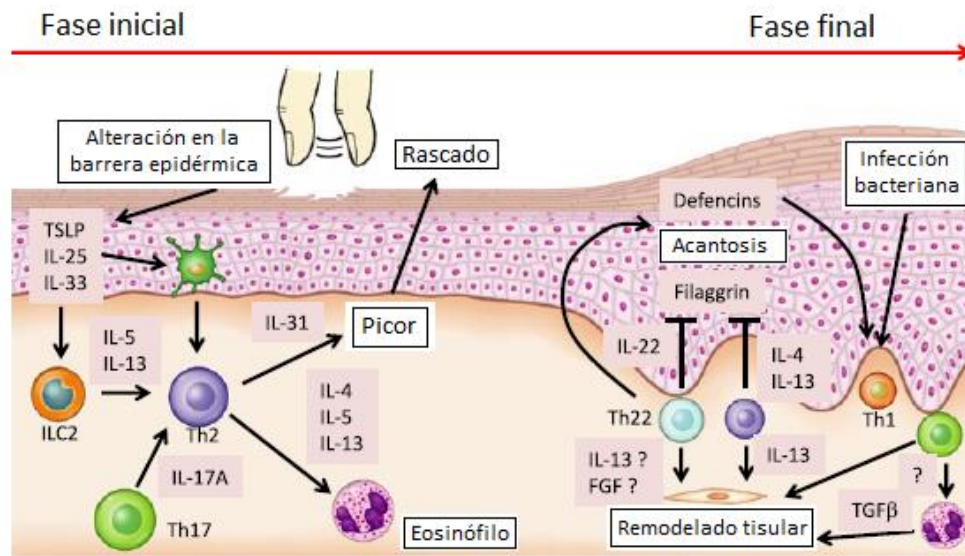
Existen diversas evidencias a favor de la hipótesis *inside-out* que otorga al sistema inmune un papel protagonista en la fisiopatogenia de la DA. Esta hipótesis propone que el eccema es el resultado de la activación de las células del sistema inmune junto con cambios en los queratinocitos, que dan lugar a la producción de citoquinas inflamatorias y de múltiples moléculas mediadoras que conduce a una pérdida de integridad de la barrera cutánea que a su vez favorece la introducción y presentación de alérgenos, lo que origina la reacción eccematosa (24).

Cuando se entra en contacto con diversos alérgenos, los individuos no atópicos desencadenan una reacción inmune de baja intensidad, con producción de anticuerpos IgG específicos para el alérgeno y una respuesta celular del tipo Th1, con producción de interferón-gamma (IFN- γ). En individuos atópicos, la pérdida de integridad de la barrera epidérmica (originado por factores genéticos o ambientales), permite la entrada constante de alérgenos en la piel y los queratinocitos dañados producen TSLP (linfopoyetina estromal tímica), que ha sido denominada como la molécula clave para el inicio de la reacción eccematosa. Los queratinocitos producen otras citoquinas como IL-25 e IL-33 que mediante la unión a sus receptores (IL17B e IL1RL1) en las células ILC2 estimulan la producción de IL-5 e IL-13 que generan una polarización de la respuesta inmune al activar la producción linfocitos Th2 (33) (Figura 2).

La respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción local aumentada de citocinas Th2 típicas (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31). Las dos primeras (IL-4 e IL-5) estimulan la reacción inflamatoria favoreciendo la migración y supervivencia de eosinófilos y mastocitos, e incrementando la liberación de histamina por los basófilos. Estas moléculas también inhiben la expresión del gen *FLG*, originando el consiguiente déficit adquirido de filagrina (34). De hecho, se ha demostrado que el uso de bloqueantes farmacológicos del receptor de IL-4 (IL-4R) muestran una eficacia terapéutica excelente para mejorar la función barrera epidérmica (35).

Figura 2. Rutas inmunológicas en las fases iniciales y avanzadas de la DA.

*Modificado de Otsuka *et al.* (33)



La IL-13 estimula la producción de IgE alérgeno-específicas con aumento de la IgE total, observado hasta en un 80% de los pacientes con DA. Esta inmunoglobulina se une al mastocito provocando su degranulación y secreción de moléculas inflamatorias (histamina, triptasa, leucotrienos, prostaglandinas, quininas, etc.) que potencian la reacción inflamatoria. No hace mucho que se ha descubierto que la producción de IL-31 es la responsable del prurito que origina el rascado (36) (figura 2).

En las fases más crónicas del eczema, la respuesta aguda inicial de tipo Th2 pasa a ser de tipo Th1. En este patrón de respuesta bifásica es clave la IL-22. La IL-22 actúa sobre los queratinocitos estimulando la producción de péptidos antimicrobianos, como las defensinas, que inducen la aparición de células Th1 productoras de IFN-γ en las lesiones crónicas. Por otro lado, en respuesta a la IL-22, los queratinocitos proliferan, dando como resultado una hiperplasia epidérmica difusa, denominada acantosis.

La IL-22 (al igual que IL-4 e IL-13 en la fase aguda) inhibe la expresión de genes relacionados con la barrera epidérmica, como *FLG*, loricrina (*LOR*) e involucrina (*IVL*). El déficit de estas proteínas origina mayor susceptibilidad frente a infecciones bacterianas.

1.2.4.c Factores Ambientales: condiciones climáticas y geográficas.

La influencia del clima sobre la prevalencia de la DA se demostró ampliamente en el año 2007 en los estudios realizados por el *National Survey of Children's Health* y por el *National Climate Data Center and Weather Service* de los Estados Unidos (37). Este estudio demostraba que las áreas con mayores temperaturas medias, menor precipitación y mayor índice de exposición a radiación ultravioleta (RUV), se asociaban a una menor prevalencia de eccema pediátrico. Por otro lado, las regiones geográficas con mayor humedad ambiental, alta precipitación y bajo índice de exposición a RUV se asociaron con aumento de la prevalencia de la enfermedad (37).

Curiosamente, aunque se demostró que el aumento de la humedad relativa tiene un efecto protector frente a la DA a nivel general, al analizarlo individualmente, el aumento de la humedad relativa se asocia a un aumento del eccema. Esta discrepancia se entiende porque las zonas del país con más lluvias, son a su vez las zonas donde más disminuye la exposición a la radiación UV por la cobertura de las nubes, y a su vez, las regiones donde sus habitantes pasan más tiempo en interiores expuestos a una menor humedad relativa debido al mayor uso de la calefacción interior (37).

Otro aspecto que requiere mención en la descripción epidemiológica de la DA es la influencia de la estacionalidad, considerado por muchos autores como un tema controvertido. Las cifras que se dan entre los distintos estudios sobre el empeoramiento de la DA durante el otoño y el invierno varían del 33% al 88%. El frío y la baja humedad ambientales serían los responsables de los empeoramientos estacionales visibles, sobre todo en climas fríos o extremos. En nuestro país, en un estudio diseñado a partir de una encuesta telefónica los pacientes referían un empeoramiento en los meses fríos, ya que padecían lesiones con más frecuencia en invierno que en verano (un 65% frente al 28%) (38).

1.2.4.d Factores Ambientales: alérgenos.

Ya se ha comentado (apartado 1.1) que la DA se incluye dentro del espectro de enfermedades alérgicas que se manifiestan típicamente en la infancia, y que preceden el desarrollo de la marcha atópica. Uno de los pasos de este proceso es el desarrollo de alergia frente a diferentes alimentos, que ha demostrado tener, en algunos casos, un papel patogénico en el desarrollo de DA (39). De acuerdo con diferentes estudios, un 50-75% de los pacientes con DA de inicio temprano están sensibilizados frente a uno o más alérgenos (40), mientras que los pacientes con un inicio más tardío se sensibilizan con menor frecuencia (41).

Estos resultados apoyan el papel de los alérgenos en el desarrollo y patogenia de la DA, especialmente en la exacerbación y brotes. Se ha demostrado que la retirada profiláctica de los alimentos más alergénicos (huevo, leche y cacahuete) de las dietas de los niños (y de las madres en fase de lactancia), así como, evitar la exposición a los aeroalérgenos más comunes (polen, hongos, animales...) conlleva una mejoría clínica e incluso remisión de la enfermedad (7, 22, 42).

1.2.4.e Factores ambientales: estilo de vida.

Existe una notable influencia del modo de vida en la prevalencia de la DA. En general, las cifras de prevalencia son mayores en áreas urbanas y países desarrollados, es decir, en aquellas zonas que se relacionan con el “modo de vida occidental”. Esto se apoya en la teoría de que la mayor higiene en las sociedades industrializadas tendría como consecuencia una menor exposición de agentes ambientales de todo tipo que hace que los pacientes tengan una menor maduración del sistema inmunológico y se defiendan peor frente a los agentes ambientales que pueden estar implicados en el desarrollo de la DA. De esta forma, las diferencias de prevalencia entre los distintos países (o regiones de un mismo país) variarían por razones sociales o culturales (43). La prevalencia de la enfermedad entre niños de clases sociales menos favorecidas es casi la mitad que entre los niños nacidos en las clases sociales con mayor poder adquisitivo (8,9% vs 16,6% respectivamente) (44).

1.2.4.f Microorganismos.

Los pacientes con DA están altamente predispuestos a desarrollar infecciones cutáneas bacterianas y fúngicas, principalmente por *Staphylococcus aureus* debido a la colonización activa del estrato córneo, daño de la barrera cutánea o una respuesta inmune defectuosa (45, 46). Debido a ello se han realizado numerosos estudios acerca del microbioma cutáneo en la DA que apoyan la existencia de una relación entre la alteración del microbioma cutáneo y el deterioro de la barrera epidérmica (47, 48).

El paciente atópico tiene en su piel sana (no lesional) un porcentaje de colonización por *S. aureus* mayor que los sujetos sanos (8-100% frente a 5-30% respectivamente) (49). Por otro lado, la aparición de brotes agudos de la enfermedad se asocia con una expansión de *S. aureus* sobre la piel lesionada (107 microorganismos/cm² de piel) junto a una pérdida de biodiversidad del microbioma de la piel (50).

Los microorganismos presentes en las lesiones cutáneas destruyen el tejido epidérmico al secretar enzimas, proteínas proinflamatorias y toxinas. Además estimulan reacciones alérgicas secundarias por lo que cuando el eczema se inicia y comienza el rascado se autoeczematiza y crece lo que contribuye a una inflamación crónica de las lesiones cutáneas atópicas (46). Se ha sugerido que la estrategia por la cual *S.aureus* sería capaz de exacerbar o de mantener la inflamación cutánea en la DA es por medio de la secreción de un grupo de enterotoxinas (A, B y TSST-1) que se comportan como superantígenos. Estas son capaces de estimular la activación de células T a través de su receptor (TCR) de macrófagos tisulares (células de Langerhans) produciendo IL-1, TNF e IL-12, y de linfocitos de sangre periférica en combinación con la IL-4, llevando a un incremento de la síntesis de Ig E y expresión del receptor Fc Ig E (51, 52).

Se ha encontrado una correlación directa entre la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a los superantígenos de *S.aureus* y/o *Malassezia furfur* y la gravedad de la DA. El tratamiento con antibióticos antiestafilocócicos (y/o antifúngicos) en combinación con esteroides tópicos genera una reducción significativa de la gravedad de la enfermedad cutánea.

1.2.5. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la DA es eminentemente clínico ya que no existe ningún marcador biológico disponible ni lesiones patognomónicas específicas de la enfermedad. El diagnóstico se establece a partir de un conjunto de lesiones y manifestaciones clínicas que concurren en un paciente (7).

La ausencia de pruebas diagnósticas hace necesario la existencia de criterios clínicos para establecer el diagnóstico. Los primeros criterios clínicos que se establecieron para el diagnóstico de la DA fueron los elaborados en el año 1980 por Hanifin y Rajka (53), y estaban basados en una serie de criterios mayores y menores, de forma que el diagnóstico lo daba la presencia de 3 o más criterios mayores junto a 3 o más criterios menores (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de Hanifin y Rajka para el diagnóstico de la Dermatitis atópica.

Criterios mayores (*)	- Quelitis.
- Prurito.	- Conjuntivitis recidivante.
- Morfología y distribución característica.	- Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan.
- Carácter crónico y recidivante.	- Queratocono.
- Historia personal o familiar de atopia.	- Catarata subcapsular anterior.
	- Ojeras u oscurecimiento periocular.
	- Palidez facial o eritema en la cara.
Criterios menores (*)	- Ptiriasis alba.
- Xerosis.	- Pliegues en la parte anterior del cuello.
- Ictiosis/exageración pliegues palmares.	- Prurito provocado por la sudoración.
- Reactividad cutánea inmediata (tipo I) a los test cutáneos.	- Intolerancia a la lana y los solventes de las grasas.
- Elevación de valores séricos de IgE.	- Acentuación perifolicular.
- Edad precoz de comienzo.	- Intolerancia a algunos alimentos.
- Tendencia a infecciones cutáneas y déficit de inmunidad celular.	- Evolución influencia por factores ambientales y emocionales.
- Eczema de pezón.	- Dermografismo blanco.
- Tendencia dermatitis inespecífica, pies y manos	

(*) Han de cumplirse tres o más criterios mayores y tres o más criterios menores

Los criterios de Hanifin y Rajka han sido considerados como el *gold standard* para el diagnóstico de la DA. Pero estos criterios son muy exhaustivos, y únicamente podían ser aplicados en el contexto de ensayos clínicos, por lo que más tarde se simplificaron (54). Se estableció como criterio primario, que debía cumplirse siempre, la presencia de prurito, el resto se consideraron criterios secundarios y al menos tenían que cumplirse dos de ellos para llegar al diagnóstico (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de Hanifin y Rajka modificados.

Rasgo primario (*)

- Prurito (debe estar presente en todos los casos activos).

Rasgos secundarios (*)

- Distribución de erupción (historia o presencia)
 - Niños: cara y zonas de extensión, Adultos: compromiso flexural
 - Historia personal o familiar de atopia (asma o fiebre del heno).
 - Dermatitis crónica o recurrente. Comienzo de la erupción desde los dos años de edad.
 - Historia de piel seca generalizada.
-

(*) *Ha de cumplirse el rasgo primario y al menos dos rasgos secundarios.* Criterios de Hanifin y Rajka modificados por el Grupo de trabajo en Dermatitis Atópica (AAAAI, ACAAI, JCAAI). AAAAI=American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. ACAAI= American College of Allergy, Asthma and Immunology. JCAAI=Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology.

A lo largo de los siguientes años, se establecieron otros criterios diagnósticos como los del grupo británico (*U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis*) (55) o incluso otros criterios específicos para adultos y adolescentes (10). Actualmente, existen unos criterios diagnósticos que se pueden considerar universales y que fueron establecidos por la *American Academy of Dermatology* en una conferencia de consenso en el año 2003 (56) (Tabla 5).

Tabla 5. Criterios diagnósticos de DA (Consenso *American Academy of Dermatology*, 2003).

Criterios Esenciales; si están todos son suficientes para el diagnóstico.

- Prurito.
- Curso crónico, recidivante.
- Cambios eczematosos con patrones específicos según la edad: cara, cuello y superficie de extensión de miembros en lactantes y niños. Lesiones flexurales presentes o previas a cualquier edad. Respeto de pliegues axilares/inguinales.

Criterios Importantes; ayudan a avalar el diagnóstico.

- Edad de comienzo temprana.
- Atopia (historia personal o familiar, hiperreactividad IgE).
- Xerosis

Criterios Asociados; ayudan a sugerir el diagnóstico.

- Queratosis pilar. Ictiosis vulgar. Hiperlinealidad palmar.
 - Respuestas vasculares atípicas (palidez facial, dermatografismo blanco, blanqueo retardado).
 - Acentuación perifolicular/liquenificación/prurigo.
 - Cambios oculares/periorbitarios.
 - Lesiones periorales/periauriculares.
-

Estos criterios servirían para el diagnóstico de DA siempre y cuando se hayan excluido otros cuadros cutáneos con manifestaciones similares como el linfoma cutáneo, psoriasis, inmunodeficiencias, ictiosis o dermatitis seborreica, fundamentalmente.

1.2.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

La DA se considera como una enfermedad inflamatoria crónica y recurrente de la piel caracterizada por la presencia de prurito intenso, eritema, xerosis, exudación, formación de costras y descamación. La forma más habitual de la enfermedad es el eczema, cuyo aspecto clínico y su localización habitual varía en función de la edad del paciente.

En los neonatos, la DA se reconoce poco después del nacimiento, se presenta como placas eritemato-edematosas que evolucionan con erosiones y descamación que puede afectar a toda la superficie corporal, generalmente excluyendo el área del pañal. El eczema se acompaña de xerosis y de picor, muchas veces incoercible, que lleva a un rascado excesivo que da lugar a erosiones y el desarrollo posterior de infecciones secundarias. Por otro lado, el picor generalizado puede impedir conciliar el sueño y generar una situación de estrés e irritabilidad en el bebé.

En la primera infancia, el eczema suele predominar en las mejillas y superficies extensoras de los miembros (dermatitis flexural en fosa antecubital y poplítea). Con el tiempo, las lesiones pueden extenderse potencialmente a cualquier lugar del cuerpo, excepto el área del pañal y la nariz. Las lesiones son menos agudas, eccematosas, causando piel áspera o agrietada, liquenificación y engrosamiento.

En el adolescente y paciente adulto, la xerosis es prominente y las lesiones son, preferentemente, unas placas secas, liquenificadas e hiperpigmentadas predominando su localización en los grandes pliegues (cuello, fosas antecubital y poplítea). Es característica la palidez de la piel, el eritema y la descamación alrededor de los ojos pudiéndose observar los pliegues de Dennie-Morgan.

La dermatitis atópica puede manifestarse no sólo como eczema, sino como otras muchas lesiones diferentes, como son la dermatitis de párpados (blefaritis atópica), de los labios (queilitis atópica), de las palmas y plantas (dishidrosis, dermatosis plantar juvenil), las lesiones aisladas (prúrigo atópico), la dermatitis de las yemas de los dedos (pulpitis atópica), lesiones en placas (eczema discoide o eczema numular), y otras.

Por otra parte, los niños con dermatitis atópica son propensos a padecer ciertas enfermedades, de muy diversa índole como urticaria, dermatitis alérgica de contacto (a metales, sobre todo), reacciones cutáneas a picaduras de insectos, alergia a penicilinas u otras. También se sabe que los atópicos sufren con mayor frecuencia enfermedades infecciosas de la piel (molusco contagioso, verrugas virales, infección de lesiones de eczema, etc.) y enfermedades del sistema inmunológico tan variadas como la celiaquía, la alopecia o el vitíligo.

Existen varios factores desencadenantes responsables de los brotes característicos de esta enfermedad recurrente:

- Ropa de lana. Se conoce que el contacto con la lana, especialmente en la infancia, es un desencadenante del prurito y del rascado (57).
- Alérgenos ambientales. La exposición a alérgenos o contaminantes ambientales tales como ácaros del polvo, pólenes, mohos, humo de cigarrillos y la caspa de los animales puede exacerbar los síntomas de AD (58).
- Alérgenos alimentarios. El papel de la alergia alimentaria en el desarrollo de la DA es controvertido. Se conoce que los alérgenos de los alimentos contribuyen aproximadamente al 40% de los casos de DA en la infancia, pero no son la causa de la enfermedad (59). Por ello debe prestarse especial atención a la retirada de alimentos en edad infantil, sirva como ejemplo el cacahuete, uno de los más alergénicos pero cuya retirada no ha demostrado mejoría de la enfermedad (60).
- La tensión física o emocional como factor desencadenante del prurito y el rascado.

1.2.7. TRATAMIENTO.

A modo de resumen, y sin entrar en detalles específicos puesto que no es el objetivo de este trabajo, se comentan las medidas generales preventivas en el tratamiento de la DA (Tabla 6) así como las principales terapias farmacológicas utilizadas según la gravedad de la enfermedad (Tabla 7).

Tabla 6. Medidas generales preventivas en el tratamiento de la DA.

Con carácter general se evitarán todas aquellas circunstancias que producen prurito en condiciones normales, efecto que suele ser mucho mayor en los atópicos.

- Temperatura ambiental; debe evitarse la temperatura ambiental elevada y el uso de ropa de abrigo excesiva.
- Humedad ambiental; deben evitarse ambientes secos y cálidos (calefacciones).
- Exposición solar; suele resultar beneficiosa en la dermatitis atópica, pero debe evitarse siempre la quemadura solar. Algunos pacientes tienen mala tolerancia al sol e incluso pueden sufrir agravamiento de sus lesiones.
- Ropa; evitar el contacto directo de la piel con lana, plásticos, gomas, etc.
- Alimentos; alimentos excitantes, como el café, el cacao y el alcohol, incrementan el prurito y son contraproducentes. Otros alimentos, por su contenido en histamina (ej.: fresas, marisco), pueden desencadenar prurito. Exceptuando estas circunstancias, no es necesario efectuar restricciones dietéticas en la dermatitis atópica.
- Higiene; se deben evitar baños con agua muy caliente o jabones agresivos. Es preferible la ducha con agua templada y geles de baño de pH ácido.
- Emolientes; la aplicación una o varias veces al día de una crema emoliente (“hidratante”) en todo el cuerpo es una medida esencial en el tratamiento de la dermatitis atópica. El momento más adecuado para aplicar la crema es inmediatamente tras la ducha o el baño.
- Rascado; se debe evitar el rascado.

Tabla 7. Formas de tratamiento de la DA.

Tratamiento de las formas leves

- Puede ser suficiente el empleo de las medidas generales (Tabla 6).
- En fases de agudización o en lesiones eccematosas: corticoide tópico de potencia baja o media, durante 5-10 días.
- En niños mayores de 2 años y adultos, como alternativa a la utilización de corticoides, puede aplicarse pimecrolimus crema al 1%.

Tratamiento de las formas de intensidad moderada

- Las medidas generales deben seguirse de forma constante.
- Combinar el uso de corticoides de potencia baja y media según la evolución.
- Como alternativa a los corticoides tópicos puede emplearse pimecrolimus crema al 1%, en niños mayores de 2 años y adultos.
- En caso de prurito intenso: Antihistamínicos anti-H1, vía oral. No deben emplearse nunca antihistamínicos por vía tópica.
- En lesiones localizadas y muy crónicas pueden emplearse breas y derivados.

Tratamiento en las formas graves

- Las medidas generales deben seguirse de forma constante.
- Corticoides tópicos de potencia baja, media o alta, según la evolución.
- Antihistamínicos orales de primera generación mientras exista brote o prurito.
- Asociación de antibióticos tópicos frente a *S. aureus* junto a los corticoides.
- Corticoides orales en casos graves que no respondan a tratamiento anterior.
- Dupilumab inyección subcutánea, 200-300 mg, cada 2 semanas.

Formas muy graves

- Ingreso hospitalario
- Tratamiento similar al descrito en las formas graves.

Tabla 7. Formas de tratamiento de la DA.

Formas rebeldes al tratamiento (*)

- Tacrolimus tópico.
- Psicofármacos para control del prurito.
- Fototerapia (mayores de 13 años).
- Metotrexato oral
- Azatioprina oral
- Ciclosporina oral

(*)La dermatitis atópica tiene un curso habitual en brotes. Se entienden como rebeldes al tratamiento los casos en que un brote determinado no remite, no aquellos en los que los brotes se repiten.

1.3. FILAGRINA

1.3.1. INTRODUCCIÓN.

La principal función de la piel es actuar como una barrera que separa el medio interno del medio externo, protegiendo de agentes agresores exógenos y minimizando la pérdida de agua y otros componentes fundamentales del organismo hacia el exterior (61). En el desarrollo de la barrera cutánea destaca la filagrina, tanto por su papel fundamental en la diferenciación epidérmica terminal como por su implicación en algunas de las enfermedades dermatológicas más frecuentes, como la DA o la IV (62).

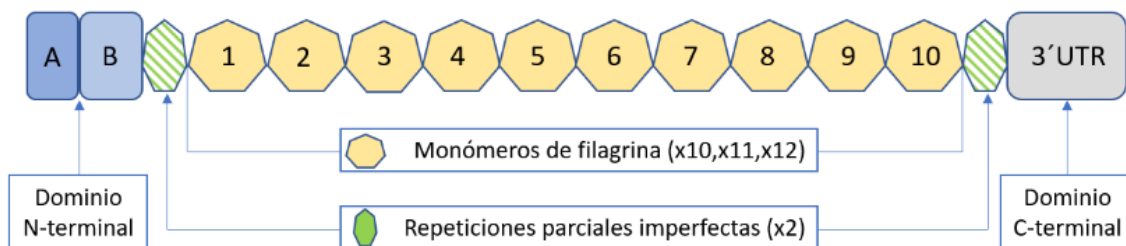
La filagrina es una importante proteína epidérmica estructural que fue identificada por primera vez en 1977 por Dale (63) como una proteína insoluble, rica en histidina que fue co-purificada junto a filamentos intermedios de queratina en extractos epidérmicos. Su nombre procede del acrónimo de *filament-aggregating protein* en relación a su papel fisiológico principal como proteína que produce una agregación y compactación de los filamentos intermedios de queratina en el estrato córneo.

1.3.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA FILAGRINA.

La filagrina se sintetiza en forma de un precursor proteico denominado profilagrina que es el principal componente de los gránulos de queratohialina del estrato granuloso de la epidermis, y representa el 6% del contenido proteico total de la epidermis. Esta proteína precursora es un polímero de elevado peso molecular (>400 kDa), rica en aminoácidos serina (25%), glicina (14%) e histidina (11%), que presenta un carácter polimórfico, pudiendo contener 10, 11 o 12 repeticiones de monómeros de filagrina, de 324 aminoácidos cada una (37 kD). La variante más frecuente de profilagrina es la que contiene 11 monómeros (51,5%) seguida de la de 10 (33,9%) y la de 12 (14,6%) (64). Estos monómeros están flanqueados por dos repeticiones parciales imperfectas y por dominios N- y C-terminales (Figura 3).

El dominio N-terminal está compuesto a su vez por 2 subdominios A y B. El subdominio A contiene dos lugares de unión al calcio (*S100-like calcium-binding domain*) (65). La unión del calcio a este subdominio es el desencadenante de los cambios conformacionales en la molécula de profilagrina que dan inicio a su procesamiento (62, 66). Por su parte, el subdominio B contiene una señal de localización nuclear que facilita la translocación del fragmento N-terminal escindido al núcleo (67). Se ha sugerido que este dominio, una vez dentro del núcleo, pudiese tener un papel importante en el ensamblaje del estrato córneo (68) y en la anucleación del queratinocito en su transformación a corneocito aplanado (69). Respecto al dominio C-terminal (3'UTR), se sabe que es imprescindible para el correcto procesamiento de la profilagrina, aunque su función exacta se desconoce (62).

Figura 3. Esquema de la estructura molecular de la Profilagrina.



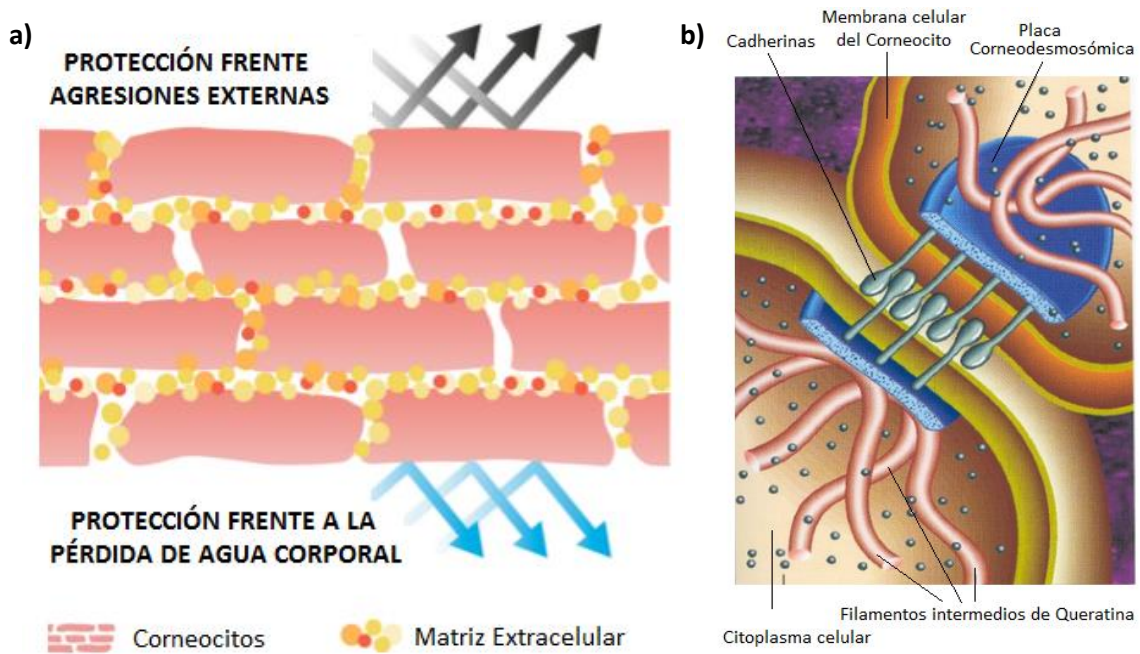
1.3.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FILAGRINA.

El estrato córneo epidérmico constituye la barrera física que separa el medio interno del medio externo. La barrera cutánea se origina de forma continua como consecuencia de la diferenciación y expresión proteica de los queratinocitos desde la capa basal a la capa granulosa. En los pasos finales de este proceso de diferenciación, los queratinocitos sufren cambios profundos en su estructura que provocan su pérdida nuclear, transformándose en células planas anucleadas conocidas como corneocitos.

Los corneocitos se organizan en el estrato córneo formando una estructura conocida como "ladrillos y cemento" (*bricks and mortar*) que en conjunto se le conoce con el nombre de envoltura cornificada (EC) o envoltura de células cornificadas y constituye la verdadera función barrera ya que protege al medio interno de las agresiones externas, y evita la pérdida de agua corporal (Figura 4a).

En esta composición los ladrillos serían los propios corneocitos anucleados, fuertemente unidos entre sí mediante uniones celulares estrechas o corneodesmosomas (Figura 4b), y el cemento correspondería a una matriz extracelular hidrófoba que provee a estas células de resistencia mecánica y química (70-72). Esta matriz extracelular presenta dos capas, una proteica y otra lipídica. La envoltura proteica contribuye a las propiedades biomecánicas de la EC como resultado de diversos *crosslink* entre distintas proteínas estructurales: filagrina, involucrina, loricrina, queratina, elafina y cistatina A. La envoltura lipídica, está formada mayoritariamente por ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres. Se localiza en el exterior de la capa proteica y está unida covalentemente a ésta mediante enlaces tipo éster, proporcionando un recubrimiento de tipo teflón a las células que ayuda a prevenir la pérdida interna de agua y evita la entrada de sustancias solubles en ella.

Figura 4. Estructura de la envoltura cornificada y detalle de un corneodesmosoma.



a) Estructura en ladrillos y cemento de la envoltura cornificada. Esta formación constituye la función barrera epidérmica que protege al medio interno de las agresiones externas y evita la pérdida de agua del medio interno debido a su impermeabilidad. En esta composición los ladrillos serían los corneocitos y el cemento la matriz extracelular hidrófoba. b) Estructura molecular detallada de un corneodesmosoma. Los corneodesmosomas están formados por glicoproteínas de transmembrana extracelular de la familia de las cadherinas (desmogleina y desmocolina) que se unen fuertemente a los filamentos intermedios de queratina intracelulares a través de la placa corneodesmosómica que incluyen placoglobina, desmoplakina y placofilina.

El aumento de la concentración de calcio en el estrato granuloso de la epidermis supone la señal que produce la liberación del contenido de los gránulos de queratohialina, de forma que la profilagrina queda expuesta a la acción de enzimas proteolíticas (furina, endoproteinasa-1, calpaína-1, matriptasa y elastasa-2) que la fragmentan y defosforilan en 10-12 monómeros idénticos de filagrina (73, 74).

Los monómeros de filagrina libre se unen a los filamentos intermedios de queratina produciendo su agregación y compactación, lo cual provoca un colapso y aplanamiento del queratinocito, transformándolo en corneocito (75). Coincidiendo con este proceso, la célula expresa proteínas estructurales que conforman la porción proteica de la EC (involucrina, loricrina, queratina, elafina y cistatina A) (76, 77) a la cual se unen, por acción de las transglutaminasas, los filamentos intermedios de queratina agregados por la filagrina (72).

Además, el aumento del calcio también provoca la liberación del contenido de los cuerpos laminares, gránulos ricos en lípidos y enzimas originados en el aparato de Golgi. A partir de estos lípidos y de la acción de las enzimas liberadas, se constituirá la porción lipídica de la EC y la matriz extracelular del estrato córneo (72, 76, 78).

A pesar de que la filagrina tiene como función principal, y que da origen a su nombre, la agregación y compactación de los filamentos de queratina, tan sólo un pequeño porcentaje de la filagrina se une a las proteínas del EC. La mayor parte de los monómeros de filagrina son degradados por distintas proteasas (caspasa-14, calpaína y bleomicina hidrolasa), originando la liberación de distintos aminoácidos higroscópicos que constituyen el factor humectante natural (FHN), responsable de la impermeabilidad del estrato córneo (79).

Por otro lado, la degradación de algunos de estos aminoácidos da lugar a la formación de ácidos orgánicos. La degradación de histidina por la histidasa (histidina-amonio liasa) da origen al ácido trans-urocánico (AUC), que tiene un efecto fotoprotector frente a la RUV y ha demostrado ser un mediador clave en la inmunosupresión inducida por los UVB (80-82). Además, junto con la pirrolidona-5-carboxílico (PCA, derivado de la glutamina), son los principales factores responsables del mantenimiento del pH ácido

en el estrato córneo(83), el cual es fundamental por su papel en el metabolismo y organización de los lípidos de la matriz extracelular, por su acción antimicrobiana y por su papel regulador de la actividad enzimática y de la descamación fisiológica (84, 85).

1.3.4. CONSECUENCIAS DEL DÉFICIT DE FILAGRINA EN LA BARRERA CUTÁNEA.

Como ya se ha comentado, la filagrina tiene un papel protagonista en la organización de la barrera epidérmica; por sí misma al formar parte de la EC, así como por sus derivados proteolíticos responsables de la impermeabilidad y mantenimiento del pH, esenciales para la funcionalidad del estrato córneo (85). Por esta razón, el déficit de filagrina (primario o adquirido) tiene una importante repercusión sobre la barrera epidérmica a distintos niveles:

1.3.4.a Alteración en la expresión y organización proteica epidérmica.

El primer defecto asociado al déficit de filagrina es la alteración en la arquitectura intra y extracelular de los queratinocitos lo que contribuye a una alteración de la función barrera de la EC (70, 84). A nivel microscópico-histológico se observa que el estrato córneo epidérmico es más grueso de lo normal y la capa granulosa está muy reducida o incluso ausente en estos pacientes (86). A nivel celular existe alteración en la agregación de los filamentos intermedios de queratina del citoesqueleto y una disminución de los gránulos de queratohialina, así como de la densidad de corneodesmosomas y de uniones intracelulares estrechas (84).

1.3.4.b Aumento del pH epidérmico y pérdida de hidratación.

Directamente asociado con el déficit de filagrina, se produce una disminución marcada de FHN y en consecuencia de la hidratación del estrato córneo, siendo responsable de la xerosis persistente en estos pacientes. Por el mismo motivo, existe un déficit de aminoácidos higroscópicos derivados, especialmente AUC y PCA. El déficit de estas dos moléculas origina una alcalinización del pH de la superficie cutánea (70, 83, 87).

No obstante, existe una regulación al alza compensatoria del transportador de sodio-hidrógeno parece contrarrestar este aumento de pH, lo que podría explicar por qué el aumento del pH de la piel no está siempre presente en los portadores de mutaciones en *FLG* (88, 89).

1.3.4.c Aumento de la inflamación, el prurito y la inmunoreactividad.

El aumento persistente del pH también es responsable de la activación de serin-proteasas (o calicreínas) que además de los efectos destructivos directos inducen una respuesta inflamatoria mediada por Th2 al producir la activación de la proteína TSLP de los queratinocitos (25, 90-92). El receptor TSLP tiene elevados niveles de expresión en los queratinocitos de piel lesional de pacientes con DA, y su síntesis puede estar inducida por la exposición a alérgenos, microorganismos o lesiones mecánicas (92-94). La activación de TSLP es responsable del prurito ya que estimula a diversos nervios cutáneos para liberar neuropéptidos que inducen picazón (95).

Debido a una mayor actividad de las proteasas endógenas y/o exógenas, se promueve esta polarización hacia Th2 una serie de citoquinas liberadas por los queratinocitos alterados como las IL-1 o la TSLP que actúa sobre los linfocitos Th2 y células de Langerhans (33).

1.3.4.d Alteración en la expresión de lípidos en el estrato córneo.

Debido a las anomalías citoesqueléticas descritas anteriormente, y el aumento del pH del estrato córneo, se originan alteraciones en la maduración y exocitosis de los cuerpos laminares, provocando una distribución no homogénea de los lípidos de la matriz extracelular de la EC (84, 85).

Por otro lado, la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IFN-gamma, inhiben la actividad de esfingomielinasas y elongasas de ácidos grasos (ELOVL1 y ELOVL4) que se requieren para generar ceramidas a partir de ácidos grasos de cadena muy larga, como consecuencia en la DA se produce un descenso en el nivel de ceramidas y ácidos grasos no saturados omega-6, y un incremento de colesterol y fosfolípidos en la epidermis (96).

1.3.4.e Aumento del riesgo de infecciones bacterianas.

El aumento del pH, secundario al déficit de filagrina, origina mayor susceptibilidad a la colonización de la superficie epidérmica por *S. aureus*. Como ya se ha comentado en el apartado 1.1.4.d del presente trabajo, la toxina α de *S. aureus* ataca y destruye de manera preferente a los queratinocitos deficientes en filagrina, puesto que la expresión normal de esta molécula asegura la secreción de esfingomielinasa, reduciendo así el número de sitios de unión a la toxina y riesgo de colonización por este microorganismo (97). Clínicamente, esto se traduce en un aumento de 7 veces en el riesgo de infecciones bacterianas en pacientes con mutaciones *FLG* y DA en comparación con la observada en pacientes con DA sin mutaciones en *FLG* (98). Además, se ha demostrado que los pacientes afectados de DA con mutaciones en *FLG* presentan mayor riesgo de sobreinfección por eccema herpético (99).

1.3.4.f Asociación entre las mutaciones en el gen *FLG* y niveles de vitamina D.

Diversos estudios poblacionales han revelado que los individuos portadores de mutaciones en el gen *FLG* tienen niveles séricos de vitamina D un 10% superiores a los pacientes controles (25). Este hecho podría guardar relación con el menor nivel de AUC que presentan los europeos del norte y que determina mayor sensibilidad a la radiación UV (80, 100, 101). Según lo expuesto, podría pensarse que en latitudes con menor incidencia de radiación UV los portadores de mutaciones en *FLG* estarían más protegidos frente al desarrollo de enfermedades dependientes de vitamina D como el raquitismo y la osteomalacia (86).

Por otro lado, es importante destacar que numerosos trabajos científicos han demostrado que la relación estrecha entre la deficiencia de vitamina D y diferentes enfermedades dermatológicas como la DA, la psoriasis, el vitiligo, la micosis fungoide, el LES o la alopecia areata (102). En el caso de la DA, esta condición juega un papel esencial tanto en el desarrollo como en la gravedad de la enfermedad.

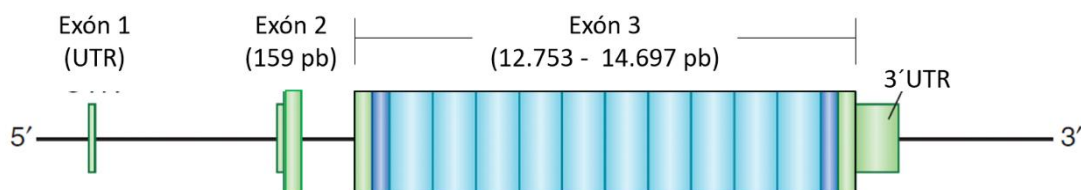
1.3.5. GEN *FLG*, MUTACIONES DESCRITAS Y ASOCIACIÓN CON LA DA.

El gen *FLG* (OMIM:135940) se localiza en el cromosoma 1, en la región 1q21.3, con coordenadas genómicas (GRCh38: 1:152,302,174-152,325,202). Está incluido dentro del complejo génico de diferenciación epidérmica de la región 1q21 que ocupa un tamaño de 2,05 Mb de ADN e incluyen, por este orden, los siguientes genes: cadena ligera de calpactina (*CAL1L*; 114085), tricohialina (*THL*; 190370), profilagrina (*FLG*; 135940), involucrina (*IVL*; 147360), cornifina-A (*SPRR1A*; 182265), loricrina (*LOR*; 152445), y calciclina (*CACY*; 114110) (103).

En 1989 McKinley-Grant *et al.* (104) aislaron por primera vez el cDNA del gen *FLG* y 3 años más tarde Presland *et al.* (66) lo secuenciaron y demostraron que el gen *FLG* codifica una poliproteína de elevado peso molecular (>400 kDa) con numerosas repeticiones, todas de la misma longitud (972 pb, 324 aminoácidos), de monómeros de filagrina, a la que se denominó profilagrina. Cada repetición presenta variaciones de una sola base en su secuencia, por lo que la filagrina humana consiste en una población heterogénea de moléculas de diferentes tamaños, cargas y secuencias.

Este gen consta de 3 exones y 2 intrones (Figura 5). La transcripción se inicia en el exón 2, de 159 pb. que únicamente codifica el subdominio A del extremo N-terminal. El exón 3 codifica la mayor parte de la proteína, constituyendo uno de los exones más grandes de todo el genoma (de 12.753 a 14.697 pb) (66). Es polimórfico con respecto al tamaño debido a las diferencias alélicas simples entre individuos y puede contener 10, 11 o 12 repeticiones de filagrina que se segregan a nivel familiar según un modelo mendeliano clásico (105).

Figura 5. Representación esquemática de la estructura génica de *FLG*.



Las secuencias de aminoácidos que codifican los extremos amino y carboxilo terminal de los monómeros están más conservadas que el resto de la molécula, al igual que las secuencias de las regiones 5' y 3' no traducidas. Se sospecha que la expresión génica está controlada a través de secuencias reguladoras CAT y TATA, un intrón en la región 5' no traducida (105).

A pesar de que la secuenciación del gen se consiguió en el año 1992, no fue hasta el año 2006 cuando se identificaran por primera vez mutaciones de pérdida de función en esta región génica, debido a que la longitud del gen y la presencia de numerosas secuencias repetitivas hacía que su secuenciación por PCR convencional fuese técnicamente complicada (27, 83). Las dos primeras mutaciones identificadas fueron R501X y 2282del4 pertenecientes a la primera región repetitiva del exón 3, descritas en 15 pacientes afectados de ictiosis vulgar (27). Estas mutaciones de pérdida de función de *FLG* fueron propuestas como un importante factor genético predisponente para el desarrollo de DA (26), lo que ha sido confirmado posteriormente en más de 30 estudios diferentes (85, 106-110) y 2 metaanálisis (111, 112).

En estos metaanálisis se establece que la haploinsuficiencia del gen *FLG* supone un importante factor de riesgo para el desarrollo de DA con una razón de recurrencia u *odds-ratio* (OR) de 3,12 (111) y 4,78 (112) respectivamente. Es decir, los portadores de mutaciones en el gen *FLG* tienen 4 veces más riesgo de sufrir DA que los no portadores. Pero no sólo es un factor de riesgo, sino que también es factor pronóstico puesto que los pacientes con DA y presencia de mutaciones en *FLG* (DA_{FLG}) presentan un inicio más temprano (113), mayor gravedad clínica (114), mayor tendencia a persistir en la edad adulta (115), mayor incidencia de eczema herpético (hasta 10 veces más) (99) y mayor sensibilización alérgica y desarrollo de múltiples alergias y asma, en comparación con aquellos pacientes afectados de DA y ausencia de mutación (DA_{no-FLG}) (85).

Otro dato que apoya la haploinsuficiencia de *FLG* en su relación con la DA es que aproximadamente el 50% de las formas moderadas-severas de la enfermedad se deben, al menos en parte, a mutaciones de pérdida de función, mientras que en las formas más leves-moderadas sólo se presenta mutación en un 15% de los pacientes (114).

Además, se ha establecido que la variación en el número de copias (CNV, *copy number variations*) de monómeros de filagrina en *FLG* tiene relevancia clínica y constituye un factor de riesgo dosis-dependiente para el desarrollo de DA (64). De este modo, aquellos sujetos con genotipo FLG 10-10 (cuyos 2 alelos codifiquen 10 monómeros de filagrina) tienen un riesgo 1,67 veces mayor de sufrir DA respecto a aquellos con genotipo FLG 12-12, y por cada monómero adicional este riesgo se reduciría con un OR de 0,88 (64).

Hasta el momento se han descrito un total de 119 variantes en *FLG* en la última revisión realizada con fecha 06/12/2019 en ClinVar, un recurso electrónico del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que recoge información sobre la variación genómica y su relación con la salud humana.

De las variantes identificadas, 13 corresponden con variantes del RNA-1 antisentido del gen *FLG* (FLG-AS1), 4 con el gen *FLG-2* asociado al complejo de diferenciación epidérmica y 5 están relacionadas con grandes duplicaciones de la región 1q21.1 que dan origen a una patología genética conocida como síndrome de duplicación del cromosoma 1q21.1.

El resto de variantes afectan específica y puntualmente a la secuencia del gen *FLG* y todas ellas son mutaciones de pérdida de función (*nonsense* o *frameshift*) que dan origen a una proteína anómala o trunca en su región C-terminal, con el resultado final de pérdida de proteína funcional en la epidermis. La mayoría de ellas, a pesar de que han sido propuestas como patogénicas, no se han asociado con ninguna enfermedad. Sólo 16, de todas las variantes señaladas, se han asociado con mayor o menor grado de evidencia con DA y/o IV (Tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones identificadas en FLG asociadas con DA o IV.

Mutación en cDNA	Mutación en proteína	Patología Asociada	Significado clínico	Última Revisión	Evidencias
c.5170G>T	p.Gly1724Ter	AD	Patogénica	Dic 18, 2017	Única
c.7801G>A	p.Asp2601Asn	DA, IV	VSI	Mar 6, 2017	Varias
c.2282_2285delCAGT	p.Ser761Cysfs	DA, IV	VSI	Ago 8, 2018	Varias
c.1501C>T	p.Arg501Ter	DA, IV	Patogénica	Ene 23, 2018	Varias
c.2379_2394	p.Leu794_Ser798	DA, IV	VSI	Jun 30, 2016	Única
c.7339C>T	p.Arg2447Ter	DA, IV	Patogénica	Oct 30, 2017	Varias
c.12064A>T	p.Lys4022Ter	IV	VSI	May 13, 2016	Varias
c.7189C>T	p.Gln2397Ter	IV	Patogénica	Mar 18, 2016	Única
c.2143C>T	p.Gln715Ter	IV	Patogénica	Dic 30, 2014	Única
c.3905C>A	p.Ser1302Ter	IV	Patogénica	Mar 18, 2016	Única
c.9887C>A	p.Ser3296Ter	IV	Patogénica	Jul 20, 2017	Varias
c.5717C>A	p.Ser1906Ter	IV	Probable Pat.	Mar 18, 2016	Única
c.6032_6034delTCC	p.Leu2011del	IV	VSI	Ago 7, 2018	Única
c.4279G>A	p.Ala1427Thr	IV	VSI	Oct 20, 2014	-
c.7661C>G	p.Ser2554Ter	DA, IV	Patogénica	Feb 1, 2007	-
c.10012A>T	p.Ser3338Cys	IV	VSI	Ene 1, 2017	Única

DA: dermatitis atópica, IV: ictiosis vulgar, VSI: variante de significado incierto. Se presentan sombreadas las variantes del gen *FLG* que serán objeto principal de estudio en esta tesis doctoral.

1.3.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN FLG

Las mutaciones en FLG muestran variaciones étnico-geográficas manifestadas en diferentes aspectos. En primer lugar, la prevalencia de mutaciones en FLG en población general, sería globalmente de un 7,7% a nivel europeo mientras que en asiáticos sería de un 3% (86, 116). En pacientes afectados de DA las cifras son muy variables, tanto en población Europea (con frecuencias que varían del 1% a casi el al 50%) (83), como en población asiática, con frecuencias del 15,7%, al 31,4% (117-119).

Otro aspecto a tener en cuenta es que las mutaciones detectadas en población europea, son diferentes de las detectadas en población asiática y también varía la frecuencia de las mismas, ya que mientras que en la población europea unas pocas son las mayoritarias, en la asiática todas se dan con frecuencias similares. Las mutaciones más frecuentes entre europeos son: R501X, 2282del4, S3247X, R2447X con una prevalencia del 7 al 10% (83, 111). Las dos mutaciones más prevalentes, R501X y 2282del4, representan el 48% de las encontradas en los pacientes con DA (25, 62).

En asiáticos estas mutaciones están ausentes y presentan su propio grupo étnico (120). El abanico de mutaciones descritas en población asiática es mucho más amplio que el de la población europea, sin encontrar ninguna que destaque específicamente sobre las demás, obteniendo frecuencias similares. La mutación 3321delA ha sido descrita como la más común con cifras que oscilan entre el 9,1% y 14,6% (117, 118, 121).

Centrando la atención en estudios europeos, llama la atención una clara diferencia de prevalencia poblacional entre norte y sur del continente. La mayoría de las publicaciones corresponden al norte, donde la frecuencia de mutación se sitúa en un 10%, con cifras que oscilan entre el 7% y 14% (85, 86). Respecto a la población sur-europea (Mediterránea), apenas existen 3 trabajos publicados hasta la fecha que evalúan la frecuencia de estas mutaciones; uno en población francesa (100), otro de población italiana (122) y otro de población Croata (123) con frecuencias del 4%, 0,5% y 2,6% respectivamente. En general se establece que la frecuencia de portadores de mutación en *FLG* en regiones norte europeas es de aproximadamente un 8-10%, y en regiones sur europeas de tan sólo el 1-4% (124).

En este entorno mediterráneo, se ha identificado que las mutaciones más prevalentes (R501X, 2282del4, R2447X) son las mismas que las observadas en el resto del continente (106, 125) y en conjunto, contribuyen a explicar más del 90% de la asociación entre las alteraciones en este gen y la DA (126).

En la población española, únicamente se ha encontrado un trabajo, publicado por Cubero *et al.* (127). Este trabajo se ha realizado sobre una población española (en la región de Zaragoza), tomando como grupo experimental pacientes asmáticos. La frecuencia poblacional obtenida para las mutaciones R501X y 2282del4 es del 2% y 1% respectivamente (127). A pesar de la falta de trabajos realizados en población española, como extremo sur del gradiente de latitud europeo, sería esperable obtener una tasa de mutación y frecuencia de las mismas, inferior a la de países Nórdicos y similares a las de otras poblaciones mediterráneas con las que está evolutivamente emparentado y geográficamente más cercano.

Se ha propuesto, que en este gradiente europeo aparentemente dependiente de la latitud, la mayor frecuencia de mutaciones en el gen *FLG* ofrezca algún tipo de ventaja de supervivencia a las poblaciones norteamericanas (122). Un ejemplo de ello es que los individuos portadores de mutaciones en el gen *FLG* tienen niveles séricos de vitamina D un 10% superiores a los pacientes controles (25). Este hecho podría guardar relación con el menor nivel de AUC que presentan los europeos del norte y que determina mayor sensibilidad a la RUV (80, 100, 101), de forma que podría pensarse que en latitudes con menor incidencia de RUV los portadores de mutaciones en *FLG* estarían más protegidos de desarrollar enfermedades como el raquitismo(86).

1.4. VITAMINA D

1.4.1. INTRODUCCIÓN.

En la última década se ha incrementado el interés por el estudio de la vitamina D, que se demuestra con un aumento considerable de las solicitudes de análisis de 25-OH-vitamina D (25(OH)D) en los laboratorios clínicos. Este aumento de la demanda es consecuencia del reconocimiento de una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D en la población general y del descubrimiento de que, además del papel ya conocido en relación al metabolismo fosfocálcico y mantenimiento óseo, la vitamina D está implicada en multitud de procesos fisiológicos del organismo, pudiendo intervenir en la génesis y prevención de enfermedades autoinmunes, del sistema nervioso, cardiovasculares, reproductivas, neoplásicas o infecciones (128).

1.4.2. ESTRUCTURA MOLECULAR Y SÍNTESIS DE LA VITAMINA D.

La vitamina D es una vitamina liposoluble, esencial para las funciones fisiológicas en el ser humano, que se puede obtener por dos vías: de forma exógena mediante la suplementación dietética o de forma endógena mediante la producción por la piel tras exposición solar, siendo ésta última la principal fuente de producción.

La síntesis endógena de vitamina D₃ (colecalfiferol) se produce en los estratos profundos de la epidermis y consiste en la fotoconversión de 7-dehidrocolesterol en previtamina D o precalciferol por acción de la RUV-B solar. La longitud de onda más favorable para la fotoconversión se localiza en el rango de 290 a 320 nm del espectro electromagnético. A temperatura corporal se produce una isomerización química, de forma que la previtamina D se transforma en vitamina D₃ a nivel de la membrana plasmática de los queratinocitos en un proceso que dura varios días. Finalmente, la vitamina D₃ producida en la epidermis alcanza la red capilar cutánea desde donde es transportada al hígado, unida a su proteína transportadora (DBP, *vitamin D binding protein*) para iniciar su transformación metabólica. La previtamina D₃, tiene baja afinidad por la DBP y permanece en la piel.

La síntesis de vitamina D3 en la piel depende de la edad, de la raza, de los polimorfismos de la 7-dehidrocolesterol reductasa y de la calidad e intensidad de la RUV-B presente en la luz solar (que varía con la estación y la latitud). En un estudio realizado en 2018 por la Universidad Politécnica de Valencia, se definen los tiempos mínimos de exposición solar necesarios para dotar al cuerpo de la cantidad de vitamina D recomendada (1.000 UI/día) en la población española. En los meses de invierno (enero), se necesitan 130 minutos de exposición solar, en los meses intermedios (octubre) son necesarios 30 minutos, mientras que en los meses más luminosos bastaría con 10 minutos (129).

El exceso de exposición solar es una causa infrecuente de intoxicación por vitamina D, ya que la misma RUV-B convierte el exceso de previtamina D3 en dos esteroides biológicamente inertes, lumisterol y taquisterol, evitando así posibles efectos tóxicos.

De forma minoritaria, se pueden obtener pequeñas cantidades de vitamina D3 a través de la dieta, a partir del consumo de alimentos ricos en vitamina D, como algunos pescados azules (salmón, arenque, atún y caballa), aceites de hígado de pescado, yema de huevo o alimentos enriquecidos, sobre todo de tipo lácteo, que contribuyen a los niveles séricos de vitamina D en algunas poblaciones deficientes. También puede obtenerse de la dieta vitamina D2 (ergocalciferol) que se encuentra en pequeñas cantidades en alimentos de origen vegetal (principalmente hongos) (Tabla 9).

Tabla 9. Aporte de vitamina D en determinados alimentos y por exposición a UVB

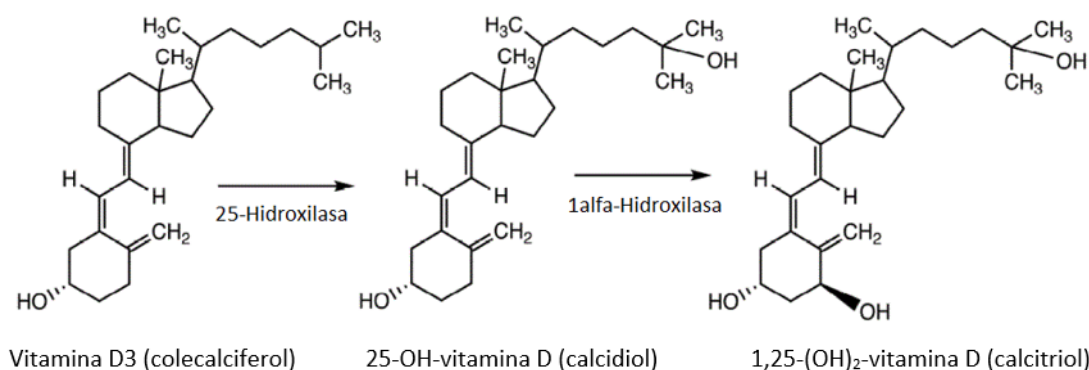
Fuente	Contenido en vitamina D
Champiñones secados al sol (100g)	1600 UI vitamina D2
Aceite de hígado de bacalao (5ml)	1360 UI vitamina D3
Salmón fresco silvestre (100g)	600-1000 UI vitamina D3
Salmón enlatado (100g)	300-600 UI vitamina D3
Sardinas enlatadas (100g)	500 UI vitamina D3
Arenque enlatado (100g)	250 UI vitamina D3
Atún enlatado (100g)	230 UI vitamina D3
Salmón fresco de cultivo (100g)	100-250 UI vitamina D2 o D3
Leche supl. vitD (250 ml)	120 UI vitamina D3
Champiñones frescos (100g)	100 UI vitamina D2
Zumo naranja supl. vitD (250ml)	100 UI vitamina D3
Huevos (unidad)	20 UI vitamina D2 o D3

Tablas de composición de alimentos del CESNID. 40 UI equivalen a 1µg de vitamina D2 o D3.

La vitamina D inactiva requiere dos pasos de hidroxilación para obtener la forma biológicamente activa. La primera hidroxilación, en la posición 25, se lleva a cabo en el hígado a través de un sistema enzimático (25-hidroxilasa) dependiente del citocromo P-450 (CYP2R13) presente en las mitocondrias y microsomas del hepatocito, dando lugar a la formación de 25-OH-vitamina D (25(OH)D) o calcidiol, siendo ésta la principal forma circulante de la vitamina D (Figura 6) y la que se determina de forma rutinaria en los laboratorios clínicos ante la solicitud de análisis en sangre de esta hormona.

La segunda hidroxilación, en la posición 1 (Figura 6), se produce principalmente en las células de los túbulos proximales del riñón mediante la enzima 1 α -hidroxilasa del sistema citocromo P450 (CYP27B) dando lugar a la 1,25-(OH)₂-vitamina D (1,25(OH)₂D) o calcitriol, la forma biológicamente activa de la vitamina D y la responsable de sus funciones biológicas. La que 1,25(OH)₂D es al menos 10 veces más potente que la 25(OH)D, aunque tiene una concentración circulante 1.000 veces inferior.

Figura 6. Estructura molecular de los precursores de la vitamina D



Ésta segunda hidroxilación puede producirse en otras localizaciones como la placenta, corteza cerebral, próstata, células epiteliales del colon, queratinocitos, macrófagos y linfocitos T. La 1,25(OH)₂D producida en estos tejidos extrarrenales no contribuye a los niveles circulantes ya que actúa localmente de forma paracrina o autocrina.

La vitamina D (y sus metabolitos) se transporta en sangre unida a DBP. Esta proteína transporta el 95-99% del total de la 25(OH)D y el 1-5% restante es transportado por la albúmina y/o lipoproteínas. Además de proporcionar un sistema de transporte, la DBP constituye el principal lugar de almacenamiento y de depósito de la 25(OH)D.

1.4.3. FUNCION BIOLÓGICA DE LA VITAMINA D.

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ realiza sus funciones biológicas mediante la regulación de la transcripción de genes a través de la activación de un receptor nuclear de alta afinidad por la vitamina D (VDR) en las células diana. El VDR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de esteroides y está presente en la mayoría de tejidos y células del organismo y tiene una afinidad 1.000 veces mayor por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ que por la $25(\text{OH})\text{D}$. Tras la unión $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR, el complejo se transloca al núcleo donde forma un heterodímero con el receptor del retinoide X (RXR). El complejo RXR-VDR se une a secuencias específicas de nucleótidos del ADN conocidas como elementos de respuesta de vitamina D, promoviendo la transcripción de más de 200 genes que codifican proteínas de gran importancia biológica produciendo así una amplísima variedad de efectos biológicos entre los que se incluye acciones hormonales endocrinas o autocrinas.

A nivel endocrino, la principal función biológica de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica. Actúa a varios niveles en el metabolismo de estos elementos: en el intestino delgado, promueve la absorción de calcio y fósforo, en el riñón estimula la reabsorción de calcio para reducir su pérdida tras el filtrado glomerular. En el hueso ejerce una acción dual; contribuye a aumentar los depósitos de este mineral en el compartimento óseo, al inducir la formación de nuevo hueso, aunque en cantidades muy altas interactúa con el ligando del receptor activador del factor nuclear K (RANK) de los preosteoclastos inmaduros estimulando su conversión en osteoclastos maduros que dan lugar a la resorción ósea, favoreciendo el paso de calcio y fósforo a la circulación. Por último, ejerce un efecto regulador sobre las glándulas paratiroides al inhibir la síntesis de hormona paratiroidea.

A nivel autocrino, el VDR está presente en la mayoría de tejidos y células del organismo. Muchos de estos órganos y células, incluyendo el cerebro, el músculo liso vascular, la próstata, la mama, y los macrófagos, no sólo presentan el VDR, sino que también tienen la capacidad para producir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Mediante este mecanismo autocrino las células captan la $25(\text{OH})\text{D}$ circulante, la hidroxilan a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la utilizan y la degradan. Esta forma de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no circula en sangre en condiciones fisiológicas, permanece solamente a nivel intracelular. Esta producción probablemente depende de la

disponibilidad de 25(OH)D en la circulación, lo cual refleja la importancia biológica del mantenimiento de niveles sanguíneos adecuados de este metabolito.

Los 200 genes que se estima son regulados directa o indirectamente por la 1,25(OH)₂D tienen una amplia gama de acciones biológicas, incluyendo la inhibición de la proliferación celular, la inducción de la diferenciación celular, la inhibición de la angiogénesis, la estimulación de la producción de insulina, la inducción de apoptosis, la inhibición de la producción de renina o la adipogénesis entre otras (130, 131).

1.4.4. CONSECUENCIAS DEL DÉFICIT DE VITAMINA D.

El déficit de vitamina D (o hipovitaminosis D) puede resultar de la ingesta insuficiente por una dieta inadecuada, o, principalmente estar causado por una inadecuada exposición solar. También puede ser deficitaria por trastornos que limiten su absorción a nivel intestinal o condiciones que imposibiliten su conversión en metabolito activo, como alteraciones del hígado o riñón.

En cualquier caso, el déficit de vitamina D supone un importante problema de salud a nivel mundial, especialmente entre los países industrializados, que ha llevado a las autoridades públicas a indicar la necesidad de exponerse a la radiación solar de forma segura para mantener niveles óptimos de esta vitamina (132). Una exposición solar sensata (descubrir cara, brazos y manos durante 5-10 minutos diarios, o fórmulas equivalentes a ésta) y un incremento en el consumo de alimentos frescos ricos en vitamina D, y/o procesados enriquecidos en ella, deberían bastar como estrategias globales para combatir esta “pandemia” (133). Según el comité de nutrición de la Asociación Española de Pediatría (AEP), se recomienda la ingesta de 400 UI/día de vitamina D en niños menores de un año, y de 600 UI/día en el resto (134).

A día de hoy sigue existiendo controversia sobre el punto de corte para definir el estatus de vitamina D de un individuo, medido en términos de deficiencia, insuficiencia y niveles óptimos de 25(OH)D. Existen varias causas: en primer lugar, los valores de referencia basados en la población son problemáticos debido a la variabilidad de los niveles de

25(OH)D en los diferentes orígenes étnicos, socioculturales y de estilo de vida. En segundo lugar, hay pruebas sustanciales de que la deficiencia de vitamina D es común en muchos países, por lo que es difícil definir una población "normal". Finalmente, la definición de niveles de vitamina D normales es una cuestión a debate, puesto que muchas personas sin signos de enfermedad, son deficientes en vitamina D.

Hay varios criterios que definen el nivel óptimo de la concentración de 25(OH)D en suero. Un criterio fisiológico es observar la relación entre la 25(OH)D y la PTH, de forma que un aumento de PTH unido a concentraciones de 25(OH)D por debajo de 30-35 ng/mL sugiere deficiencia de vitamina D, a pesar de que la enfermedad manifiesta no sea evidente. Otro criterio es el del comité del *American Institute of Medicine* (IOM) que en un informe publicado en 2010 (135) concluía que era necesario concentraciones de 25(OH)D superiores a 20 ng/mL para evitar resultados adversos de salud, especialmente relacionados con el riesgo de fracturas óseas relacionadas con la osteoporosis.

Actualmente, la mayoría de los laboratorios clínicos utilizan como valores de referencia los definidos por la *Endocrine Society* (ENDO) (133) y la *International Osteoporosis Foundation* (IOF) (Tabla 10). Sugieren como nivel mínimo 30 ng/mL (75 nmol/L) en pacientes adultos para minimizar el riesgo de fracturas y por su papel beneficioso frente a patologías no óseas.

Tabla 10. Definición del estatus de vitamina D según la *Endocrine Society* (ENDO).

Estatus de vitamina D	25(OH)D en suero (ng/ml)	25(OH)D en suero (nmol/L)
Deficiencia	< 20 ng/ml	< 50 nmol/L
Insuficiencia	20-29 ng/ml	50-72,5 nmol/L
Suficiencia	> 29 ng/ml	72,5 nmol/L
Rango Óptimo	30-60 ng/ml	75-150 nmol/L

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de vitamina D dependerán de la gravedad y la duración de la misma. La mayoría de los pacientes con deficiencia de 25(OH)D de leve a moderada (entre 15-20 ng/mL) permanecen asintomáticos. En las situaciones de deficiencia severa prolongada de vitamina D (<15 ng/mL), se reduce la absorción intestinal de calcio y fósforo y se produce hipocalcemia, causando el hiperparatiroidismo secundario, que conduce a un aumento de la fosfaturia, a la desmineralización ósea y cuando es prolongada, a la osteomalacia en adultos y raquitismo en los niños.

La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con otras patologías en distintos aparatos y sistemas, aunque la evidencia de los beneficios sobre estos sistemas biológicos no es tan fuerte como la evidencia de los efectos sobre el esqueleto. Así, se ha encontrado que el déficit de vitamina D es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurológicas, demencia (136), enfermedad de Alzheimer (137), depresión (138), incluso autismo (139). Dadaa sus propiedades inmunomoduladoras, el déficit de vitamina D se asocia con una activación del sistema inmune y mayor desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 (140), artritis reumatoide (141), enfermedad inflamatoria intestinal crónica (142), el lupus eritematoso sistémico (143), la esclerosis múltiple (144) o la dermatitis atópica (128) de la que se hablará ampliamente en los siguientes apartados de esta tesis doctoral. A nivel pulmonar, la deficiencia de vitamina D sugiere que las exacerbaciones del asma son más frecuentes y de peor control y su suplementación contribuye a la estabilización de la enfermedad (145, 146). Finalmente, se ha demostrado ampliamente la relación existente entre los niveles séricos de vitamina D y cáncer.

1.4.5. VITAMINA D, GEN VDR Y RELACIÓN CON LA DA.

Numerosos trabajos científicos han demostrado que la deficiencia de vitamina D está asociada con diferentes enfermedades dermatológicas como la DA, la psoriasis, el vitíligo, la micosis fungoide, el LES o la alopecia areata entre otros (102).

En el caso de la DA, la vitamina D juega un papel esencial en el desarrollo y gravedad de la enfermedad. La mayoría de los estudios observacionales han demostrado una relación inversa entre los niveles de vitamina D y la gravedad de la DA, de una forma dosis-dependiente. Por ejemplo, en un estudio realizado por Oren *et al.* (147) el riesgo de desarrollo de DA fue 5 veces mayor en pacientes deficientes en vitamina D en comparación con aquellos con niveles óptimos. En cuanto a la mejoría de la enfermedad tras el tratamiento con vitamina D existen resultados discordantes, algunos autores defienden que la sobrecarga de vitamina D se asocia con una mejoría de la enfermedad (148), y otros, más recientes, apuntan a que faltan evidencias que sugieran que la suplementación con vitamina D genere un beneficio en los pacientes afectados (149, 150).

En 1988 Baker *et al.* (151) aislaron y secuenciaron por primera vez el cDNA del gen *VDR* (OMIM:601769), localizado en el cromosoma 12q13.11, con coordenadas genómicas (GRCh38: 12:47,841,536-47,905,030) dentro de una región génica que se ha asociado al desarrollo de asma y alergia en estudios GWAS (152-154). El gen *VDR* codifica el receptor celular de la vitamina D, una proteína de 427 aminoácidos (48,3 kDa) que pertenece a la superfamilia de receptores proteicos que actúan como factores de transcripción, entre los que se incluyen los receptores de hormonas tiroideas y esteroideas con los que mantiene homología de secuencia (151). Este gen se compone de una región promotora 5'-UTR que incluye 6 exones (1a-1f) que no se traducen, y 8 exones (del 2 al 9) que dan origen a los distintos dominios funcionales de la proteína final (A-F). En los exones 2 y 3 se localizan los dominios de unión a secuencias específicas de ADN y las señales de localización nuclear, y los exones 7, 8 y 9 están implicados en el reconocimiento y unión a la vitamina D (155, 156).

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se ha estimado que hay una variante en cada 1.000 pares de bases de los 3.000 millones que configuran el genoma humano.

Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades. En la actualidad muchos trabajos se centran en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (son los llamados polimorfismos de «baja penetrancia»).

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base (*single nucleotide polymorphism* o SNP). Hasta el momento se han descrito más de 60 SNPs en el gen *VDR*. Algunos de ellos como *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) y *TaqI* (rs731236), se han estudiado ampliamente, mediante análisis molecular de fragmentos de restricción, y se ha demostrado que presentan asociación con el desarrollo de enfermedades inflamatorias caracterizadas por una hiperactividad del sistema inmune como la DA o el asma (157-160).

Estos resultados podrían ser contradictorios en base a estudios más recientes, que demuestran que únicamente *BsmI* incrementa el riesgo de DA (161).

El mecanismo fisiopatológico por el cual se explica esta asociación es complejo. Por un lado, el receptor VDR se expresa en los queratinocitos y la vitamina D sintetizada en ellos modula de forma autocrina la proliferación y diferenciación de los queratinocitos promoviendo la integridad de la barrera epidérmica (160). Por otro lado, el déficit de vitamina D (adquirido o genético), así como la hipofuncionalidad de VDR causada por ciertos SNPs, estimulan el sistema inmune con la proliferación de linfocitos T y citoquinas (162). En resumen, estos mecanismos sugieren que tan importante son los niveles séricos de vitamina D, como la actividad del receptor VDR para una función adecuada del sistema inmune y de la función barrera epidérmica.

La funcionalidad de VDR también depende de la actividad de ciertas enzimas responsables del metabolismo endógeno de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en los queratinocitos y linfocitos como son las enzimas 25-hidroxivitaminaD3-1 α -hidroxilasa (codificada por el gen *CYP27B1*, OMIM:609506) y 1,25-dihidroxivitaminaD3-24-hidroxilasa (codificada por el gen *CYP24A1*, OMIM:126065). La primera sintetiza calcitriol y la segunda lo inactiva transformando en la forma 24-OH-D. La presencia de determinados SNPs en estos genes se ha asociado con asma y DA (163).

1.4.6. DA, VITAMINA D Y SÍNDROME METABÓLICO.

En los últimos años, se ha producido un incremento significativo de las enfermedades atópicas (DA, asma, rinitis y/o alergias alimentarias). Al mismo tiempo ha aumentado la prevalencia de síndrome metabólico, obesidad, y otras patologías relacionadas (dislipemia, HTA, diabetes, etc...), lo que ha sugerido que ambas entidades, atopia y enfermedades metabólicas, estén relacionadas.

En un estudio recientemente publicado se concluye que la prevalencia de sobrepeso, obesidad y dislipidemia es mayor en niños con DA que en niños sanos de la misma edad (164). Otras investigaciones han relacionado la obesidad con una mayor gravedad y peor

control de pacientes asmáticos (165). Sin embargo, la mortalidad de los pacientes atópicos no parece deberse a enfermedades cardiovasculares o metabólicas (166). Más recientemente, un estudio danés ha evidenciado la asociación entre DM2 y mutaciones en *FLG*, indicando que dichas mutaciones serían un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 en pacientes con bajo índice de masa corporal. La descripción reciente en pacientes con DM2 de polimorfismos en el cromosoma 1q21 (en el mismo locus que *FLG*) podría explicar una alteración genética común en ambas enfermedades (167, 168).

Entre otras funciones, la vitamina D, participa en el control endocrino del metabolismo glucolípido y sus niveles circulantes muestran una relación inversa con la hipertensión, la diabetes, la hipertrigliceridemia y la obesidad (169). La deficiencia de vitamina D se observa con más frecuencia de lo esperado en niños y adolescentes obesos y podría contribuir al aumento de la morbilidad asociada a la obesidad infantil, como la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, aumento de riesgo cardiovascular, dislipidemia aterogénica e hipertensión (170-172).

La unión de vitamina D a su receptor (VDR) permite la formación de heterodímero RXR-VDR que va a modular la transcripción de genes relacionados con la adipogénesis, influyendo de esta forma en la regulación de los lípidos séricos (173, 174).

Por todo ello, es lógico pensar, que en los pacientes con DA, la deficiencia de vitamina D (ya sea por carencia en sus concentraciones séricas, o por la hipofuncionalidad de su receptor, *VDR*, o de las enzimas implicadas en su metabolismo, *CYP24A1*) pudiera contribuir a la aparición del síndrome metabólico, especialmente en la infancia. En estudios recientes se ha demostrado que los polimorfismos clásicos del gen *VDR* (*FokI*, *Apal* y *TaqI*) se asocian con el desarrollo de obesidad (173, 175).

Por el momento no queda establecida una clara asociación de alteraciones metabólicas en los pacientes con DA, si bien el uso frecuente y continuado de corticosteroides y otros fármacos inmunosupresores sistémicos en estos pacientes los convierte en una población de riesgo (168).

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La realización del estudio que se plantea a continuación va a permitir ampliar el conocimiento actual sobre el ambiente genético tan complejo que se relaciona con la dermatitis atópica.

Existen muy pocos estudios que hayan evaluado la asociación de las mutaciones más frecuentes en el gen *FLG* en el entorno mediterráneo en pacientes afectados de DA, y ninguno en población española. Tampoco existen muchos trabajos, o si los hay son contradictorios, que estudien la relación entre la atopía y polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, como *VDR* y *CYP24A1*. Por todo ello, evaluar, por un lado, las mutaciones más frecuentes en *FLG* en nuestra población infantil, y por otro aportar más evidencias al posible papel de determinados polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D en la DA, puede resultar de gran valor.

Por otro lado, estudiar la asociación entre genotipos relacionados con la DA y algunos aspectos del metabolismo fosfocálcico y de la vitamina D, así como del perfil lipídico puede ayudar a establecer las bases etiopatogénicas de la asociación epidemiológica observada entre vitamina D y el síndrome metabólico. Estos aspectos en los que por el momento no se ha profundizado mucho en la comunidad científica, son de gran importancia (especialmente en la infancia) para evitar el desarrollo de comorbilidades y riesgo cardiovascular en la edad adulta.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Existen mutaciones en el gen *FLG* y polimorfismos poblacionales en los genes *VDR* y *CYP24A1* que han demostrado su asociación o pudieran estar asociados al desarrollo de dermatitis atópica u otras enfermedades atópicas. Así mismo, estos condicionantes genéticos pueden influir en el metabolismo fosfocálcico y de la vitamina D, así como en el perfil lipídico.

Objetivo principal:

Conocer la asociación entre las variaciones genéticas en el gen de la filagrina (*FLG*) y polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D (*VDR*) y la dermatitis atópica.

Objetivos Secundarios:

1. Conocer la prevalencia de las mutaciones más frecuentes del gen *FLG* en el entorno mediterráneo en la población pediátrica global y en el grupo de afectos por DA.
2. Estudiar la asociación entre el genotipo *FLG* y DA.
3. Estudiar la asociación entre el genotipo *FLG*, gravedad de la DA y otras enfermedades atópicas.
4. Conocer la frecuencia de polimorfismos del gen *VDR* y *CYP24A1* en el entorno mediterráneo en la población pediátrica española general y en afectos por DA.
5. Estudiar la asociación entre los polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D (*VDR* y *CYP24A1*) y la DA.
6. Estudiar la asociación entre los polimorfismos de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D (*VDR* y *CYP24A1*), gravedad de la DA y otras enfermedades atópicas.
7. Estudiar la relación existente entre genotipos de los genes seleccionados y los niveles séricos de vitamina D.
8. Estudiar la relación existente entre genotipos de los genes seleccionados y las concentraciones de lípidos séricos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realiza un estudio observacional, prospectivo de casos y controles, en el que se analiza la relación existente entre características clínico-demográficas de la enfermedad (DA), ciertos biomarcadores y determinados polimorfismos y mutaciones en genes relacionados con el desarrollo de DA.

Se incluyen como casos (en adelante grupo DA) a niños/as con edades comprendidas entre 0-14 años, fenotipo europeo-Mediterráneo, fototipos de I a IV, afectos de dermatitis atópica y que cumplen criterios diagnósticos de *Hanifin y Rajka*. El reclutamiento de estos pacientes se realizó consecutivamente a lo largo de un año (enero a diciembre de 2012) por los servicios de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca y el Hospital Infantil Universitario del Niño Jesús de Madrid.

A todos los pacientes se les realizó una extracción de sangre para la determinación de niveles séricos de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, 25-OH-vitamina D, paratohormona, calcio y fósforo. Además, de las muestras biológicas sobrantes del análisis de sangre se extrajo ADN para el estudio genético molecular de mutaciones en el gen *FLG* y polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1*.

Como grupo control se han incluido niños/as de similar edad (aunque con mayor flexibilidad en el reclutado) y características fenotípicas, que no presentan ni han presentado dermatitis atópica, alergias de ningún tipo (alimentarias, medicamentosas, animales, pólenes...), ni otros rasgos de atopia. El reclutamiento de los controles se ha realizado a lo largo de los años 2016-2018 por el doctorando (investigador principal de este proyecto) en la Unidad Central de Laboratorios (UCL) del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, previa selección de los pacientes según los criterios indicados y firma del consentimiento informado por los padres o representantes legales.

Teniendo en cuenta la necesidad de obtención de muestras de sangre para realizar los análisis indicados, se seleccionaron pacientes que acudían a la unidad de extracciones para realizarse un análisis (por algún otro proceso, la gran mayoría preoperatorios de traumatología o adenoidectomías), y así obtener los especímenes de sangre necesarios

sin necesidad de realizar ninguna venopunción adicional, ni extraer más sangre de la necesaria, ya que para este proyecto se utilizaron las muestras de sangre sobrantes de los análisis solicitados por otros facultativos.

Como criterios de exclusión se consideraron los grupos étnicos no mediterráneos (fototipos V y VI), pacientes en tratamiento con Vitamina D o con otras patologías graves o enfermedades crónicas. Como se indica en el consentimiento informado la retirada de los sujetos de estudio se realizará siempre que el paciente, o su tutor legal, deseen revocar el consentimiento informado. En tal caso, se procederá a la retirada y eliminación de la muestra de estudio, así como todos los resultados que de ella se hubiesen generado.

Tabla 11. Criterios de inclusión y exclusión en el estudio.

	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
GRUPO DA	<ul style="list-style-type: none"> - Niños con edad 0-14 años. - Pacientes con diagnóstico de DA. - Fenotipo Europeo-Mediterráneo. - Fototipos I a IV. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fototipos V y VI. - Pacientes en tratamiento con vitD. - Pacientes con otras patologías graves. - Negativa para firmar CI
GRUPO CONTROL	<ul style="list-style-type: none"> - Niños con edad 0-18 años. - Ausencia de enfermedad atópica. - Fenotipo Europeo-Mediterráneo. - Fototipos I a IV. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fototipos V y VI. - Alergia o algún rasgo de atopia - Enfermos crónicos. - Negativa para firmar CI

4.2. VARIABLES DE ESTUDIO

Las variables recogidas y analizadas en el presente estudio se definen a continuación, a modo de resumen en las siguientes tablas (Tablas 12 a 17):

Tabla 12. Variables antropométricas.

Sexo	Varón / Mujer.
Edad	Edad del sujeto en años.
Peso	Peso del sujeto en Kg.
Talla	Altura del sujeto en cm.
IMC	Índice de masa corporal del sujeto calculado como: $\text{Peso (Kg)} / (\text{Talla(cm)}/100)^2$
Fototipo	Capacidad de adaptación al sol que tiene cada persona. La escala de fototipos está basada en el color básico de la piel y en la estimación que hace la propia persona de su capacidad para broncearse y su sensibilidad al eritema solar (Tabla 13).

Tabla 13. Escala para definir fototipos.

Fototipo	Color de piel	Respuesta a la exposición solar
I	Blanco Pálido	Nunca se broncea, se quema fácilmente.
II	Blanco	Se broncea con dificultad, se quema fácilmente.
III	Blanco	Se broncea fácilmente, puede quemarse al inicio de exposición
IV	Moreno Claro	Se broncea fácilmente, raramente se quema.
V	Moreno	Se broncea fácilmente, casi nunca se quema.
VI	Negro	Se oscurece más su piel, no se quema

Tabla 14. Variables relacionadas con el estado de salud y gravedad de la DA.

Asma	Presencia de episodios de asma en el sujeto (si/no).
Rinitis	Presencia de episodios de rinitis en el sujeto (si/no).
SCORAD*	<i>Scoring atopic dermatitis index</i> , escala que identifica la gravedad de la DA. El cálculo de este índice se realiza según se muestra en el Anexo A. En este estudio se clasifica la gravedad de la enfermedad en base a esta escala como: Leve (SCORAD <25), Moderada (SCORAD 25-50) y Grave (SCORAD >50).

*La gravedad de la DA puede definirse según diferentes escalas, que miden: la extensión de las áreas afectadas, la gravedad de las lesiones y los síntomas subjetivos del paciente. Las más ampliamente aceptadas son: SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*) y EASI (*Eczema Area and Severity Index*). Otras escalas son: IGA (*Investigator global assessment*), y NRS (*Numerical Rating Scale*).

Tabla 15. Variables relacionadas con parámetros bioquímicos. (*)

Analito	Abreviatura	Espécimen	Unidad de medida	Método de medida
IgE total	IgE	Suero	UI/L	Inmunoquimioluminiscencia
25-OH-vitamina	25(OH)D	Suero	ng/mL	Electroquimioluminiscencia
Colesterol total	COLT	Suero	mg/dL	Espectrofotometría
Colesterol HDL	HDLc	Suero	mg/dL	Espectrofotometría
Colesterol LDL	LDLc	Calculado	mg/dL	Cálculo indirecto **
Triglicéridos	TG	Suero	mg/dL	Espectrofotometría
Calcio total	Ca	Suero	mg/dL	Espectrofotometría
Fósforo total	P	Suero	mg/dL	Espectrofotometría
Parathormona	PTH	Suero	pg/mL	Inmunoquimioluminiscencia

(*) Los valores de referencia utilizados se muestran en el Anexo B. (**) Cálculo según fórmula de Friedewall.

Para el análisis del genotipo *FLG*, se han elegido, de entre todas las mutaciones identificadas como patogénicas o demostrada su asociación con la DA (Tabla 8), las tres más prevalentes en el continente europeo, y que a su vez se han identificado previamente en países mediterráneos. Se resumen a continuación (Tabla 16):

Tabla 16. Mutaciones analizadas en el gen *FLG*.

Mutación	ClinVar ^a	HGVS ^b	Gen	Cromosoma	Alelos
R501X	rs61816761	NM_002016.1:c.1501C>T	FLG	1q21.3	C/T*
2282del4	rs558269137	NM_002016.1:c.2282_2285delCAGT	FLG	1q21.3	wt/del
R2447X	rs138726443	NM_002016.1:c.7339C>T	FLG	1q21.3	C/T*

^a Nomenclatura de la mutación en términos de SNPs en la base de datos ClinVar. ^b Nomenclatura de la mutación según HGVS. *alelo mutado.

Para el estudio del genotipo *VDR* y *CYP24A1* se han elegido SNPs en los que previamente se había demostrado asociación con la DA, asma u otras enfermedades inflamatorias crónicas como rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236, rs2248359 y rs2296241. Además, se han seleccionado otros SNPs relacionados con el metabolismo fosfocálcico o con influencia sobre el perfil lipídico, localizados en regiones intrónicas o reguladoras de factores de transcripción del gen *VDR* como rs2107301, rs1540339, rs239179, rs2239185 y rs3782905 (Tabla 17).

Tabla 17. Polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1*.

SNP ^(a)	Posición ^(b)	Gen	Alelos ^(c)	Ref AI ^(d)	Alt AI ^(e)
rs2239185	chr12:47850776	VDR	G/A	G=0,498	A=0,502
rs1544410	chr12:47846052	VDR	C/A/G/T	C=0,704	T=0,296
rs7975232	chr12:47845054	VDR	C/A	C=0,485	A=0,515
rs2238136	chr12:47883930	VDR	C/T	C=0,833	T=0,167
rs3782905	chr12:47872384	VDR	G/C	G=0,763	C=0,237
rs2239179	chr12:47863983	VDR	T/C	T=0,639	C=0,361
rs1540339	chr12:47863543	VDR	C/T	C=0,614	T=0,386
rs2107301	chr12:47861787	VDR	G/A	G=0,663	A=0,337
rs2239182	chr12:47861628	VDR	T/C	T=0,521	C=0,479
rs731236	chr12:47844974	VDR	A/G	A=0,723	G=0,277
rs2248359	chr20:54174979	CYP24A1	C/T	C=0,551	T=0,449
rs2296241	chr20:54169680	CYP24A1	G/A	G=0,542	A=0,458

Toda la información recogida en esta tabla se ha obtenido de las bases de datos *Ensembl* (versión 97, última actualización en Julio de 2019) y *dbSNP* del NCBI (National Center for biotechnology information de la US. National Library of Medicine, última actualización en Julio de 2019)

(^a) nomenclatura del polimorfismo según dbSNP. (^b) cromosoma y posición génica de la variante tomando como transcrito de referencia GRCh38. (^c) alelos posibles. se muestra primero el alelo identificado como ancestral en el transcrito de referencia GRCh38, el segundo o sucesivos son las distintas alternativas. (^d) frecuencia génica del alelo de referencia. (^e) frecuencia génica del alelo alternativo. Los valores de frecuencia alélica se obtienen de la base de datos *1000 Genomes Project phase3 release V3+*.

4.3. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Las determinaciones analíticas en suero se realizaron en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, en los equipos automatizados utilizados en la rutina diaria del laboratorio, siguiendo la misma sistemática de análisis que las muestras ordinarias que se procesan aquí. Las determinaciones séricas medidas en este estudio, junto con el método e instrumento de análisis empleado se explican a continuación, y se resumen en la Tabla 15:

La medida de Calcio total sérico se ha realizado mediante espectrofotometría en el equipo automatizado AU5400 de *Beckman Coulter*. Este procedimiento se basa en la reacción de los iones de calcio con Arsenazo III para formar un complejo de color púrpura. La medida de absorbancia del complejo a 660/700 nm es directamente proporcional a la concentración de calcio en la muestra, expresada en mg/dl.

La medida de Fósforo inorgánico sérico se ha realizado mediante espectrofotometría en el equipo automatizado AU5400 de *Beckman Coulter*. Este método se basa en la reacción del fosfato inorgánico con molibdato para formar un complejo de heteropoliácido cuya absorbancia a 340/380 nm es directamente proporcional al nivel de fósforo inorgánico presente en la muestra. El resultado se expresa en mg/dl.

La medida de paratohormona (PTH) e inmunoglobulina E (IgE) séricas se realizó mediante inmunoquimioluminiscencia (tipo sándwich) en el equipo automatizado UniCel Dxl 800 de *Beckman Coulter*. Los complejos inmunes formados en la reacción antígeno-anticuerpo, dispersan la luz en proporción a su concentración, de forma que la tasa de disminución de la intensidad de la luz transmitida a través de partículas suspendidas en solución es proporcional a la concentración del analito. Los resultados de PTH se expresan en pg/ml y los de IgE en UI/L.

La medida de vitamina D (25(OH)D) sérica mediante electroquimioluminiscencia se realizó en el equipo automatizado Cobas e601 de *Roche Diagnostics*. Este ensayo utiliza como proteína de captura una proteína fijadora de vitamina D marcada con quelato de rutenio que se liga a la 25(OH)D. La reactividad cruzada frente a la 24,25-di(OH)D está

bloqueada por un anticuerpo monoclonal específico. Los resultados de vitamina D se expresan en ng/ml.

La medida de Triglicéridos séricos se ha realizado mediante espectrofotometría en el equipo automatizado AU5400 de *Beckman Coulter*. Este procedimiento se basa en una serie de reacciones enzimáticas acopladas. En primer lugar, los triglicéridos de la muestra se hidrolizan por acción de lipasas. El glicerol resultante es fosforilado a glicerol-3-fosfato, por acción de glicerol quinasa, y después éste, es oxidado por oxígeno molecular en presencia de glicerol fosfato oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y dihidroxiacetona fosfato. Finalmente, el H₂O₂ reacciona con 4-aminofenazona y N, N-bis (4-sulfobutil) -3,5-dimetilanilina, sal disódica (MADB) en presencia de peroxidasa produciendo un cromóforo. El aumento de la absorbancia a 660/800 nm es proporcional al contenido de triglicéridos de la muestra, expresado en mg/dl.

La medida de Colesterol total en suero se ha realizado mediante espectrofotometría en el equipo automatizado AU5400 de Beckman Coulter. Este procedimiento se basa en una serie de reacciones enzimáticas acopladas. En primer lugar, se hidrolizan los ésteres de colesterol por acción de la enzima colesterol esterasa, y el colesterol libre generado se oxida por la colesterol oxidasa, generando en el proceso H₂O₂. Finalmente, el H₂O₂ reacciona con con 4-minoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa produciendo un cromóforo (rojo de quinoneimina) que es leído a 540/600 nm, siendo la absorbancia observada, proporcional al contenido de colesterol total de la muestra expresado en mg/dl.

La medida de Colesterol-HDL en suero se realizó mediante espectrofotometría en el equipo automatizado AU5400 de Beckman Coulter. Este procedimiento permite la medida selectiva de colesterol HDL en suero en presencia de otras partículas de lipoproteínas. El ensayo consta de dos fases. En la primera fase, el colesterol libre presente en las lipoproteínas no HDL se solubiliza y se consume por el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa y DSBmT para generar un producto final incoloro. En la segunda fase, se solubilizan selectivamente las lipoproteínas HDL y el colesterol HDL se libera para la reacción con colesterol esterasa, colesterol oxidasa y un sistema cromógeno que se puede medir a 600/700 nm. El aumento resultante en la

absorbancia es directamente proporcional a la Concentración de HDL-C en la muestra expresado en mg/dl.

La medida de colesterol LDL se realiza de forma indirecta, a través de los valores anteriores de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, mediante la fórmula establecida por *Friedewald* y utilizada ampliamente en la práctica clínica. Según esta fórmula el colesterol LDL se obtiene de: $cLDL = CT - [cHDL + (TG/5)]$. Esta fórmula no puede ser aplicada si la concentración de triglicéridos es > 400 mg/dl.

4.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN FLG

El estudio y análisis de las mutaciones R501X, 2282del4 y F2447X del gen *FLG* se ha realizado en las instalaciones del Laboratorio de Genética, perteneciente al Servicio de Bioquímica Clínica, del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Todo el proceso, desde la selección de los pacientes, hasta la obtención de los resultados y elaboración de la base de datos, se ha realizado por el doctorando.

El espécimen de partida para este estudio es sangre total, contenida en tubos Vacutainer (*Becton, Dickinson and Company (BD)*, Estados Unidos) con EDTA como anticoagulante, precisando de un volumen mínimo de 1 mL. Previo al análisis mutacional se realizó una extracción de ADN de linfocitos de sangre periférica mediante un sistema automatizado, utilizando el *Biorobot EZ1* y el kit de extracción *EZ1 DNA blood 350 uL Kit (Qiagen)*, Alemania). Posteriormente se analizó la calidad de la extracción midiendo la absorbancia del producto purificado (Abs260/Abs280nm) en el biofotómetro *UV Espectrofotometer Q3000 (Quawell)*, Estados Unidos). Se aceptaron valores comprendidos entre 1,8 - 2,0.

El análisis de las mutaciones puntuales descritas se realizó siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 18.

Tabla 18. Principales etapas del protocolo de análisis de mutaciones en *FLG*.

Etapa	Protocolo
1	PCR de Amplificación Objetivo: Amplificar los fragmentos de ADN que contienen las secuencias de interés.
2	PCR de Secuenciación Objetivo: Preparar el ADN amplificado para la secuenciación.
3	Purificación Objetivo: Eliminar impurezas del ADN, principalmente restos proteicos.
4	Secuenciación Objetivo: Obtener la secuencia ordenada de nucleótidos del ADN de interés.

En el paso inicial del protocolo, se amplifican los fragmentos que contienen las secuencias de interés del exón 3 del gen *FLG*. Para ello, se idearon *primers* (Tabla 19) a partir del análisis de las secuencias génicas. Las PCRs de amplificación y secuenciación se realizaron en un termociclador 2729 (*Applied Biosystems*, Estados Unidos) siguiendo los protocolos de reacción representados en las figuras 7 y 8 respectivamente.

Tabla 19. *Primers* (Cebadores) utilizados en la PCR de amplificación en el estudio de *FLG*.

Mutación	<i>Primers</i> (Cebadores)
R501X	F: <u>GTAAAACGACGGCCAGT</u> GCTCATGAACAGCCTGACTC R: <u>CAGGAAACAGCTATGACCATATGTGGTGTGGCTGTGATG</u>
2282del4	F: <u>GTAAAACGACGGCCAGT</u> GGTGGCCGGTCAGCAGGAA R: <u>CAGGAAACAGCTATGACCATTGAGTGTCCAGATCTATCTACCAA</u>
R2447X	F: <u>GTAAAACGACGGCCAGT</u> GATCCC GCCACCAGCTCCA R: <u>CAGGAAACAGCTATGACCATG</u> GAAAGACCCTGAACGTCGA

(*) Se remarca subrayado en cada primer una misma secuencia universal, que permite realizar la reacción de secuenciación de varias muestras a la vez. Estas secuencias derivan del fago M13.

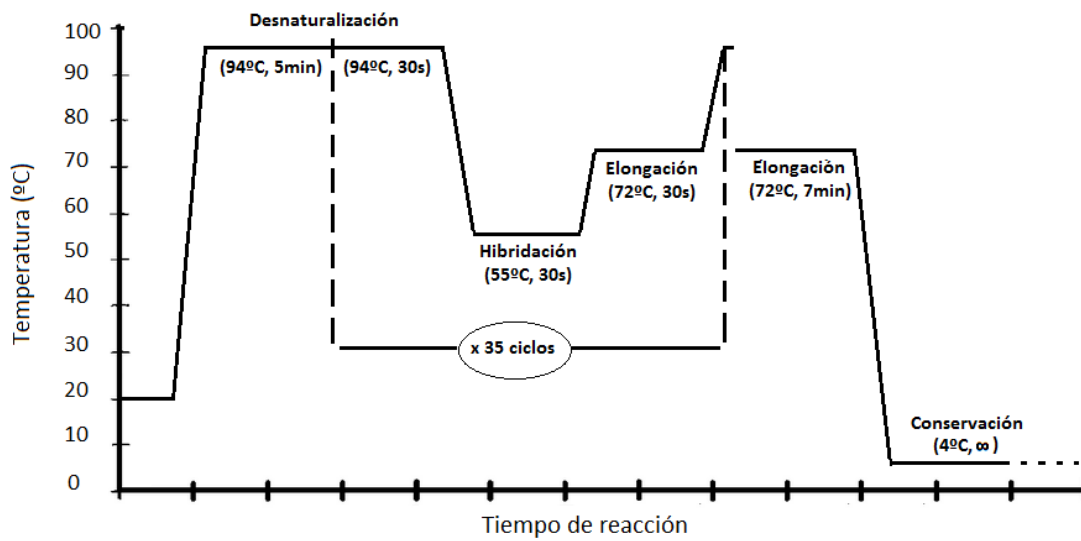


Figura 7. Protocolo de reacción: PCR de Amplificación

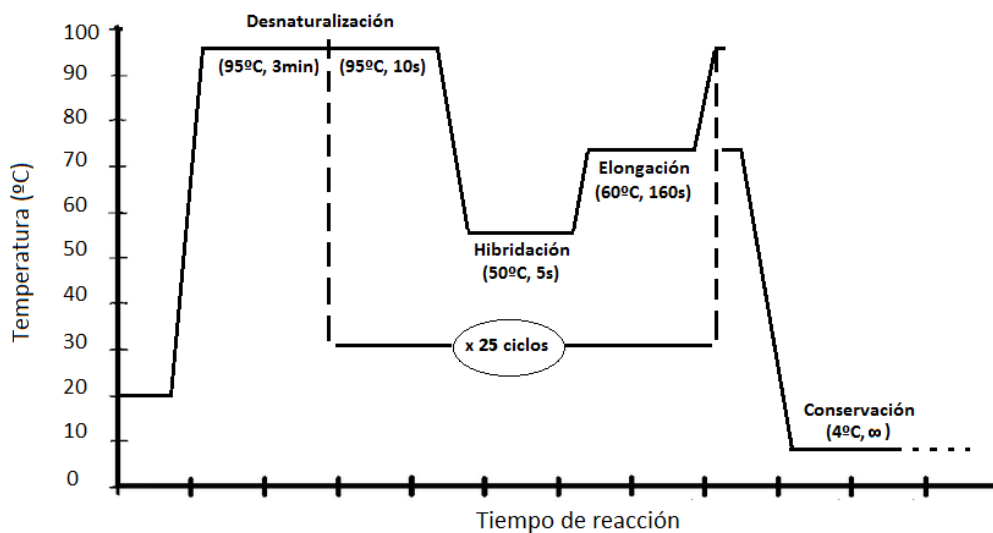
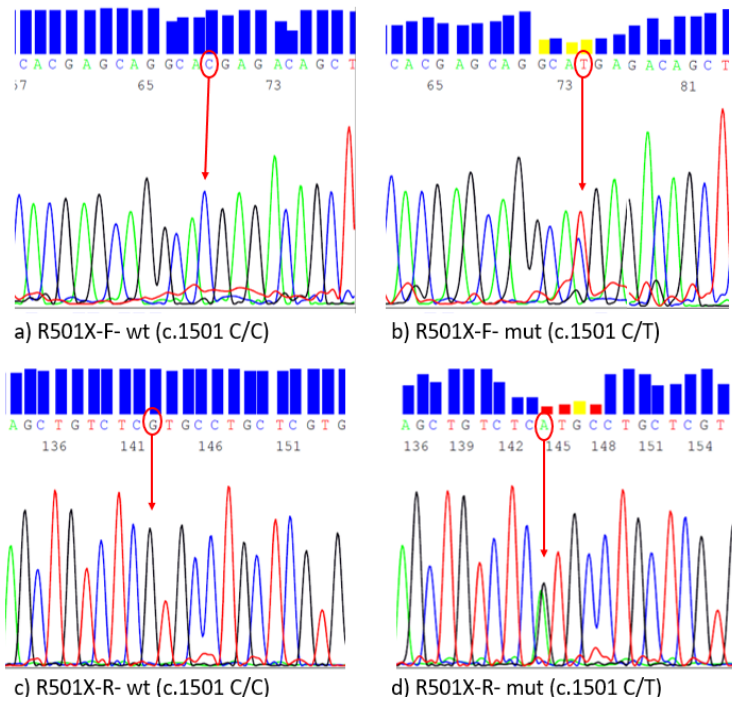


Figura 8. Protocolo de reacción: PCR de Secuenciación

Los fragmentos, amplificados y purificados, se secuenciaron mediante un método Sanger convencional en el equipo 3130X1 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EEUU). Para cada mutación se realizó el análisis de los dos fragmentos (*forward* y *reverse*). La identificación de las mutaciones se realizó según se muestra en las figuras 9, 10 y 11.

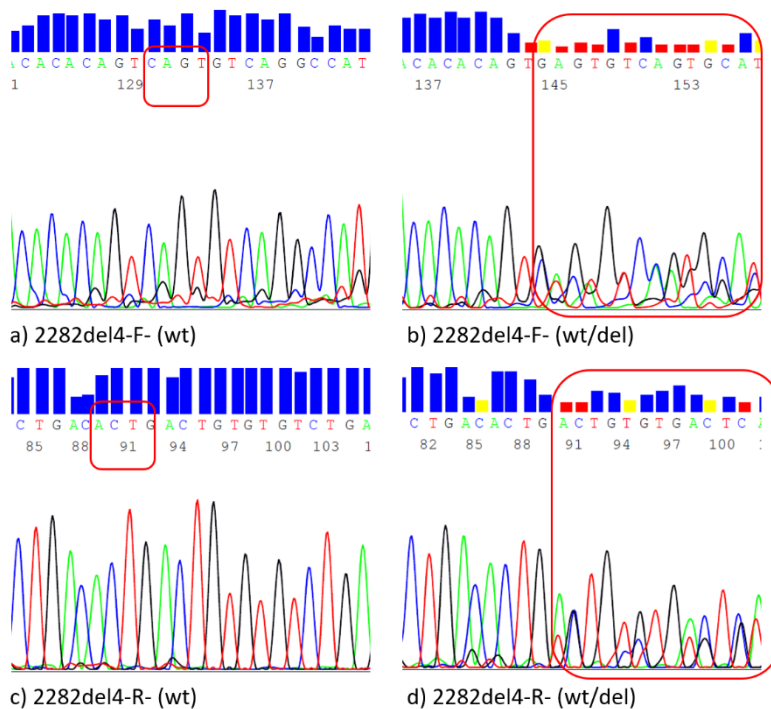
Figura 9. Análisis e identificación de la mutación R501X.



c.1501C>T

Mutación puntual sin sentido, de pérdida de función, en la cual se produce un cambio en la posición 1501 de la secuencia codificante del gen *FLG*, que origina un cambio C > T y en consecuencia la sustitución de la Arginina 501 de la profilagrina por un codón Stop (ARG501TER). Esta situación conduce a una proteína truncada de 500 aminoácidos. Los individuos con el alelo normal (wt) presentan un único pico C y se identifican como C/C. Los individuos con el alelo mutado (mut) son heterocigotos y presentan dos picos de C y T, y se identifican como C/T. Se muestran los fragmentos *forward* (F) *reverse* (R)

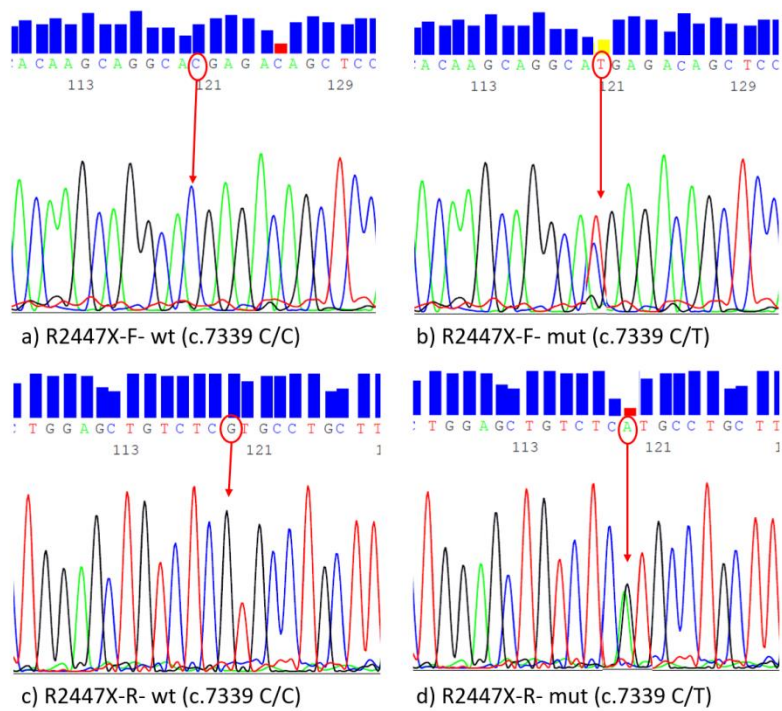
Figura 10. Análisis e identificación de la mutación 2282del4.



c.2282_2285 delCAGT

Microdelección de 4 pb (CAGT) en la posición 2282 del cDNA del gen *FLG*. Esta delección origina una mutación de tipo *frameshit* que da origen a una modificación del marco de lectura, cambio en la secuencia de aminoácidos y una terminación prematura 107 pb después. Esta situación conduce a una proteína truncada en la primera repetición de filagrina. Los individuos con el alelo normal (wt) presentan secuencia CAGT visible como picos simples y continuidad en la secuencia. Los individuos con el alelo mutado (mut) son heterocigotos y presentan solapamiento de secuencias wt y del. Se presentan los dos fragmentos analizados, *forward* (F) y *reverse* (R)

Figura 11. Análisis e identificación de la mutación R2447X



c.7339 C>T

Mutación puntual sin sentido, de pérdida de función, en la cual se produce un cambio en la posición 7339 de la secuencia codificante del gen *FLG*, que origina un cambio C > T y en consecuencia la sustitución de la Arginina 2447 de la profilagrina por un codón Stop (ARG2447TER). Esta situación conduce a una proteína truncada de 2446 aminoácidos. Los individuos con el alelo normal (wt) presentan un único pico C y se identifican como C/C. Los individuos con el alelo mutado (mut) son heterocigotos y presentan dos picos de C y T, y se identifican como C/T. Se muestran los dos fragmentos analizados, *forward* (F) *reverse* (R)

4.5. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN VDR

El análisis de los polimorfismos seleccionados en los genes *VDR* y *CYP24A1* se realizó con el apoyo metodológico y material del centro de diagnóstico genético NIMGenetics (Madrid). El estudio de genotipado se realizó a través de un kit comercial, *Flex Six™ Genotyping IFC* (Fluidigm®, Londres). El fundamento metodológico empleado en este método de análisis, es una modificación de la PCR específica de alelo, en este caso, integrada en un chip (o array) dinámico dentro de un circuito fluídico integrado (IFC).

El punto de partida inicial para el análisis de los polimorfismos genéticos propuestos son las muestras de ADN obtenidas en el estudio previo (mutaciones en *FLG*). Debido a que la cantidad de muestra utilizada en este método es menor, se requirió que la concentración de DNA mínima fuese de 60 ng/ml y la pureza, medida como Abs (260/280), estuviese comprendida entre 1,8 y 2,0. Todas aquellas muestras que no cumplieron los estándares mínimos de calidad fueron descartadas.

El análisis de SNPs se realizó siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 20. que incluye la realización de una PCR específica de alelo y análisis de secuencias.

Tabla 20. Principales etapas del protocolo de análisis de polimorfismos en *VDR* y *CYP24A1*.

Etapa	Protocolo
1	Cebado y acondicionamiento inicial del chip (Flex Six™ Genotyping IFC). Para esta etapa se requiere del equipo automatizado Juno™.
2	PCR de amplificación de los alelos de interés, o PCR específica de alelo, se realiza en un termociclador FC1™ Cyler, según el protocolo de reacción propuesto en las instrucciones del fabricante.
3	Lectura y análisis de las secuencias (SNPs) de interés, utilizando para ello un lector con sistema de detección de punto final (EP1™)

Para la realización de la PCR específica de alelo se emplean tres sondas (*primers*), tal como se muestra en la figura 12. Dos sondas específicas de alelo marcadas (*Allele-Specific Primers*, ASP) y una sonda específica de locus (*Locus-Specific Primer*, LSP).

Figura 12. Posición de los *primers* en la PCR específica de alelo

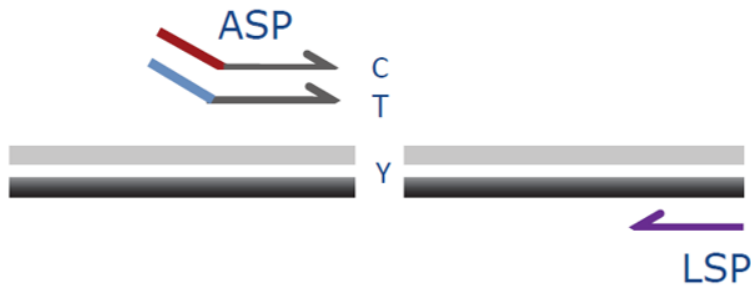


Tabla 21. Sondas utilizadas en la PCR específica de alelo en el estudio de *VDR* y *CYP24A1*.

SNP	rs1540339	rs1544410
ALELO	AG	AG
ASP1_SEQ	TGTTGGTGCCACCTAAT	CAGAGCCTGAGTATTGGGAATGT
ASP2_SEQ	TGTTGGTGCCACCTAAC	AGAGCCTGAGTATTGGGAATGC
LSP_SEQ	ACACATTCTCAGTGGGCCCT	TCCTGGGGCCACAGACAG
SNP	rs2107301	rs2238136
ALELO	CT	AG
ASP1_SEQ	ATGTCTTGCATGGGAATAACTTGC	ACTAGTGGACAATGAGCCAAGATAAT
ASP2_SEQ	CATGTCTTGCATGGGAATAACTTGT	ACTAGTGGACAATGAGCCAAGATAAC
LSP_SEQ	CCTACATGGCTGCTCAGAAGCT	TGGGCCAGCCAGCTTA
SNP	rs2239179	rs2239182
ALELO	AG	AG
ASP1_SEQ	TGTTACCTGACCTCTCCCAT	AACACTCTTTCAGAACCTGTTTACTCTTA
ASP2_SEQ	GTTACCTGACCTCTCCCCAC	CACTCTTTCAGAACCTGTTTACTCTTG
LSP_SEQ	CGGACCCTCCTGGCTATGG	GAAGACACTATATGATATATGAAGCCATTGACCT
SNP	rs2239185	rs2248359
ALELO	CT	CT
ASP1_SEQ	CACCCTCCTCTGTCTTCACG	TCTTGCCAGCCGCGG
ASP2_SEQ	CACCCTCCTCTGTCTTCACA	TCTTGCCAGCCGCGA
LSP_SEQ	CAGCAACACAATTCCAGTCACATCT	GTCCTAGGCAGGTCCAGTGA
SNP	rs2296241	rs731236
ALELO	AG	CT
ASP1_SEQ	GTTGTTTTCTTTGAAGGTCTTGCT	GACGCCGCGCTGATC
ASP2_SEQ	TTGTTTTCTTTGAAGGTCTTGCC	GGACGCCGCGCTGATT
LSP_SEQ	TGGCCTCTTTCATCACAGAGCT	ACGTCTGCAGTGTGTTGGACA
SNP	rs3782905	
ALELO	CG	
ASP1_SEQ	GTGGGAGGGAGTGCTGAG	
ASP2_SEQ	GTGGGAGGGAGTGCTGAC	
LSP_SEQ	GAGATGTTTAAAATCTACTTTAAAATCTACTTTCACCCAC	

ASP_SEQ, secuencia en bases de las sondas específicas de alelo (Allele-Specific Primers, ASP); LSP_SEQ, secuencia en bases de la sonda específica de locus (Locus-Specific Primer, LSP).

4.6. ANÁLISIS DE DATOS

La recogida de los datos se ha realizado en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft® Office 365), y posteriormente la base de datos se ha procesado para incorporarse a ficheros adecuados para su uso en los programas estadísticos SPSS v. 19 (SPSS Inc) y R (GNU GPL).

Se realiza un análisis descriptivo de las variables de estudio incluyendo todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión. Para las variables cualitativas se presentan los resultados de frecuencias relativas (%) y absolutas (n) y para las variables cuantitativas se muestra la media y desviación estándar (SD); o mediana y rango intercuartílico (RIQ), según criterios de normalidad. La normalidad de las variables se comprueba mediante el Test de Shapiro Wilks.

Los estudios de asociación entre variables cualitativas se evalúan con el test Chi-Cuadrado o con el test de Fisher (en caso de que no se cumplan las condiciones para aplicar Chi Cuadrado). La comparación de medias entre grupo independientes se realiza mediante el test T de Student o el test de Mann-Whitney (según normalidad).

Un aspecto de especial relevancia y dificultad en el estudio estadístico de este trabajo es el análisis de los polimorfismos genéticos de *VDR*:

En primer lugar, se realiza una estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP en los grupos de estudio. Posteriormente se comprueba que las poblaciones están en equilibrio utilizando el cálculo de Hardy-Weinberg. El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. Estas frecuencias esperadas se comparan con las observadas mediante el empleo de un test Chi-Cuadrado con un grado de libertad. Antes de realizar el análisis

de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el equilibrio de Hardy-Weinberg; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad.

Finalmente, se realizan los estudios de asociación. La magnitud de la asociación de cada SNP con la variable enfermedad (DA) se estima mediante el cálculo de *Odds Ratio* (OR) e Intervalo de confianza al 95% (IC). Los cálculos estadísticos se realizan utilizando los cinco modelos de herencia genética posibles: codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo (Tabla 22). Se establece el nivel de significación estadística para un p valor menor a 0,05.

Tabla 22. Modelos de herencia genética posibles en el análisis estadístico de polimorfismos.

Modelo dominante. Supone que una única copia de C es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos CC tienen el mismo riesgo. Se puede comparar la combinación de estos 2 genotipos respecto a los homocigotos TT.

Modelo recesivo. Supone que son necesarias 2 copias de C para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos TC y homocigotos del alelo más frecuente TT tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante CC.

Modelo aditivo. Supone que cada copia de C modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala log); por tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo que los heterocigotos TC. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos TC y peso 2 a los homocigotos CC.

Modelo codominante. Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (He) y homocigotos variantes (Va) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad).

Modelo sobredominante. Supone que los heterocigotos TC presentan un riesgo mayor que los homocigotos CC y TT. Por ello se compara la relación entre heterocigotos y homocigotos.

Modelos propuestos suponiendo dos alelos, uno C y otro T

4.7. ASPECTOS ÉTICOS

En su primera fase, este estudio fue propuesto al Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón en 2008 obteniendo un dictamen favorable (PI08/8). Con posterioridad, para la realización de esta tesis doctoral y todos los estudios pertinentes, se envió una adenda a este mismo órgano, que con fecha 16 de diciembre de 2015 (acta CP20/2015), emitió un dictamen favorable aprobando la ampliación del estudio y el reclutado de controles sanos (Anexo C).

Al tratarse de un estudio en menores de edad, los padres o tutores fueron los que recibieron toda la información del estudio y firmaron las hojas de información y consentimiento informado (Anexo D).

El estudio se ha realizado respetando la legislación vigente en materia de investigación clínica (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica), protección de datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal), autonomía del paciente (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de sus derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica).

Esta tesis doctoral se ha podido realizar gracias al apoyo económico suministrado por el grupo emergente de investigación reconocido por el Gobierno de Aragón B18_17D “Dermatología y Fotobiología”, por el apoyo económico de Werfen Group, así como por la cesión de instalaciones y equipos del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.

A continuación, se presenta a través de tablas, un resumen de los resultados descriptivos más destacados del estudio. Siguiendo los criterios de inclusión y exclusión descritos en el apartado 4.1, se han incluido un total de 246 pacientes: 103 controles y 143 casos (DA), de los que 52 proceden del HNJ y 92 del HSJ.

En la Tabla 23 se muestran las características descriptivas de la población de estudio. Se presentan los resultados separados por grupo de estudio y hospital. La edad media del grupo control fue de $8,93 \pm 5,81$ años y la del grupo DA de $5,43 \pm 3,98$ años. Por el diseño del estudio, se tuvo cierta flexibilidad a la hora de seleccionar los controles, y por este motivo el grupo control está formado por niños de una edad mayor, y por tanto con mayor peso y altura. Ambos grupos tienen una distribución por sexos equiparable, ya que a pesar de que la DA no es una enfermedad dependiente del sexo, se intentó seleccionar grupos homogéneos. Se reclutaron pacientes con fototipos del 1 al 4, siendo los fototipos mayoritariamente reclutados el 2 y el 3, representando la suma de ellos el 71,3 % del grupo DA y el 85,5 % de los controles (Tabla 23).

Tabla 23. Características descriptivas de la población de estudio.

	Control (n=103)	DA (n=143)	HNJ (n=51)	HSJ (n=92)
Sexo				
Hombres	57 (55,3%)	73 (51,0%)	24 (47,1%)	49 (53,3%)
Mujeres	46 (44,7%)	70 (49,0%)	27 (52,9%)	43 (46,7%)
Edad en años *	$8,93 \pm 5,81$	$5,43 \pm 3,98$	$6,44 \pm 3,78$	$4,86 \pm 4,01$
Peso en kg	$29,24 \pm 16,12$	$24,59 \pm 18,93$	$26,65 \pm 16,4$	$23,41 \pm 20,24$
Altura en cm *	$124,0 \pm 28,3$	$111,4 \pm 29,0$	$117,6 \pm 25,2$	$107,9 \pm 30,5$
IMC	$17,36 \pm 2,95$	$17,47 \pm 4,16$	$17,58 \pm 3,30$	$17,41 \pm 4,61$
Fototipo				
Fototipo 1	1 (1,0%)	8 (5,6%)	1 (1,9%)	7 (7,6%)
Fototipo 2	36 (35,0%)	52 (36,3%)	24 (47,1%)	28 (30,4%)
Fototipo 3	52 (50,5%)	50 (35,0%)	20 (39,2%)	30 (32,6%)
Fototipo 4	14 (13,6%)	33 (23,1%)	6 (11,8%)	27 (29,3%)

Se presentan los valores de n y % para las variables cualitativas, media \pm SD para las cuantitativas. *significación estadística ($p < 0,05$).

En la Tabla 24 se describen las características clínicas de los pacientes en relación con la atopía. Se muestra la clasificación de los pacientes en relación con la gravedad de la DA, medida a través de la escala SCORAD. Según este índice 69 pacientes (48,3 %) presentan

DA leve, 61 (42,7 %) DA moderada y 13 (9,0 %) tienen DA grave. Estos porcentajes son similares en ambos hospitales. También se estudia la coexistencia de otras enfermedades atópicas como asma y rinitis. El 34,6 % de los pacientes ha presentado asma, un 22,0 % rinitis y un 16,5 % ambos procesos. Por último, se mide el estado de alergia del individuo a través de la medida de IgE específicas (*Phadiatop Infant test*) e IgE sérica total. Un 54,3 % de los pacientes tuvieron test positivo, mientras que los valores de IgE sérica fueron superiores en el grupo DA respecto al grupo control (325,2 vs 157,6 UI/L), pasando de ser patológicos en el primer caso, a normales en el segundo. Según se ha definido el estudio, ninguno de los controles presenta o ha presentado asma o rinitis y el grado de alergia es negativo.

Tabla 24. Características clínicas de los grupos de estudio en relación con la atopia.

	Control	DA	HNJ	HSJ
SCORAD				
DA Leve (<25)	0 (0,0%)	69 (48,3%)	21 (41,2%)	48 (52,2%)
DA Moderada (25-50)	0 (0,0%)	61 (42,7%)	25 (49,0%)	36 (39,1%)
DA Grave (>50)	0 (0,0%)	13 (9,0%)	5 (9,8%)	8 (8,7%)
Asma - Si	0 (0,0%)	44 (34,6%)	26 (51,0%)	18 (23,7%)
Asma - No	103 (100,0%)	83 (65,4%)	25 (49,0%)	58 (76,3%)
Rinitis - Si	0 (0,0%)	28 (22,0%)	15 (29,4%)	13 (17,1%)
Rinitis - No	103 (100,0%)	99 (78,0%)	36 (70,6%)	63 (82,9%)
Asma + Rinitis	0 (0,0%)	21 (16,5%)	13 (25,5%)	8 (10,5%)
Asma o Rinitis	0 (0,0%)	30 (23,6%)	15 (29,4%)	15 (19,7%)
Ni Asma ni Rinitis	103 (100,0%)	76 (59,8%)	23 (45,1%)	53 (69,7%)
Grado de alergia				
Positivo	0 (0,0%)	75 (54,3%)	45 (90,0%)	30 (34,10%)
Negativo	103 (100,0%)	63 (45,7%)	5 (10,0%)	58 (65,9%)
IgE sérica (UI/L)*	157,6±163,5	325,2± 767,3	704,9±1154,5	149,2±396,3
Normal (<165,3 UI/L)	37 (82,2%)	83 (69,2%)	16 (42,1%)	67 (81,7%)
Patológico (>165,3 UI/L)	8 (17,8%)	37 (30,8%)	22 (57,9%)	15 (18,3%)

Se presentan los valores de n y % para las variables cualitativas, media±SD para las cuantitativas.

*significación estadística (p<0.05)

En la Tabla 25 se presenta la relación existente entre la DA y los parámetros séricos del metabolismo fosfocálcico y vitamina D. Se observa que los pacientes con DA tienen niveles de vitamina D inferiores a los de los controles (27,00 ng/ml vs 35,52 ng/ml). Teniendo en cuenta los rangos de normalidad definidos en la Tabla 10, se clasifica al grupo DA como población insuficiente en vitamina D, mientras que el grupo control presenta niveles óptimos (o suficientes) de esta hormona. Éste hecho también se refleja en que la población no suficiente para vitamina D es superior al 60% en el grupo DA,

mientras que en el grupo control es inferior al 35%. Por otro lado, la insuficiencia en vitamina D supone un factor de riesgo para el desarrollo de DA, como se deduce del análisis de asociación. Puede decirse, que por cada ng/ml que aumenta la vitamina D disminuye un 5% el riesgo de DA (OR 0,95; IC95% 0,91-0,99; p-valor 0,018) (Tabla 25).

Respecto al calcio y fósforo, ambos parámetros se encuentran dentro de los intervalos de normalidad establecidos, y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes con DA. Únicamente destaca que, en referencia al fósforo sérico, cada unidad de aumento (en mg/dl), aumenta el riesgo de DA en un 68%, sin ser ésta una diferencia estadísticamente significativa (OR 1,68; IC95% 0,99-2,85; p-valor 0,052) (Tabla 25).

Finalmente, en referencia al estudio comparativo y de asociación de la PTH, se debe destacar que el número de datos recogidos fue menor, y en cualquier caso no se han detectado ningún sujeto con PTH elevada. En las PTH observadas inferiores al rango de referencia biológico (PTH < 15 pg/ml) se comprobó normocalcemia y normofosfatemia en los pacientes, así como adecuados niveles de vitamina D, como factores excluyentes de estos resultados.

Tabla 25. Asociación entre DA y metabolismo fosfocálcico en los grupos de estudio.

Analito [^]	Control	DA	OR (IC95%)	p
Vitamina D (ng/ml)	35,52 (28,65;39,26)	27,00 (20,90;33,40)	0,95 (0,91;0,99)	0,018*
Deficiencia	4 (3,88%)	29 (21,17%)		
Insuficiencia	32 (31,07%)	54 (39,42%)		
Normal	67 (65,05%)	54 (39,42%)		
Calcio (mg/dl)	9,90 (9,70;10,10)	9,80 (9,40;10,10)	0,64 (0,32;1,28)	0,204
Normal	93 (90,29%)	135 (97,83%)		
Patológico bajo	3 (2,91%)	1 (0,72%)		
Patológico alto	7 (6,80%)	2 (1,45%)		
Fósforo (mg/dl)	5,05 (4,40;5,43)	5,10 (4,70;5,60)	1,68 (0,99;2,85)	0,052
Normal	92 (89,32%)	124 (91,18%)		
Patológico bajo	4 (3,89%)	7 (5,15%)		
Patológico alto	7 (6,80%)	5 (3,68%)		
PTH (pg/ml)	25,85 (23,37;34,02)	25,25 (16,33;38,70)	1,00 (0,96;1,05)	0,931
Normal	48 (94,12%)	109 (81,34%)		
Patológico bajo	3 (5,88%)	25 (18,66%)		
Patológico alto	0 (0,00%)	0 (0,00%)		

Se representa la mediana (RIQ) para las variables cuantitativas, n (%) para las categóricas. [^]Los valores de normalidad y de cada grupo patológico se definen en el Anexo B. *significación estadística (p<0.05).

En la Tabla 26 se presentan los niveles de vitamina D sérica en función de la gravedad de la DA estratificados por fototipos; claros (I a III) y oscuros (IV). En la primera parte de la gráfica se muestran los resultados correspondientes a la clasificación de SCORAD elegida en este trabajo. Los resultados no pueden ser valorables ya que para uno de los grupos no existen datos suficientes para realizar el análisis estadístico. Por ello se reclasifica la gravedad de la DA como: Leve (SCORAD <15), Moderada (SCORAD 15-40) y Grave (SCORAD >40). En base a esto los resultados muestran que existe una relación inversa entre las concentraciones de vitamina D séricas y la gravedad de la DA en niños con fototipos claros (p-valor 0,049), en cambio esta relación no se observa en los pacientes con fototipo oscuro.

Tabla 26. Relación entre niveles de vitamina D y gravedad de la DA estratificados por fototipos

Fototipo	DA Leve (<25)	DA Moderada (25-50)	DA Grave (>50)	p-valor
Fototipos Claros (I-III)	30,99±11,76	28,67±10,71	26,03±14,64	0,381
Fototipos Oscuros (IV)	23,62±8,87	28,00±10,95	nd**	0,050*
Fototipo	DA Leve (<15)	DA Moderada (15-40)	DA Grave (>40)	p-valor
Fototipos Claros (I-III)	36,47±11,97	28,68±11,43	27,58±12,11	0,049*
Fototipos Oscuros (IV)	18,97±2,57	28,33±9,96	24,41±14,20	0,290

Se presentan los valores de media±SD para los niveles de vitamina D en suero (ng/ml). Gravedad de la DA medida según la escala SCORAD. **nd, resultado no valorable (n=1). *significación estadística (p<0.05)

El estudio de los parámetros lipídicos en sangre se resume en la Tabla 27. Se muestran los resultados de los lípidos séricos en cada población de estudio, así como el estudio de asociación con la DA. Únicamente se observa asociación estadística significativa entre el colesterol LDL y la DA, de forma que, por cada mg/dl de aumento del nivel de LDL aumenta un 1% el riesgo de tener DA (OR 1,01; IC95% 1,00-1,03; p-valor 0,041). En el resto de parámetros no se observan diferencias ni en valor cuantitativo ni en cuanto a proporciones entre los grupos de estudio.

Tabla 27. Asociación entre DA y lípidos séricos en los grupos de estudio.

Analito [^]	Control	DA	OR (IC95%)	p
Triglicéridos	66 (55;80)	60 (45;88)		
Normal	103 (100,00%)	117 (93,60%)	1,00 (1,00;1,01)	0,395
Patológico	0 (0,00%)	8 (6,40%)		
Colesterol Total	163 (149;181)	164 (147;179)		
Deseable	93 (90,29%)	118 (87,41%)	1,00 (0,99;1,01)	0,627
Límite	10 (9,71%)	14 (10,37%)		
Elevado	0 (0,00%)	3 (2,22%)		
HDL	56 (49;63)	51,5 (46;59)		
Normal	66 (64,08%)	54 (64,29%)	0,97 (0,94;1,01)	0,102
Patológico bajo	5 (4,85%)	11 (13,10%)		
Patológico alto	32 (31,07%)	19 (22,62%)		
LDL	95 (81;108)	101 (86,95;120)		
Normal	96 (100,00%)	76 (90,48%)	1,01 (1,00;1,03)	0,041*
Riesgo	0 (0,00%)	8 (9,52%)		

Se representa mediana (RIQ) para las variables cuantitativas, n (%) para las variables categóricas. [^]Los valores de normalidad y de cada grupo patológico se definen en el anexo B. *significación estadística (p<0.05).

5.2. PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN *FLG*.

Los resultados que se muestran en los apartados 5.2 y 5.3 del presente trabajo, han sido recientemente publicados como artículo original en la revista *Pediatric Dermatology* bajo el título “*Prevalence of FLG loss-of-function mutations R501X, 2282del4, and R2447X in Spanish children with atopic dermatitis*” (176).

En la Tabla 28 se muestra la frecuencia y distribución de las mutaciones analizadas en el gen *FLG*. El análisis genético se realizó en la totalidad de los controles reclutados (n=103) y en 111 pacientes (de los 146 casos iniciales), debido a problemas en el análisis molecular, fundamentalmente relacionados con la estabilidad del ADN.

En el grupo DA se identifican las tres mutaciones estudiadas (R501X, 2282del4 y R2447X) con una prevalencia global combinada del 12,61 %. De los 14 pacientes que presentan al menos una mutación en *FLG*, 12 de ellos (10,81 %), la presentan en heterocigosis simple y 2 (1,80 %) como heterocigotos compuestos. En el grupo control sólo se identifican las mutaciones R501X y 2282del4 en dos sujetos (en heterocigosis simple), lo que supone una prevalencia global combinada del 1,94 %. El genotipo detallado y las características clínicas de todos los sujetos de estudio con mutación identificada en *FLG* se presenta resumida en la Tabla 29.

Tabla 28. Frecuencia de mutaciones en *FLG* en los grupos de estudio.

Genotipo <i>FLG</i> ^a		DA (n=111)		Control (n=103)	
Genotipo Combinado	aa	2	1,80 %	0	0,0 %
	Aa	12	10,81 %	2	1,94 %
	AA	97	87,39 %	101	98,06 %
R501X	C>T	11	9,91 %	1	0,97 %
	wt	100	90,09 %	102	99,03 %
2282del4	del	2	1,80 %	1	0,97 %
	wt	109	98,20 %	102	99,03 %
R2447X	C>T	3	2,70 %	0	0,00 %
	wt	108	97,30 %	103	100,00 %

^aGenotipo *FLG*: (AA) homocigoto-wt; (Aa) heterocigoto; (aa) homocigoto recesivo o heterocigoto compuesto; (wt), *wild-type*=genotipo normal.

Analizando cada mutación individualmente, R501X es la mutación más prevalente en el grupo DA, seguida de R2447X y 2282del4 identificadas en 11 (9,91 %), 3 (2,70 %) y 2 (1,80 %) pacientes respectivamente (Tabla 28). En el grupo control, las frecuencias observadas para R501X y 2282del4 son idénticas (0,97 %). Todas las mutaciones se encuentran en heterocigosis simple o como heterocigotos compuestos (Tabla 29). No se identifican homocigotos recesivos en ninguno de los dos grupos.

Tabla 29. Características clínicas y genotípicas de los sujetos con mutación identificada en FLG.

NID	Grupo	Genotipo FLG	Sexo	Edad ^a	SCORAD	Asma	Rinitis
5	DA	R501X / wt	Mujer	4,0	30,00	No	No
8	DA	R501X / wt	Hombre	6,0	11,30	Sí	No
12	DA	R501X / wt	Hombre	5,0	39,60	Sí	No
18	DA	R501X / R2447X	Mujer	13,0	12,70	Sí	Sí
21	DA	R501X / wt	Hombre	8,0	28,40	Sí	Sí
31	DA	R501X / wt	Mujer	0,1	19,40	No	No
32	DA	R501X / wt	Hombre	8,0	24,50	No	No
66	DA	R501X / wt	Mujer	2,0	14,00	No	No
94	DA	R501X / wt	Mujer	4,0	20,00	Sí	No
121	DA	R501X / wt	Hombre	1,5	18,00	Sí	Sí
130	DA	R501X / wt	Mujer	4,0	21,00	Sí	No
114	DA	R2447X / wt	Mujer	4,0	38,00	No	No
90	DA	2282del4 / wt	Hombre	0,5	36,00	Sí	No
75	DA	R2447X/2282del4	Hombre	12,0	25,00	No	No
195	Control	R501X / wt	Hombre	19,0	-	No	No
188	Control	2282del4 / wt	Hombre	22,0	-	No	No

NID, nº de estudio del sujeto; wt, *wild-type*=genotipo normal. ^a Edad en años.

5.3. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO *FLG*, DA y ATOPIA.

El estudio de asociación entre genotipo *FLG* y DA muestra una asociación estadísticamente significativa entre genotipo y enfermedad (Tabla 30). Dicho de otro modo, la presencia de alguna de las tres mutaciones analizadas en el gen *FLG* aumenta el riesgo de DA en 6,81 veces (IC95% 1,81-48,10; p-valor 0,003).

Al analizar cada mutación individualmente, sólo R501X muestra un OR significativo (OR 9,88; IC95% 1,85-245,85; p-valor 0,004), lo que indica que, a la vista de estos resultados, únicamente puede establecerse asociación entre DA y la mutación R501X. Para 2282del4 se obtiene un OR 1,87 que no se puede considerar significativo desde el punto de vista estadístico (IC95% 0,167-20,955; p-valor 1,00). En el caso de R2447X no es posible realizar el cálculo de OR debido a la ausencia de mutaciones en el grupo control.

Tabla 30. Asociación entre genotipo *FLG* y DA.

Genotipo <i>FLG</i> ^a		DA (n=111)		Control (n=103)		p-valor	OR (IC95%)
Genotipo Combinado	aa	2	1,80 %	0	0,0 %	0,003* [^]	6,81 (1,81-48,10)* [^]
	Aa	12	10,81 %	2	1,94 %		
	AA	97	87,39 %	101	98,06 %		
R501X	C>T	11	9,91 %	1	0,97 %	0,004*	9,88 (1,85-245,85)*
	wt	100	90,09 %	102	99,03 %		
2282del4	del	2	1,80 %	1	0,97 %	1,000	1,87 (0,167-20,955)
	wt	109	98,20 %	102	99,03 %		
R2447X	C>T	3	2,70 %	0	0,00 %	0,248	-
	wt	108	97,30 %	103	100,00 %		

^aGenotipo *FLG*: (AA) homocigoto-wt; (Aa) heterocigoto; (aa) homocigoto recesivo o heterocigoto compuesto; (wt), *wild-type*=genotipo normal. *significación estadística (p<0.05). [^]p-valor que corresponde a la comparación entre los grupos no mutado y al menos una mutación en *FLG*.

En la Tabla 31 se tiene en cuenta el hospital de origen de los casos (HNJ vs HSJ). Cuando se analiza el genotipo combinado, en el caso de tener alguna de las tres mutaciones se observan diferencias entre controles y casos de ambos hospitales, aunque se deben principalmente a pacientes procedentes del HNJ (16,7% vs 10,2%). En el análisis de la mutación R501X se observan diferencias estadísticas entre el grupo control y pacientes procedentes del HNJ (0,97 % vs 16,67 %; p-valor 0,002) pero no las hay entre grupo control y los procedentes del HSJ (0,97% vs 5,80%; p-valor 0,159).

Tabla 31. Asociación entre genotipo FLG y DA por hospital y grupo.

Genotipo FLG ^a		HNJ (n=42)	HSJ (n=69)	Control (n=103)	p	p C-HNJ	p C-HSJ	p HNJ-HSJ
Genotipo Combinado	aa	1 (2,4%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)	0,003*	0,008*	0,046*	0,478
	Aa	6 (14,3%)	6 (8,7%)	2 (1,9%)				
	AA	35 (83,3%)	62 (89,9%)	101 (98,1%)				
R501X	C>T	7 (16,7%)	4 (5,8%)	1 (1,0%)	0,001*	0,002*	0,159	0,148
	wt	35 (83,3%)	65 (94,2%)	102 (99,0%)				
2282del4	del	0 (0,0%)	2 (2,9%)	1 (1,0%)	0,590	1,000	0,848	0,848
	wt	42 (100,0%)	67 (97,1%)	102 (99,0%)				
R2447X	C>T	1 (2,4%)	2 (2,9%)	0 (0,0%)	0,193	0,434	0,434	1,000
	wt	41 (97,6%)	67 (97,1%)	103 (100,0%)				

^aGenotipo FLG: (AA) homocigoto-wt; (Aa) heterocigoto; (aa) homocigoto recesivo o heterocigoto compuesto; (wt), *wild-type*=genotipo normal. *significación estadística (p<0.05); C, grupo control.

Por otro lado, se analiza la asociación entre genotipo *FLG* y la gravedad de la DA medida a través de la escala SCORAD (Tabla 32). Todas las mutaciones identificadas están presentes en pacientes con DA leve (n=9; 16,1%) o moderada (n=5; 11,1%). No se ha identificado ninguna mutación en pacientes con enfermedad grave, aunque debe tenerse en cuenta que la distribución de los grupos no es homogénea, y por tanto estos resultados no son concluyentes. No se puede afirmar que exista una relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de mutaciones en *FLG* y la gravedad de la enfermedad, tanto si se analizan las mutaciones en conjunto como por separado.

Tabla 32. Asociación entre genotipo FLG y severidad de la DA.

Genotipo FLG ^a		DA leve		DA moderada		DA grave		p-valor
Genotipo Combinado	aa	2	3,6%	0	0,0%	0	0,0%	0,483
	Aa	7	12,5%	5	11,1%	0	0,0%	
	AA	47	83,9%	40	88,9%	10	100%	
R501X	C>T	8	14,3%	3	6,7%	0	0,0%	0,243
	wt	48	85,7%	42	93,3%	10	100%	
2282del4	del	1	1,8%	1	2,2%	0	0,0%	0,892
	wt	55	98,2%	44	97,8%	10	100%	
R2447X	C>T	2	3,6%	1	2,2%	0	0,0%	0,787
	wt	54	96,4%	44	97,8%	10	100%	

Severidad de la DA: leve (SCORAD <25), moderada (SCORAD 25-50) y grave (SCORAD >50). ^aGenotipo FLG: (AA) homocigoto-wt; (Aa) heterocigoto; (aa) homocigoto recesivo o heterocigoto compuesto; (wt), *wild-type*=genotipo normal. *significación estadística (p<0.05).

Finalmente, se analiza la asociación entre mutaciones en *FLG* y otras enfermedades atópicas. Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el desarrollo de asma y presencia de mutaciones en *FLG* (OR 5,71; 95%IC, 1,92-17,0; p-valor 0,002). Más concretamente, si se analizan las mutaciones individualmente, sólo es posible establecer asociación estadística significativa entre R501X y asma, de forma que los sujetos portadores de esta mutación tienen 7,78 veces más de riesgo de desarrollo de asma que aquellos con genotipo *wt* (OR 7,78; 95%IC, 2,28-28,7; p-valor 0,001) Tabla 33.

No existe asociación entre genotipo *FLG* y rinitis, ni tampoco si se valora la presencia de ambos procesos atópicos (asma más rinitis) en conjunto (Tablas 34 y 35).

Tabla 33. Asociación entre genotipo *FLG* y asma.

Genotipo <i>FLG</i>		No Asma	Si Asma	OR (95% IC)	p-valor
R501X	C>T	5 (2,94%)	7 (19,44%)	7,78 [2,28;28,7]	0,001*
	wt	165 (97,06%)	29 (80,56%)		
2282del4	del	2 (1,18%)	1 (2,78%)	0,39 [0,03;12,6]	0,519
	wt	168 (98,82%)	35 (97,22%)		
R227X	C>T	2 (1,18%)	1 (2,78%)	0,39 [0,03;12,6]	0,519
	wt	168 (98,82%)	35 (97,22%)		
FLGmut	No mut	162 (95,29%)	28 (77,78%)	5,71 [1,92;17,0]	0,002*
	mut	8 (4,71%)	8 (22,22%)		
HETcom	HetC	1 (0,59%)	1 (2,78%)	0,21 [0,01;8,30]	0,350
	wt	169 (99,41%)	35 (97,22%)		

Se evalúa tanto en DA como en controles. FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen *FLG*, No; ausencia de mutación en *FLG*. HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, *wt*; *wild type*. *significación estadística (p<0.05).

Tabla 34. Asociación entre genotipo *FLG* y rinitis.

Genotipo <i>FLG</i> ^a		No Rinitis	Si Rinitis	OR (95% IC)	p-valor
R501X	C>T	9 (4,86%)	3 (14,29%)	3,32 [0,65;12,6]	0,133
	wt	176 (95,14%)	18 (85,71%)		
2282del4	del	3 (1,62%)	0 (0,00%)	0,21 [0,02;6,76]	0,305
	wt	182 (98,38%)	21 (100,00%)		
R227X	C>T	2 (1,08%)	1 (4,76%)	2,27 [0,46;8,02]	0,278
	wt	183 (98,92%)	20 (95,24%)		
FLGmut	No mut	172 (92,97%)	18 (85,71%)	0,11 [0,00;4,45]	0,204
	mut	13 (7,03%)	3 (14,29%)		
HETcom	HetC	1 (0,54%)	1 (4,76%)	0,11 [0,00;4,45]	0,204
	wt	184 (99,46%)	20 (95,24%)		

Se evalúa tanto en DA como en controles. FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen *FLG*, No; ausencia de mutación en *FLG*. HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, *wt*; *wild type*. *significación estadística (p<0.05).

Tabla 35. Asociación entre genotipo FLG y enfermedades atópicas.

Genotipo <i>FLG</i> ^a		No Asm+Rin	Si Asm+Rin	OR (95% IC)	p-valor
R501X	C>T	9 (4,74%)	3 (18,75%)	4,70 [0,91;18,6]	0,063
	wt	181 (95,26%)	13 (81,25%)		
2282del4	del	3 (1,58%)	0 (0,00%)		
	wt	187 (98,42%)	16 (100,00%)		
R227X	C>T	2 (1,05%)	1 (6,25%)	0,15 [0,01;5,01]	0,233
	wt	188 (98,95%)	15 (93,75%)		
FLGmut	No	177 (93,16%)	13 (81,25%)	3,21 [0,64;11,9]	0,14
	mut	13 (6,84%)	3 (18,75%)		
HETcom	HetC	1 (0,53%)	1 (6,25%)	0,08 [0,00;3,30]	0,155
	wt	189 (99,47%)	15 (93,75%)		

Se evalúa tanto en DA como en controles. FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen FLG, No; ausencia de mutación en FLG. HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, *wt*; *wild type*. *significación estadística (p<0.05).

5.4. PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS EN VDR y CYP24A1

En la Tabla 36 se muestra el resultado del genotipado de los 12 SNPs que se eligieron de inicio para este estudio, correspondientes a los genes *VDR* y *CYP24A1*, tal cómo se definen en la Tabla 17. La ordenación de los genotipos posibles para cada SNP se ha realizado tomando como alelo *wt* (*wild-type*) al alelo con mayor frecuencia poblacional entre el alelo de referencia (Ref. Al.) y el alelo alternativo (Alt. Al.). Se presenta para cada genotipo el valor de n y su frecuencia.

Junto a estos resultados descriptivos, se presentan dos columnas adicionales para cada grupo de estudio, que se corresponden con la mayor frecuencia alélica observada (MAF, *major frequency allele*) y el valor del estadístico Chi-cuadrado con un grado de libertad para el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados indican que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los SNPs analizados en el grupo de estudio, no así en los controles, ya que los SNPs rs7975232 y rs2107301 tienen un porcentaje de *missings* superior al 90%, lo que impide realizar el estudio estadístico con garantías. Por esta razón se eliminan y no se tienen en cuenta para análisis posteriores.

Para completar la tabla, se añade una referencia a la frecuencia de genotipos para los SNPs estudiados correspondientes a la población *1000 Genomes Project Phase 3*, en la población mundial total (TOT, n=2504), europea (EUR, n=503) y de la península ibérica (IBS, n=107), con las que se comparan los resultados analizados (Tabla 36).

De los resultados descriptivos, se puede destacar, a grandes rasgos, que algunos polimorfismos muestran diferencias en su distribución respecto a la población de referencia. Para los genotipos rs2238136-CC y rs2238136-CT se observan diferencias en las frecuencias poblacionales del grupo control (0,676 para CC y 0,243 para CT), respecto a la población de referencia (0,505 y 0,449 respectivamente), siendo en ambos casos el alelo rs2238136-TT el minoritario. El genotipo rs3782905-CC tiene para el grupo DA una frecuencia poblacional inferior a la observada en el grupo control (0,076 vs 0,115 respectivamente), coincidente a su vez con la población de referencia (0,112). Para el SNP rs2239179, los genotipos rs2239179-TT y rs2239179-CC se observan diferencias en las frecuencias poblacionales del grupo control (0,448 y 0,155 para TT y CC

respectivamente) en relación a la población de referencia (0,290 para TT y 0,215 para CC). Si se comparan las frecuencias genotípicas de la población de referencia con el grupo DA, las diferencias son todavía mayores puesto que la frecuencia de rs2239179-CC aquí es 0,097. Otro ejemplo es el SNP rs731236, las frecuencias poblacionales obtenidas para el grupo DA son más cercanas a la población de referencia que las obtenidas en el grupo control, especialmente para el polimorfismo AA, que pasa a ser el mayoritario, mientras que en el grupo DA y población de referencia el mayoritario es GA. Finalmente, rs2248359-CT es más frecuente en la población de referencia (0,495) que el obtenido en este estudio (0,375).

Tabla 36. Prevalencia de SNPs en VDR y CY24A1 en los grupos de estudio.

SNP	Gen	Ref AI	Alt AI	Genotipo	Control				DA				1000 Genomes Project		
					n	F	MAF	HW	n	F	MAF	HW	TOT	EUR	IBS
rs2239185	VDR	G=0.498	A=0.502	A/A	29	0,322	0,508	0,148	36	0,319	0,527	0,428	0,277	0,340	0,374
				G/A	30	0,337			47	0,416			0,450	0,429	0,383
				G/G	30	0,337			30	0,265			0,273	0,231	0,243
rs1544410	VDR	C=0.704	T=0.296	C/C	27	0,380	0,585	0,404	40	0,342	0,573	0,676	0,520	0,370	0,308
				C/T	29	0,408			54	0,462			0,367	0,433	0,505
				T/T	15	0,211			23	0,197			0,112	0,177	0,187
rs7975232	VDR	C=0.485	A=0.515	A/A	nd	nd	nd	nd	23	0,324	0,542	0,554	0,293	0,338	0,374
				C/A	nd	nd	31	0,437	0,444	0,433			0,393		
				C/C	nd	nd	17	0,239	0,262	0,229			0,234		
rs2238136	VDR	C=0.833	T=0.167	C/C	50	0,676	0,639	0,148	45	0,433	0,605	0,625	0,700	0,527	0,505
				C/T	18	0,243			51	0,490			0,267	0,408	0,449
				T/T	6	0,081			8	0,077			0,034	0,066	0,047
rs3782905	VDR	G=0.763	C=0.237	G/G	47	0,540	0,713	0,404	66	0,555	0,739	0,691	0,589	0,455	0,421
				G/C	30	0,345			44	0,370			0,347	0,421	0,467
				C/C	10	0,115			9	0,076			0,064	0,123	0,112
rs2239179	VDR	T=0.639	C=0.361	T/T	36	0,448	0,647	0,532	48	0,425	0,664	0,676	0,428	0,354	0,290
				T/C	32	0,397			54	0,478			0,422	0,431	0,495
				C/C	12	0,155			11	0,097			0,150	0,211	0,215
rs1540339	VDR	C=0.614	T=0.386	C/C	32	0,397	0,610	0,544	44	0,379	0,582	0,428	0,419	0,412	0,449
				T/C	35	0,426			47	0,405			0,390	0,439	0,439
				T/T	15	0,183			25	0,216			0,191	0,149	0,112
rs2107301	VDR	G=0.663	A=0.337	G/G	21	0,700	nd	nd	40	0,465	0,651	0,428	0,486	0,499	0,523
				G/A	6	0,300	32	0,372	0,353	0,410			0,430		
				A/A	0	0,000	14	0,163	0,161	0,091			0,447		
rs2239182	VDR	T=0.521	C=0.479	T/T	24	0,282	0,506	0,532	45	0,375	0,592	0,554	0,292	0,252	0,159
				T/C	38	0,447			52	0,433			0,459	0,475	0,561
				C/C	23	0,271			23	0,192			0,250	0,272	0,280
rs731236	VDR	A=0.723	G=0.277	A/A	37	0,475	0,639	0,148	44	0,386	0,605	0,625	0,544	0,378	0,327
				G/A	25	0,328			50	0,439			0,360	0,445	0,486
				G/G	15	0,197			20	0,175			0,097	0,177	0,187
rs2248359	CYP24A1	C=0.551	T=0.449	C/C	33	0,344	0,531	0,404	35	0,360	0,564	0,554	0,313	0,344	0,374
				C/T	36	0,375			40	0,412			0,476	0,499	0,495
				T/T	27	0,281			22	0,226			0,211	0,157	0,131
rs2296241	CYP24A1	G=0.542	A=0.458	G/G	17	0,170	0,603	0,811	22	0,244	0,524	0,754	0,292	0,211	0,252
				G/A	44	0,440			43	0,463			0,499	0,513	0,449
				A/A	39	0,390			27	0,293			0,208	0,276	0,299

La n es variable, en función del número de muestras válidas para el análisis molecular. Ref AI, alelo de referencia; Alt AI, alelo alternativo; F, frecuencia; MAF, *major frequency allele*. Frecuencia de genotipos en la población *1000 Genomes Project Phase 3*, población mundial total (TOT, n=2504), europea (EUR, n=503) e ibérica (IBS, n=107).

5.5. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO VDR, CYP24A1, DA y ATOPIA.

En las Tablas 37 a 46 se estudia la asociación entre DA y los diferentes polimorfismos del gen *VDR* y *CYP24A1*. Se muestran los resultados para los cinco modelos genéticos posibles: codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo, así como los posibles genotipos que se derivan de cada modelo. La elección del mejor modelo en cada caso, depende del menor valor de AIC (coeficiente de información de Akaike) obtenido en el estudio estadístico (Anexo E).

Únicamente se observa asociación estadística significativa con los polimorfismos rs2239182 y rs2238136, ambos del gen *VDR*. En el caso de rs2239182 (Tabla 40) se observa un efecto protector en el modelo codominante, ya que el genotipo C/C reduce en un 66% el riesgo de DA (OR 0,34; IC95% 0,13-0,87; p-valor 0,026) y la presencia del alelo C, en el modelo dominante, reduce el riesgo en un 58% (OR 0,42; IC95% 0,18-0,90; p valor 0,031).

El SNP rs2238136 (Tabla 44) se muestra como un factor de riesgo para el desarrollo de DA en los modelos codominante, dominante y sobredominante y sin ser significativa, pero con un p valor límite, en el aditivo (p-valor 0,024; 0,019; 0,016 y 0,055 respectivamente). Según estos resultados, los pacientes con genotipo C/T tienen de 2,94 a 3,09 veces más riesgo de tener DA según se utilice el modelo sobredominante o codominante respectivamente. Según el modelo dominante, el resultado indica que tener el alelo T en dicho polimorfismo aumenta en 2,70 veces el riesgo de DA (OR 2,70; IC95% 1,24-6,15; p-valor 0,019).

Tabla 37. Análisis de asociación entre rs731236 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	P ^a	P ^b
Codominante						
A/A	81 (42,40%)	37 (47,54%)	44 (38,60%)			0,354
G/A	75 (39,28%)	25 (32,79%)	50 (43,86%)	1,64 [0,82;3,34]	0,166	
G/G	35 (18,32%)	15 (19,67%)	20 (17,54%)	1,09 [0,47;2,64]	0,838	
Dominante						
A/A	81 (42,40%)	37 (47,54%)	44 (38,60%)			0,326
G/A-G/G	110 (57,59%)	40 (52,46%)	70 (61,40%)	1,44 [0,76;2,71]	0,259	
Recesivo						
A/A-G/A	156 (81,68%)	62 (80,52%)	94 (82,46%)			0,887
G/G	35 (18,32%)	15(19,48%)	20 (17,54%)	0,87 [0,39;1,98]	0,726	
Sobredominante						
A/A-G/G	116 (60,73%)	52 (67,53%)	64 (56,14%)			0,207
G/A	75 (39,27%)	25 (32,47%)	50 (43,86%)	1,59 [0,84;3,10]	0,158	
Aditivo	0,77 (0,74)	0,72 (0,78)	0,79 (0,72)	1,13 [0,74;1,73]	0,561	0,572

^a p-valor del test de asociación (comparación con el modelo nulo). *significación estadística (p<0.05)

Tabla 38. Análisis de asociación entre rs1544410 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
C/C	67 (35,64%)	27 (38,03%)	40 (34,19%)			0,774
C/T	83 (44,15%)	29 (40,85%)	54 (46,15%)	1,25 [0,64;2,45]	0,506	
T/T	38 (20,21%)	15 (21,13%)	23 (19,66%)	1,03 [0,46;2,37]	0,938	
Dominante						
C/C	67 (35,64%)	27 (38,03%)	40 (34,19%)			0,707
C/T-T/T	121 (64,36%)	44 (61,97%)	77 (65,81%)	1,18 [0,64;2,18]	0,597	
Recesivo						
C/C-C/T	150 (79,79%)	56 (78,87%)	94 (80,34%)			0,956
T/T	38 (20,21%)	15 (21,13%)	23 (19,66%)	0,91 [0,44;1,93]	0,805	
Sobredominante						
C/C-T/T	105 (55,85%)	42 (59,15%)	63 (53,85%)			0,576
C/T	83 (44,15%)	29 (40,85%)	54 (46,15%)	1,24 [0,68;2,27]	0,483	
Aditivo	0,85 (0,73)	0,83 (0,76)	0,85 (0,72)	1,05 [0,70;1,57]	0,829	0,832

Tabla 39. Análisis de asociación entre rs2239185 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
A/A	65 (32,18%)	29 (32,20%)	36 (31,86%)			0,519
G/A	77 (38,12%)	30 (33,90%)	47 (41,59%)	1,24 [0,57;2,68]	0,586	
G/G	60 (29,70%)	30 (33,90%)	30 (26,55%)	0,79 [0,36;1,77]	0,571	
Dominante						
A/A	65 (32,19%)	29 (32,58%)	36 (31,86%)			1
G/A-G/G	137 (67,82%)	60 (67,41%)	77 (68,14%)	1,02 [0,51;1,99]	0,959	
Recesivo						
A/A-G/A	142 (70,30%)	59 (66,29%)	83 (73,45%)			0,406
G/G	60 (29,70%)	30 (33,71%)	30 (26,55%)	0,71 [0,36;1,41]	0,321	
Sobredominante						
A/A-G/G	125 (61,88%)	59 (66,29%)	66 (58,41%)			0,414
G/A	77 (38,11%)	30 (33,71%)	47 (41,59%)	1,38 [0,72;2,71]	0,333	
Aditivo	0,97 (0,78)	1,02 (0,82)	0,95 (0,77)	0,89 [0,60;1,33]	0,577	0,588

Tabla 40. Análisis de asociación entre rs2239182 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
T/T	69 (33,66%)	24 (28,24%)	45 (37,50%)			0,039*
T/C	90 (43,90%)	38 (44,71%)	52 (43,33%)	0,47 [0,20;1,08]	0,084	
C/C	46 (22,44%)	23 (27,06%)	23 (19,17%)	0,34 [0,13;0,87]	0,026*	
Dominante						
T/T	69 (33,66%)	24 (28,24%)	49 (40,80%)			0,046*
T/C-C/C	136 (66,34%)	61 (71,76%)	71 (59,16%)	0,42 [0,18;0,90]	0,031*	
Recesivo						
T/T-T/C	159 (77,56%)	62 (72,94%)	97 (80,83%)			0,244
C/C	46 (22,44%)	23 (27,06%)	23 (19,17%)	0,64 [0,33;1,25]	0,189	
Sobredominante						
T/T-C/C	115 (56,10%)	47 (55,29%)	68 (56,67%)			0,958
T/C	90 (43,90%)	38 (44,71%)	52 (43,33%)	0,95 [0,54;1,66]	0,846	
Aditivo	0,89 (0,74)	0,99 (0,75)	0,82 (0,73)	0,73 [0,50;1,07]	0,104	0,105

Tabla 41. Análisis de asociación entre rs1540339 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
C/C	76 (38,38%)	32 (39,71%)	44 (37,93%)			0,816
T/C	82 (41,41%)	35 (42,65%)	47 (40,52%)	0,99 [0,51;1,95]	0,988	
T/T	40 (20,21%)	15 (17,65%)	25 (21,55%)	1,27 [0,55;3,03]	0,577	
Dominante						
C/C	76 (38,38%)	32 (39,02%)	44 (37,93%)			0,935
T/C-T/T	122 (61,62%)	50 (60,98%)	72 (62,07%)	1,08 [0,58;1,99]	0,811	
Recesivo						
C/C-T/C	158 (79,80%)	67 (81,71%)	91 (78,45%)			0,655
T/T	40 (20,20%)	15 (18,29%)	25 (21,55%)	1,27 [0,60;2,83]	0,535	
Sobredominante						
C/C-T/T	116 (58,59%)	47 (57,32%)	69 (59,48%)			0,898
T/C	82 (41,41%)	35 (42,68%)	47 (40,52%)	0,92 [0,50;1,69]	0,778	
Aditivo	0,82 (0,75)	0,78 (0,73)	0,84 (0,76)	1,11 [0,74;1,66]	0,617	0,616

Tabla 42. Análisis de asociación entre rs2239179 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
T/T	84 (43,52%)	36 (45,00%)	48 (42,48%)			0,426
T/C	86 (44,56%)	32 (40,00%)	54 (47,79%)	1,27 [0,64;2,53]	0,496	
C/C	23 (11,92%)	12 (15,00%)	11 (9,73%)	0,66 [0,24;1,87]	0,431	
Dominante						
T/T	84 (43,52%)	36 (45,00%)	48 (42,48%)			0,896
T/C-C/C	109 (56,48%)	44 (55,00%)	65 (57,52%)	1,10 [0,58;2,09]	0,771	
Recesivo						
T/T-T/C	170 (88,08%)	68 (85,00%)	102 (90,27%)			0,388
C/C	23 (11,92%)	12 (15,00%)	11 (9,73%)	0,59 [0,23;1,57]	0,281	
Sobredominante						
T/T-C/C	107 (55,44%)	48 (60,00%)	59 (52,21%)			0,396
T/C	86 (44,56%)	32 (40,00%)	54 (47,79%)	1,39 [0,73;2,67]	0,318	
Aditivo	0,68 (0,67)	0,71 (0,73)	0,67 (0,65)	0,93 [0,58;1,48]	0,751	0,762

Tabla 43. Análisis de asociación entre rs3782905 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
C/C	113 (54,85%)	47 (54,02%)	66 (55,46%)			0,623
C/G	74 (35,92%)	30 (34,48%)	44 (36,97%)	1,04 [0,57;1,91]	0,889	
G/G	19 (9,22%)	10 (11,49%)	9 (7,56%)	0,64 [0,24;1,74]	0,383	
Dominante						
C/C	113 (54,85%)	47 (54,02%)	66 (55,46%)			0,95
C/G-G/G	93 (45,15%)	40 (45,98%)	53 (44,54%)	0,94 [0,54;1,65]	0,839	
Recesivo						
C/C-C/G	187 (90,78%)	77 (88,51%)	110 (92,44%)			0,472
G/G	19 (9,22%)	10 (11,49%)	9 (7,56%)	0,63 [0,24;1,66]	0,349	
Sobredominante						
C/C-G/G	132 (64,08%)	57 (65,52%)	75 (63,03%)			0,825
C/G	74 (35,92%)	30 (34,48%)	44 (36,97%)	1,11 [0,62;2,00]	0,717	
Aditivo	0,54 (0,66)	0,57 (0,69)	0,52 (0,64)	0,88 [0,58;1,34]	0,563	0,57

Tabla 44. Análisis de asociación entre rs2238136 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
C/C	95 (53,37%)	50 (67,57%)	45 (43,27%)			0,024*
C/T	69 (38,76%)	18 (24,32%)	51 (49,04%)	3,09 [1,34;7,73]	0,008*	
T/T	14 (7,87%)	6 (8,11%)	8 (7,69%)	1,44 [0,37;7,41]	0,618	
Dominante						
C/C	95 (53,37%)	50 (67,57%)	45 (43,27%)			0,019*
C/T-T/T	83 (46,63%)	24 (32,43%)	59 (56,73%)	2,70 [1,24;6,15]	0,012*	
Recesivo						
C/C-C/T	164 (92,13%)	68 (91,89%)	96 (92,31%)			1
T/T	14 (7,87%)	6 (8,11%)	8 (7,69%)	0,92 [0,24;4,62]	0,907	
Sobredominante						
C/C-T/T	109 (61,24%)	56 (75,68%)	53 (50,96%)			0,016*
C/T	69 (38,76%)	18 (24,32%)	51 (49,04%)	2,94 [1,30;7,24]	0,009*	
Aditivo	0,58 (0,63)	0,41 (0,64)	0,64 (0,62)	1,92 [1,00;3,71]	0,052	0,055

Tabla 45. Análisis de asociación entre rs2296241 y DA

Modelo Genotipo	Total	Control	DA	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
A/A	66 (34,38%)	39 (39,00%)	27 (29,35%)			0,63
G/A	87 (45,31%)	44 (44,00%)	43 (46,74%)	1,39 [0,50;3,88]	0,526	
G/G	39 (20,31%)	17 (17,00%)	22 (23,91%)	1,75 [0,51;6,33]	0,376	
Dominante						
A/A	66 (34,38%)	39 (39,00%)	27 (29,35%)			0,527
G/A-G/G	126 (65,63%)	61 (61,00%)	65 (70,65%)	1,50 [0,59;3,90]	0,398	
Recesivo						
A/A-G/A	153 (79,69%)	83 (83,00%)	70 (76,09%)			0,667
G/G	39 (20,31%)	17 (17,00%)	22 (23,91%)	1,46 [0,49;4,57]	0,499	
Sobredominante						
A/A-G/G	105 (54,69%)	56 (56,00%)	49 (53,26%)			0,982
G/A	87 (45,31%)	44 (44,00%)	43 (46,74%)	1,12 [0,46;2,73]	0,810	
Aditivo	0,88 (0,74)	0,79 (0,73)	0,95 (0,74)	1,34 [0,73;2,46]	0,341	0,345

Tabla 46. Análisis de asociación entre rs2248359 y DA

Modelo Genotipo	Total (n=71)	Control (n=32)	DA (n=39)	OR (IC 95%)	p	p
Codominante						
C/C	68 (35,23%)	33 (34,38%)	35 (36,08%)			0,885
C/T	76 (39,38%)	36 (37,50%)	40 (41,24%)	1,05 [0,34;3,17]	0,935	
T/T	49 (25,39%)	27 (28,12%)	22 (22,68%)	0,79 [0,23;2,73]	0,710	
Dominante						
C/C	68 (35,23%)	33 (34,38%)	35 (36,08%)			1,000
C/T-T/T	125 (64,77%)	63 (65,63%)	62 (63,92%)	0,94 [0,34;2,53]	0,899	
Recesivo						
C/C-C/T	144 (74,61%)	69 (71,88%)	75 (77,32%)			0,832
T/T	49 (25,39%)	27 (28,12%)	22 (22,68%)	0,77 [0,26;2,31]	0,638	
Sobredominante						
C/C-T/T	117 (60,62%)	60 (62,50%)	57 (58,76%)			0,953
C/T	76 (39,38%)	36 (37,50%)	40 (41,24%)	1,16 [0,44;3,08]	0,770	
Aditivo	0,90 (0,78)	0,94 (0,80)	0,87 (0,77)	0,90 [0,49;1,64]	0,721	0,727

También, se analiza la posible asociación entre genotipos *VDR* y *CYP24A1* y la gravedad de la DA medida a través de la escala SCORAD (Tabla 47). No se evidencia ninguna relación estadísticamente significativa entre los diferentes SNPs analizados y la gravedad de la enfermedad, aunque debe tenerse en cuenta que la distribución de los grupos no es homogénea, y que, para simplificar la tabla, los resultados mostrados únicamente hacen referencia al modelo codominante en cada uno de los SNPs, independientemente de que éste sea el modelo que mejor se ajuste a la distribución o no.

Tabla 47. Asociación entre polimorfismos *VDR*, *CYP24A1* y gravedad de la DA

SNP	Genotipo	DA Leve	DA Moderado	DA Grave	p-valor
rs731236	G/G	8 (15,38%)	10 (20,41%)	2 (22,22%)	0,835
	G/A	24 (46,15%)	20 (40,82%)	5 (55,56%)	
	A/A	20 (38,46%)	19 (38,78%)	2 (22,22%)	
rs1544410	T/T	10 (18,52%)	10 (20,00%)	3 (33,33%)	0,561
	C/C	18 (33,33%)	19 (38,00%)	1 (11,11%)	
	C/T	26 (48,15%)	21 (42,00%)	5 (55,56%)	
rs2239185	G/G	18 (35,29%)	10 (20,41%)	1 (11,11%)	0,322
	A/A	16 (31,37%)	15 (30,61%)	3 (33,33%)	
	G/A	17 (33,33%)	24 (48,98%)	5 (55,56%)	
rs2239182	C/C	9 (16,36%)	10 (19,61%)	4 (40,00%)	0,442
	T/T	24 (43,64%)	18 (35,29%)	2 (20,00%)	
	T/C	22 (40,00%)	23 (45,10%)	4 (40,00%)	
rs1540339	T/T	12 (22,64%)	11 (22,00%)	1 (11,11%)	0,860
	C/C	18 (33,96%)	19 (38,00%)	5 (55,56%)	
	T/C	23 (43,40%)	20 (40,00%)	3 (33,33%)	
rs2239179	C/C	3 (5,88%)	6 (12,24%)	2 (22,22%)	0,415
	T/T	23 (45,10%)	20 (40,82%)	2 (22,22%)	
	T/C	25 (49,02%)	23 (46,94%)	5 (55,56%)	
rs3782905	G/G	4 (7,27%)	3 (6,00%)	2 (20,00%)	0,104
	C/G	17 (30,91%)	20 (40,00%)	6 (60,00%)	
	C/C	34 (61,82%)	27 (54,00%)	2 (20,00%)	
rs2238136	T/T	4 (8,51%)	3 (6,38%)	1 (14,29%)	0,821
	C/T	24 (51,06%)	23 (48,94%)	4 (57,14%)	
	C/C	19 (40,43%)	21 (44,68%)	2 (28,57%)	
rs2296241	G/G	12 (33,33%)	16 (21,05%)	1 (11,11%)	0,542
	A/A	10 (27,78%)	12 (31,58%)	2 (22,22%)	
	G/A	14 (38,89%)	18 (47,37%)	6 (66,66%)	
rs2248359	T/T	8 (23,53%)	10 (26,32%)	1 (11,11%)	0,974
	C/C	14 (41,18%)	12 (31,58%)	4 (44,44%)	
	C/T	12 (35,29%)	16 (42,11%)	4 (44,44%)	

Severidad de la DA: leve (SCORAD <25), moderada (SCORAD 25-50) y grave (SCORAD >50).

En la Tabla 48 se presenta el estudio de asociación entre los polimorfismos en *VDR* y *CYP24A1* y otras enfermedades atópicas, tales como asma y rinitis. No se ha encontrado asociación estadística significativa para ninguno de los SNPs analizados.

Tabla 48. Asociación entre polimorfismos de *VDR* y *CYP24A1* y otras enfermedades atópicas.

SNP Genotipo	Asma			Rinitis			Asma+Rinitis			
	si	no	p	si	no	p	si	no	p	
rs731236	G/G	7 (19,44%)	23 (17,56%)	0,357	2 (10,00%)	28 (19,05%)	0,226	2 (13,33%)	28 (18,42%)	0,117
	G/A	11 (30,56%)	57 (43,51%)		6 (30,00%)	62 (42,18%)		3 (20,00%)	65 (42,76%)	
	A/A	18 (50,00%)	51 (38,93%)		12 (60,00%)	57 (38,78%)		10 (66,67%)	59 (38,82%)	
rs1544410	T/T	7 (18,92%)	29 (20,42%)	0,791	2 (9,52%)	34 (21,52%)	0,206	2 (12,50%)	34 (20,86%)	0,099
	C/C	15 (40,54%)	49 (34,51%)		11 (52,38%)	53 (33,54%)		10 (62,50%)	54 (33,13%)	
	C/T	15 (40,54%)	64 (45,07%)		8 (38,10%)	71 (44,94%)		4 (25,00%)	75 (46,01%)	
rs2239185	G/G	14 (40,00%)	33 (25,58%)	0,207	8 (40,00%)	39 (27,08%)	0,174	8 (53,33%)	39 (26,17%)	0,122
	A/A	11 (31,43%)	43 (33,33%)		3 (15,00%)	51 (35,42%)		3 (20,00%)	51 (34,23%)	
	G/A	10 (28,57%)	53 (41,09%)		9 (45,00%)	54 (37,50%)		4 (26,67%)	59 (39,60%)	
rs2239182	C/C	8 (21,62%)	38 (23,90%)	0,297	2 (9,09%)	44 (25,29%)	0,179	1 (6,25%)	45 (25,00%)	0,153
	T/T	16 (43,24%)	48 (30,19%)		10 (45,45%)	54 (31,03%)		8 (50,00%)	56 (31,11%)	
	T/C	13 (35,14%)	73 (45,91%)		10 (45,45%)	76 (43,68%)		7 (43,75%)	79 (43,89%)	
rs1540339	T/T	8 (21,62%)	27 (19,57%)	0,425	5 (23,81%)	30 (19,48%)	0,120	3 (18,75%)	32 (20,13%)	0,139
	C/C	11 (29,73%)	57 (41,30%)		4 (19,05%)	64 (41,56%)		3 (18,75%)	65 (40,88%)	
	T/C	18 (48,65%)	54 (39,13%)		12 (57,14%)	60 (38,96%)		10 (62,50%)	62 (38,99%)	
rs2239179	C/C	3 (8,57%)	17 (13,28%)	0,802	0 (0,00%)	20 (13,99%)	0,207	0 (0,00%)	20 (13,51%)	0,352
	T/T	16 (45,71%)	53 (41,41%)		10 (50,00%)	59 (41,26%)		8 (53,33%)	61 (41,22%)	
	T/C	16 (45,71%)	58 (45,31%)		10 (50,00%)	64 (44,76%)		7 (46,67%)	67 (45,27%)	
rs3782905	G/G	1 (2,70%)	18 (11,25%)	0,285	1 (4,55%)	18 (10,29%)	0,710	0 (0,00%)	19 (10,50%)	0,216
	C/G	13 (35,14%)	57 (35,62%)		7 (31,82%)	63 (36,00%)		4 (25,00%)	66 (36,46%)	
	C/C	23 (62,16%)	85 (53,12%)		14 (63,64%)	94 (53,71%)		12 (75,00%)	96 (53,04%)	
rs2238136	T/T	2 (6,45%)	7 (6,67%)	0,522	0 (0,00%)	9 (7,50%)	0,253	0 (0,00%)	9 (7,26%)	0,548
	C/T	16 (51,61%)	43 (40,95%)		10 (62,50%)	49 (40,83%)		7 (58,33%)	52 (41,94%)	
	C/C	13 (41,94%)	55 (52,38%)		6 (37,50%)	62 (51,67%)		5 (41,67%)	63 (50,81%)	
rs2296241	G/G	5 (26,32%)	11 (18,97%)	0,658	2 (25,00%)	14 (20,29%)	0,896	2 (28,57%)	14 (20,00%)	0,774
	A/A	5 (26,32%)	21 (36,21%)		2 (25,00%)	24 (34,78%)		2 (28,57%)	24 (34,29%)	
	G/A	9 (47,37%)	26 (44,83%)		4 (50,00%)	31 (44,93%)		3 (42,86%)	32 (45,71%)	
rs2248359	T/T	3 (17,65%)	15 (29,41%)	0,685	0 (0,00%)	18 (29,51%)	0,211	0 (0,00%)	18 (29,03%)	0,317
	C/C	7 (41,18%)	17 (33,33%)		4 (57,14%)	20 (32,79%)		3 (50,00%)	21 (33,87%)	
	C/T	7 (41,18%)	19 (37,25%)		3 (42,86%)	23 (37,70%)		3 (50,00%)	23 (37,10%)	

Se evalúa tanto en DA como en controles.

Por último, se estudia la posible combinación de alelos (o haplotipos) para algunos SNPs seleccionados. Se eligen rs2238136, rs2239185 y rs1540339 (Tabla 49) por ser SNPs presentes en regiones intrónicas relacionadas con factores de transcripción en el gen *VDR*. Por otro lado, se eligen los SNPs rs2239182, rs2107301 y rs2239179 por estar todos ellos en la misma región intrónica (entre los exones 4 y 5 del gen *VDR*) y por tanto poder estar en equilibrio de ligamiento (Tabla 50). Y finalmente los haplotipos correspondientes a la combinación de SNPs del gen *CYP24A1*: rs2296241 y rs2248359 (Tabla 51).

De los haplotipos analizados, únicamente se observa significación estadística con el haplotipo GCC (rs2239185-G, rs1540339-C, rs2238136-C) que parece ser un haplotipo protector frente al desarrollo de DA, puesto que reduce el riesgo de DA en un 49% (OR 0,511; IC 95% 0,232-0,939; p-valor 0,038).

Tabla 49. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2239185, rs1540339 y rs2238136.

rs2239185	rs1540339	rs2238136	F	OR	IC 95%		p-valor
A	C	C	0,262	1	NA	NA	NA
A	C	T	0,090	0,830	0,270	2,546	0,744
A	T	C	0,091	0,474	0,175	1,279	0,140
A	T	T	0,072	2,882	0,634	13,097	0,171
G	C	C	0,208	0,511	0,232	0,939	0,038*
G	C	T	0,032	0,686	0,240	2,409	0,570
G	T	C	0,166	0,933	0,441	1,974	0,856
G	T	T	0,079	1,252	0,411	3,812	0,692

F=frecuencia del haplotipo. *significación estadística (p<0.05)

Tabla 50. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2239182, rs2107301 y rs2239179.

rs2239182	rs2107301	rs2239179	F	OR	IC 95%		p-valor
C	G	C	0,347	1	NA	NA	NA
C	A	C	0,010	80,403	80,285	80,521	0,000
C	G	T	0,087	0,752	0,323	1,754	0,510
T	A	T	0,284	1,555	0,726	3,334	0,256
T	G	T	0,267	1,053	0,539	2,059	0,880

F=frecuencia del haplotipo

Tabla 51. Haplotipos resultantes de la combinación de rs2248359 y rs2296241.

rs2248359	rs2296241	F	OR	IC 95%		p-valor
T	A	0,398	1	NA	NA	NA
C	A	0,138	1,620	0,552	4,751	0,380
C	G	0,398	1,108	0,546	2,247	0,777
T	G	0,065	0,904	0,189	4,323	0,899

F=frecuencia del haplotipo

5.6. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS, VIT D y METABOLISMO FOSFOCÁLCICO.

A continuación, se analiza la posible asociación entre las mutaciones y polimorfismos en los genes seleccionados y los parámetros séricos relacionados con el metabolismo fosfofórico y la vitamina D. Para ello se comparan tanto los valores séricos cuantitativos, como dichos valores categorizados según la clasificación normal/patológica. Para este análisis se considera una única población de estudio con todos los pacientes reclutados, sin diferenciar entre casos y controles.

En cuanto al análisis de asociación entre vitamina D y los genotipos estudiados, se evidencia que no existe asociación estadística significativa entre los niveles de vitamina D y la presencia de mutaciones en el gen *FLG* (Tabla 52) ni tampoco con los SNPs del gen *CYP24A1* (Tabla 53).

Tabla 52. Asociación entre mutaciones *FLG* y vitamina D.

		vitamina D (ng/ml)	p	Normal	Insuficiencia	Deficiencia	p
R501X	C/T	30,06±12,69		2 (18,18%)	4 (36,36%)	5 (45,45%)	
	wt	28,58±12,22	0,703	22 (20,75%)	45 (42,45%)	39 (36,79%)	0,852
2282del4	del	30,30±16,69		1 (50,00%)	0 (0,00%)	1 (50,00%)	
	wt	28,69±12,22	0,854	23 (20,00%)	49 (42,61%)	43 (37,39%)	0,407
R2447X	C>T	36,60±23,46		1 (33,33%)	1 (33,33%)	1 (33,33%)	
	wt	28,51±11,91	0,259	23 (20,18%)	48 (42,11%)	43 (37,72%)	0,854
FLGmut	No	28,55±12,29		21 (20,39%)	44 (42,72%)	38 (36,89%)	
	mut	29,96±12,06	0,686	3 (21,43%)	5 (35,71%)	6 (42,86%)	0,875
HETcom	HetC	40,80±31,54		1 (50,00%)	0 (0,00%)	1 (50,00%)	
	wt	28,51±11,85	0,159	23 (20,00%)	49 (42,61%)	43 (37,39%)	0,407

FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen *FLG*, No; ausencia de mutación en *FLG*. HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, *wt*; *wild type*. Se presentan los valores de n y % para las variables cualitativas, media±SD para las cuantitativas.

Si que se observa asociación con algún SNP del gen *VDR* (Tabla 53). Los sujetos que presentan el alelo rs2239182-CC tienen niveles de vitamina D más elevados que aquellos con genotipo rs2239182-TT (28,10±8,80 vs 24,80±8,70 ng/ml, p-valor 0,027). También se observan diferencias estadísticas significativas en el SNP rs2238136, los sujetos con genotipo rs2238136-TT presentan niveles de vitamina D más bajos que los sujetos con genotipo CT o CC (21,82 vs 27,06 y 29,04 ng/ml respectivamente, p-valor 0,046).

Al analizar las diferencias entre grupos patológicos (normal, insuficiente y deficiente), se observan diferencias significativas en el rs2239185 ya que el alelo heterocigoto GA tiene una elevada proporción de pacientes con deficiencia (42,31 %) en comparación con las alternativas genotípicas homocigotas

AA y GG que tienen porcentajes de 30,56 y 33,33 %. Así mismo, rs2248359-TT presenta una proporción de pacientes con deficiencia de vitamina D muy superior a los alelos CC y CT (56,52% vs 33,73 y 35,29% respectivamente).

Tabla 53. Asociación entre polimorfismos en *VDR* y *CYP24A1* y vitamina D.

SNP	Genotipo	vitamina D (ng/ml)	p	Normal	Insuficiencia	Deficiencia	p	
rs731236	G/G	28,35 ± 12,28		9	28,57%	11	33,33%	0,444
	G/A	27,81 ± 11,20	0,860	16	24,07%	23	35,19%	
	A/A	28,05 ± 12,82	0,924	12	18,18%	35	52,27%	
rs1544410	T/T	29,51 ± 11,10		6	16,67%	15	41,67%	0,232
	C/C	29,35 ± 13,74	0,957	9	14,63%	32	51,22%	
	C/T	26,42 ± 10,55	0,282	22	31,03%	23	32,76%	
rs2239185	G/G	29,60 ± 14,91		9	20,00%	21	46,67%	0,049*
	A/A	27,45 ± 9,15	0,470	8	13,89%	30	55,56%	
	G/A	27,49 ± 11,93	0,444	19	30,77%	17	26,92%	
rs2239182	C/C	28,10 ± 8,80		8	20,83%	14	37,50%	0,478
	T/T	24,80 ± 8,70	0,027*	17	25,00%	32	47,73%	
	T/C	30,00 ± 13,50	0,254	18	20,69%	30	34,48%	
rs1540339	T/T	25,61 ± 10,01		9	24,00%	17	44,00%	0,795
	C/C	28,90 ± 13,65	0,265	18	25,53%	24	34,04%	
	T/C	28,27 ± 10,91	0,362	15	20,00%	35	46,00%	
rs2239179	C/C	27,35 ± 7,60		3	18,18%	8	45,45%	0,448
	T/T	26,99 ± 9,89	0,929	14	18,75%	36	50,00%	
	T/C	28,97 ± 14,05	0,682	18	27,12%	21	32,20%	
rs3782905	C/C	29,90 ± 9,88		3	22,22%	5	33,33%	0,206
	C/G	26,92 ± 12,59	0,505	23	32,61%	23	32,61%	
	C/C	29,70 ± 12,21	0,962	15	14,29%	48	45,71%	
rs2238136	T/T	21,82 ± 11,46		6	50,00%	5	37,50%	0,138
	C/T	27,06 ± 9,85	0,177	17	20,75%	38	47,17%	
	C/C	29,04 ± 10,26	0,046*	14	19,15%	24	34,04%	
rs2296241	G/G	28,85 ± 13,97		6	18,18%	18	54,55%	0,101
	A/A	31,54 ± 8,26	0,577	6	14,29%	6	14,29%	
	G/A	26,62 ± 12,75	0,619	15	25,00%	27	45,00%	
rs2248359	T/T	27,82 ± 11,60		12	43,48%	0	0,00%	0,007*
	C/C	29,24 ± 17,95	0,805	9	18,07%	24	48,19%	
	C/T	29,30 ± 10,96	0,796	6	11,76%	27	52,94%	

Se presentan los valores de n y % para las variables cualitativas, media±SD para las cuantitativas. *significación estadística (p<0.05)

En las Tablas 54 y 55 se muestra el estudio de asociación entre los genotipos estudiados y los parámetros séricos relacionados con el metabolismo fosfocálcico (calcio, fósforo y PTH). Únicamente se han demostrado diferencias significativas en cuanto al nivel de fósforo para rs1540339; la presencia de un alelo C (CC, C/T) sugiere menores niveles de fósforo que el haplotipo TT (5,11 vs 6,75 mg/dl, p-valor 0,036).

Tabla 54. Asociación entre genotipo *FLG* y metabolismo fosfocálcico.

		Calcio (mg/dl)	p	Fósforo (mg/dl)	p	PTH (pg/ml)	p
R501X	C/T	9,57 ±0,47	0,154	4,77 ±0,68	0,520	32,76 ±15,06	0,485
	wt	9,81 ±0,54		5,45 ±3,46		28,94 ±16,55	
2282del4	del	9,67 ±0,40	0,675	4,73 ±1,78	0,729	48,55 ±18,17	0,094
	wt	9,80 ±0,54		5,41 ±3,36		28,94 ±16,25	
R2447X	C>T	9,53 ±0,32	0,395	4,50 ±1,13	0,640	30,15 ±7,85	0,940
	wt	9,80 ±0,54		5,42 ±3,37		29,26 ±16,53	
FLGmut	No	9,82 ±0,55	0,102	5,47 ±3,51	0,461	28,60 ±16,46	0,219
	mut	9,58 ±0,43		4,79 ±0,89		34,56 ±15,53	
HETcom	HetC	9,60 ±0,42	0,606	4,15 ±1,34	0,596	35,70 ±NA	0,696
	wt	9,80 ±0,54		5,41 ±3,35		29,22 ±16,46	

FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen *FLG*, No; ausencia de mutación en *FLG*.
HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, wt; wild type. Se presentan los valores de media±SD.

Tabla 55. Asociación entre polimorfismos *VDR* y *CYP24A1* y metabolismo fosfocálcico.

SNP	Genotipo	Calcio (mg/dl)	p	Fósforo (mg/dl)	p	PTH (pg/ml)	p
rs2239185	G/G	9,79 ±0,59	0,686	5,34 ±1,24	0,685	28,67 ±16,17	0,295
	A/A	9,84 ±0,50		5,01 ±0,65		24,38 ±14,34	
	G/A	9,78 ±0,57		5,97 ±5,10		29,55 ±17,15	
rs1544410	T/T	9,83 ±0,55	0,653	4,98 ±0,84	0,591	29,06 ±16,98	0,816
	C/C	9,89 ±0,55		5,42 ±1,18		28,06 ±15,62	
	C/T	9,71 ±0,54		5,68 ±4,80		27,43 ±16,37	
rs731236	G/G	9,75 ±0,58	0,830	4,89 ±0,86	0,259	27,14 ±16,42	0,963
	G/A	9,78 ±0,55		5,85 ±5,03		26,94 ±14,88	
	A/A	9,84 ±0,56		5,35 ±1,11		29,52 ±17,75	
rs3782905	G/G	9,84 ±0,49	0,372	5,18 ±0,47	0,819	28,57 ±14,76	0,938
	C/G	9,69 ±0,57		4,93 ±0,71		29,03 ±17,86	
	C/C	9,85 ±0,52		5,77 ±4,35		27,33 ±15,20	
rs2239179	C/C	9,90 ±0,50	0,856	5,06 ±0,74	0,310	25,53 ±12,72	0,729
	T/T	9,87 ±0,54		6,11 ±5,19		27,42 ±14,51	
	T/C	9,70 ±0,56		5,09 ±0,72		28,49 ±18,11	
rs1540339	T/T	9,89 ±0,64	0,221	6,75 ±7,12	0,036*	28,30 ±15,29	0,725
	C/C	9,73 ±0,54		5,11 ±0,75		26,86 ±17,90	
	T/C	9,80 ±0,51		5,11 ±0,75		28,92 ±15,17	
rs2239182	C/C	9,86 ±0,45	0,719	5,00 ±0,67	0,152	26,03 ±13,97	0,379
	T/T	9,82 ±0,57		6,10 ±5,51		27,50 ±15,48	
	T/C	9,74 ±0,56		5,11 ±0,82		29,57 ±17,44	
rs2238136	T/T	9,81 ±0,66	0,653	5,79 ±1,74	0,098	28,96 ±15,27	0,985
	C/T	9,90 ±0,55		5,22 ±0,91		29,06 ±14,94	
	C/C	9,73 ±0,53		5,25 ±0,71		24,21 ±13,41	
rs2248359	T/T	9,33 ±0,84	0,223	8,94 ±12,02	0,054	38,05 ±10,43	0,363
	C/C	9,59 ±0,44		4,86 ±0,48		32,42 ±15,21	
	C/T	9,71 ±0,51		5,03 ±0,76		30,71 ±17,67	
rs2296241	G/G	9,72 ±0,48	0,057	5,02 ±0,78	0,183	36,43 ±16,64	0,705
	A/A	9,30 ±0,80		7,82 ±10,17		33,88 ±10,92	
	G/A	9,63 ±0,44		4,78 ±0,66		30,27 ±17,24	

Se presentan los valores de media±SD. *significación estadística (p<0.05)

5.7. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y LÍPIDOS SÉRICOS.

En el siguiente apartado se analiza la asociación entre genotipo y concentraciones de lípidos séricos. Respecto al genotipo *FLG* se observan diferencias significativas en el nivel de triglicéridos séricos ante la presencia/ausencia de mutación 2282del4 (128,67±108,67 mg/dl vs 74,19±41,54 mg/dl respectivamente, p-valor 0,031) (Tabla 56). Si bien, debido al pequeño tamaño muestral que presenta el grupo mutado (n=3), los resultados deben considerarse con cautela. A la vista de estos resultados, no es posible establecer asociación estadística entre genotipo *FLG* y concentración de lípidos séricos.

Sí es posible establecer asociación entre los niveles de lípidos séricos y algunos polimorfismos de los genes analizados (Tabla 57). En concreto, los SNPs rs2239185-AA, rs2239182-CC y rs1540339-CC, todos ellos en el gen *VDR*, se asocian a mayores concentraciones séricas de colesterol total, que sus correspondientes alternativas genotípicas para el modelo seleccionado. El SNP rs2239182-TT se asocia con mayor nivel de colesterol LDL y su polimorfismo TC con menor nivel de colesterol HDL. Ambos SNPs del gen *CYP24A1*, tanto rs2296241-AA como rs2248359-TT se asocian con mayores niveles de colesterol HDL.

Tabla 56. Asociación entre genotipo *FLG* y lípidos séricos.

		COL (mg/dl)	p	LDL-c (mg/dl)	p	HDL-c (mg/dl)	p	TRIG (mg/dl)	p
R501X	C/T	162,42 ±26,49	0,739	100,00 ±29,50	0,870	53,20 ±15,80	0,962	76,75 ±45,11	0,897
	wt	165,13 ±27,22		101,99 ±26,41		53,45 ±11,03		75,06 ±43,51	
2282del4	del	165,67 ±32,72	0,963	95,67 ±37,90	0,680	44,67 ±16,92	0,170	128,67 ±108,67	0,031*
	wt	164,93 ±27,11		102,07 ±26,26		53,66 ±11,01		74,19 ±41,54	
R2447X	C>T	165,33 ±15,53	0,980	109,50 ±10,61	0,684	55,50 ±4,95	0,794	47,67 ±3,06	0,270
	wt	164,93 ±27,29		101,78 ±26,60		53,40 ±11,27		75,69 ±43,72	
FLGmut	No	165,04 ±27,30	0,884	102,03 ±26,33	0,863	53,70 ±10,90	0,372	74,18 ±41,46	0,369
	mut	164,00 ±25,94		100,44 ±28,94		50,22 ±14,63		84,50 ±60,07	
HETcom	HetC	159,00 ±15,56	0,756	102,00 ±NA	0,997	59,00 ±NA	0,619	49,00 ±2,83	0,393
	wt	165,01 ±27,23		101,91 ±26,52		53,39 ±11,22		75,50 ±43,65	

Se evalúa tanto en DA como en controles. FLGmut: mut; presencia de al menos una mutación en el gen *FLG*, No; ausencia de mutación en *FLG*. HETcom: HetC; heterocigoto compuesto, wt; wild type. Se presentan los valores de media±SD.

Tabla 57. Asociación entre genotipo VDR y CYP24A1 y lípidos séricos.

SNP	Gen	Colesterol (mg/dl)	p	LDL (mg/dl)	p	HDL (mg/dl)	p	Triglicéridos (mg/dl)	p
rs731236	G/G	171,22 ±29,50		108,60 ±28,86		52,42 ±12,14		83,22 ±41,04	
	G/A	168,54 ±31,48	0,690	106,74 ±29,41	0,813	52,77 ±12,89	0,914	79,59 ±55,10	0,761
	A/A	162,17 ±25,26	0,176	99,57 ±27,37	0,261	52,54 ±9,73	0,971	74,21 ±50,49	0,449
rs1544410	T/T	170,26 ±24,58		104,50 ±24,24		53,70 ±12,76		79,71 ±40,48	
	C/C	163,48 ±25,51	0,288	100,02 ±27,26	0,540	53,70 ±10,50	0,999	74,52 ±48,66	0,644
	C/T	166,60 ±32,16	0,556	107,30 ±29,96	0,695	51,71 ±11,61	0,501	78,55 ±54,30	0,915
rs2239185	G/G	160,71 ±23,63		98,69 ±22,29		53,75 ±9,55		78,08 ±54,82	
	A/A	176,78 ±33,68	0,036*	112,98 ±33,50	0,062	53,69 ±12,16	0,984	74,44 ±37,65	0,747
	G/A	166,04 ±27,54	0,367	101,06 ±26,51	0,740	51,41 ±12,23	0,430	82,05 ±57,35	0,712
rs2239182	C/C	175,97 ±26,76		113,83 ±28,55		57,68 ±11,79		69,92 ±29,82	
	T/T	156,37 ±26,51	0,009*	98,22 ±25,90	0,024*	52,73 ±12,45	0,083	80,45 ±55,17	0,305
	T/C	166,30 ±28,78	0,087	104,27 ±26,77	0,148	51,63 ±9,59	0,028*	77,18 ±48,93	0,458
rs1540339	T/T	158,26 ±22,55		96,33 ±20,72		52,09 ±13,04		89,63 ±59,93	
	C/C	171,58 ±30,87	0,036*	108,44 ±31,12	0,096	53,12 ±11,77	0,731	73,63 ±46,83	0,156
	T/C	164,70 ±28,06	0,301	103,48 ±27,68	0,327	53,02 ±10,43	0,756	74,66 ±46,86	0,182
rs2239179	C/C	177,07 ±23,27		109,16 ±25,11		57,18 ±15,64		82,67 ±37,52	
	T/T	162,59 ±27,57	0,081	100,68 ±26,66	0,372	51,48 ±11,98	0,143	80,10 ±52,39	0,863
	T/C	168,03 ±30,59	0,273	107,50 ±30,38	0,862	52,63 ±9,67	0,244	76,58 ±52,48	0,678
rs3782905	G/G	168,27 ±23,06		104,48 ±21,22		53,67 ±14,65		75,33 ±32,11	
	C/G	169,19 ±26,91	0,910	104,96 ±22,69	0,957	54,82 ±10,33	0,757	73,74 ±42,84	0,901
	C/C	164,15 ±29,37	0,599	103,07 ±30,00	0,867	52,58 ±11,15	0,758	76,35 ±46,56	0,934
rs2238136	T/T	168,33 ±40,99		109,70 ±46,48		52,00 ±18,19		100,22 ±44,92	
	C/T	165,28 ±26,98	0,780	104,77 ±25,96	0,702	51,74 ±11,82	0,961	76,46 ±55,76	0,217
	C/C	166,97 ±31,15	0,900	104,33 ±30,19	0,678	52,65 ±11,19	0,902	79,71 ±51,44	0,282
rs2296241	G/G	160,08 ±27,36		104,75 ±31,55		48,00 ±11,75		88,50 ±46,87	
	A/A	163,56 ±27,81	0,700	102,58 ±19,48	0,864	61,50 ±8,83	0,048*	88,00 ±49,27	0,982
	G/A	162,31 ±18,36	0,788	95,11 ±12,89	0,461	52,57 ±12,59	0,514	103,96 ±64,99	0,445
rs2248359	T/T	163,82 ±28,39		110,87 ±24,42		70,33 ±6,66		101,45 ±55,99	
	C/C	159,50 ±23,03	0,626	98,12 ±21,07	0,392	52,25 ±9,74	0,016*	82,75 ±46,58	0,380
	C/T	162,06 ±20,49	0,845	94,52 ±19,82	0,311	46,40 ±10,71	0,005*	114,82 ±65,83	0,541

Se evalúa tanto en DA como en controles. Gen., genotipo;

6. DISCUSIÓN

La dermatitis atópica es una enfermedad muy prevalente en la infancia, que presenta una gran heterogeneidad genética puesto que existen numerosos genes predisponentes para el desarrollo de la misma. La presente tesis doctoral permite comprender en profundidad la relación existente entre las mutaciones más prevalentes del entorno mediterráneo en el gen *FLG* y determinados polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1* y el desarrollo de DA.

Los resultados obtenidos indican que la prevalencia global de las mutaciones más frecuentes en el gen *FLG* es del 1,94 % para la población española general, y del 12,61 % para la cohorte de niños españoles afectados de DA. La mutación R501X se identifica como la más prevalente en ambos grupos seguida de R2447X y 2282del4. Respecto a los polimorfismos estudiados en los genes *VDR* y *CYP24A1*, se presentan, por primera vez, datos de prevalencia del genotipo de estos SNPs en una cohorte de niños españoles afectados de DA.

No se ha demostrado asociación entre ninguno de los genotipos analizados y la gravedad de la DA, y únicamente se ha evidenciado relación entre la mutación R501X en el gen *FLG* y asma, pero no así con el resto de genotipos analizados ni otras enfermedades atópicas.

En el estudio de asociación entre genotipo y niveles de vitamina D, se ha demostrado asociación positiva entre los polimorfismos rs2239182 y rs2238136 y negativa para rs2239185-GA y rs2248359-TT.

Por último, se ha demostrado asociación entre algunos polimorfismos y los niveles de lípidos séricos; en este caso, la presencia de rs2239185-AA, rs2239182-CC y rs1540339-CC, se asocian con mayores concentraciones séricas de colesterol total, y los polimorfismos rs2296241-AA y rs2248359-TT con mayores niveles de colesterol HDL.

6.1. PREVALENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN *FLG*.

El estudio que aquí se presenta es el primero que evalúa la frecuencia de las principales mutaciones de pérdida de función del gen *FLG* (R501X, 2282del4 y R2447X) en una cohorte de niños españoles con fenotipo mediterráneo afectados de DA.

La prevalencia global de mutación en *FLG*, definida como la presencia de al menos una de las tres mutaciones estudiadas en el grupo control, es del 1,94 %. Dado el planteamiento y el diseño del estudio en cuanto al reclutado de los controles, ésta cifra podría significar, con una gran aproximación, una estimación de la prevalencia global de las tres mutaciones en la población española, o si no, al menos, en la población aragonesa, lugar donde se obtuvo la muestra. Estos resultados están en concordancia con el único trabajo similar publicado hasta la fecha por Cubero *et al.* (127), en una población de similares características étnicas y región geográfica (ciudad de Zaragoza). El estudio reveló una frecuencia poblacional de mutación en *FLG* del 2 % (Tabla 58). Los resultados para el grupo experimental no pueden ser comparables, puesto que se seleccionaron pacientes afectados de asma en lugar de DA y, además, sólo se analizaron dos de las tres mutaciones: R501X y 2282del4 (Tabla 59).

Nuestros resultados también son concordantes con los obtenidos previamente en otros estudios poblacionales realizados en regiones mediterráneas o sur-europeas. Giardina *et al.* (177) presentan una prevalencia global del 1,2 % en su estudio realizado sobre población italiana, Pipinic *et al.* (123) un 2,6 % en población Croata, y Mlitz *et al.* (100) un 4 % en población francesa. En contraste, los valores obtenidos para población centro y norte-europea son más dispares, variando del 2,8 % obtenido por Debinska *et al.* (178) en su estudio sobre población polaca, al 8.8 % obtenido por Barker *et al.* en población inglesa (179) (Tabla 58).

Cuando se analiza individualmente cada mutación, la frecuencia poblacional estimada para las mutaciones R501X y 2282del4 es del 1 % y para R2447X cercana al 0 %. Estos resultados están en sincronía con los observados en grandes estudios poblacionales, como el de *1000 Genomes Project* que supone la mejor estimación de las prevalencias poblacionales por áreas geográficas. En esta base de datos, la prevalencia individual estimada para población de la península ibérica es de 1,9 % para 2282del4, 0,9 % para R501X, y cercana al 0 % para R2447X (Tabla 58).

Según estos datos R501X y R2447X deberían ser catalogadas como variantes raras y por tanto patogénicas, ya que su frecuencia poblacional es inferior al 1 %. En el caso de 2282del4 podría hablarse de polimorfismo poblacional, no obstante, en toda la bibliografía aparece descrita como mutación patogénica, puesto que es demostrable el efecto de pérdida de funcionalidad que produce esta alteración.

Tabla 58. Frecuencias poblacionales de mutaciones para grupo control en *FLG* en la literatura.

Grupo	n	R501X	2282del4	R2447X	G. Comb.	Población	Autor (año)
Control	1463	5,6%	3,3%		8,8%	Inglesa	Barker (2007)
Control	402	2,5%	3,5%	1,5%	7,5%	Alemana	Greisenegger (2010)
Control	503	2,0%	2,8%	0,6%	5,4%	Europea	1000 Genomes Project
Control	99	3,0%	1,0%	0,0%	4,0%	Fancesa	Mlitz (2011)
Control	100	2,0%	1,0%		3,0%	Española	Cubero (2016)
Control	107	0,9%	1,9%	<0,01%	2,8%	Ibérica	1000 Genomes Project
Control	71	1,4%	1,4%	0,0%	2,8%	Polaca	Debinska (2017)
Control					2,6%	Croata	Pipinic (2015)
Control	2504	0,7%	1,1%	0,2%	1,9%	Mundial	1000 Genomes Project
Control	103	1,0%	1,0%	0,0%	1,9%	Española	González-Tarancón (2019)
Control	420	0,0%	0,5%		1,2%	Italiana	Giardina (2008)

n; tamaño muestral del estudio, G.Comb; genotipo combinado. Adaptado de González-Tarancón et.al. (176). Se presentan los estudios ordenados de mayor a menor % de genotipo combinado.

Al evaluar los resultados en la cohorte DA, la prevalencia global de las mutaciones más frecuentes en *FLG* es del 12,6 %, muy inferior a los resultados publicados en estudios realizados sobre población centro y norte-europea afecta de DA, con cifras que pueden variar del 22,9 % en población alemana (180) al 42,3 % en población Inglesa (179). No obstante, existen otros trabajos realizados en población polaca y alemana con cifras del 10,3 % y 11,0 % respectivamente, más próximos a nuestros resultados y a los de otros grupos poblacionales sur-europeos, con porcentajes del 10,3 % en población francesa (100) y 11,0 % en croatas (123). Estas diferencias pueden explicarse debido a la gran heterogeneidad genética de las poblaciones europeas y a la dificultad de selección de poblaciones “puras” en estudios de tipo poblacional.

Respecto a los porcentajes de cada mutación en la cohorte DA, los resultados son discordantes con otros estudios. En este trabajo R501X se destaca como la mutación más prevalente dentro de los pacientes con DA (9,9 %) seguida de R2447X (2,7 %) y 2282del4 (1,8 %). En cambio, en otros estudios los porcentajes de mutación son muy bajos (<1 %) como en Giardina *et al.* (177), no hay diferencias entre mutaciones (100), o la mutación 2282del4 prevalece sobre R501X (178, 181) (Tabla 59).

Otro aspecto importante que se debe destacar es que en este trabajo, no se han identificado homocigotos recesivos en ninguno de los dos grupos, pero si se han publicado en estudios previos, con frecuencias que pueden llegar incluso al 11,6 % para la mutación 2282del4 (181).

Tabla 59. Frecuencias poblacionales de mutaciones en FLG para grupo DA en la literatura.

Grupo	n	R501X	2282del4	R2447X	G. Comb.	Población	Autor (año)
DA	163	25.80%	20.85%		42.30%	Inglesa	Barker (2007)
DA	462	6.50%	14.70%	3.00%	22.9%	Alemana	Greisenegger (2010)
DA					22.8%	Alemana	Weidinger (2006)
DA	857	8.30%	6.80%		16.2%	EEUU	Margolis (2013)
DA	111	9.9%	1.8%	2.7%	12.6%	Española	González-Tarancón (2019)
DA					11.0%	Alemana	Marenholz (2006)
DA	87	1.2%	8.0%	1.2%	10.3%	Polaca	Debinska (2017)
DA	97	5.2%	5.2%	2.1%	10.3%	Francesa	Mlitz (2011)
DA	354	0.6%	0.9%		0.6%	Italiana	Giardina (2008)
Asma*	300	1%	0%		1%	Española	Cubero (2016)

n; tamaño muestral del estudio, G.Comb; genotipo combinado. Adaptado de González-Tarancón et.al. (176). Se presentan los estudios ordenados de mayor a menor % de genotipo combinado. *Grupo experimental: asmáticos.

Como era de esperar, las frecuencias poblacionales estimadas para la población española en los dos grupos de estudio están en sincronía con las de las poblaciones sur-europeas (o mediterráneas) con las que está evolutivamente más emparentada, e inferior a las cifras de poblaciones centro y norte-europeas. No obstante, a la vista de todos estos resultados, no es tan sencillo establecer un gradiente poblacional como previamente habían postulado otros autores (85). En concreto, la frecuencia de las mutaciones más prevalentes en *FLG* en población española afecta de DA parece ser superior a la de población francesa e italiana, e incluso, superior a la de países centro europeos.

Una vez más, podemos justificar estas diferencias por la dificultad de selección de poblaciones puras en estudios poblacionales. A esta limitación tenemos que sumar el problema del tamaño muestral, ya que, para estimar prevalencias poblacionales, han de emplearse tamaños muestrales significativos. No obstante, en la base de datos *1000 Genomes Project*, en lo referente a la población ibérica, el tamaño muestral empleado es de 107 individuos, y en nuestra cohorte es de 103 para los controles y 111 para el grupo DA, por lo que podemos garantizar que nuestros resultados gozan de validez y pueden suponer, con una gran aproximación, una estimación de la prevalencia global de las tres mutaciones en la población española.

Por otro lado, la selección de pacientes en una enfermedad tan prevalente como la DA, la atopia y las alergias en general, es muy complicada, y se basa en criterios clínicos, por lo que se asume que algún paciente que haya sido clasificado como control sano, a lo largo de los años evolucione a paciente atópico. Esto se demuestra en los datos obtenidos en el estudio en cuanto al porcentaje de controles con valor de IgE patológico, que podrían indicar que ese grupo de pacientes tuviese o pudiese tener algún tipo de proceso alérgico.

Así mismo, en relación con esta línea de discusión, debe recordarse que la DA es una enfermedad muy heterogénea, en la que intervienen tanto factores genéticos inherentes al individuo como la exposición a factores ambientales; por tanto, podría ocurrir que no en todos los casos, ante la misma mutación, se desarrolle el mismo fenotipo, es decir, dependiendo del individuo, de su entorno, y del resto de factores predisponentes se desarrolle diferente expresividad.

En conclusión, éste estudio se ha realizado en una cohorte amplia de pacientes, lo que permite realizar una buena estimación de la prevalencia poblacional, como demuestra la concordancia de los resultados con las poblaciones de *1000 Genomes Project* y con la bibliografía previa. De los resultados del estudio se deduce que la frecuencia de las principales mutaciones de pérdida de función del gen *FLG* en población española afecta de DA es del 12,6%, siendo la mutación R501X la más importante (9,9%). Estos resultados son ligeramente superiores a los de otros estudios previos realizados en población mediterránea y centro europea, por lo que no es tan sencillo establecer un gradiente poblacional como previamente se había postulado.

Este estudio permite ampliar el conocimiento sobre el ambiente genético tan complejo que rodea a las enfermedades alérgicas en general y a la DA en particular, y supone una primera aproximación, en este sentido, en la población española. Por otro lado, el diseño experimental y resultados que aquí se muestran, van a servir de base para estudios de similares características que puedan realizarse sobre diferentes grupos étnicos, y que permitan abordar, con mayor profundidad, el ambiente genético de la DA en Europa en general, y en España en particular.

6.2. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO *FLG*, DA Y ATOPIA.

Se conoce desde hace tiempo que las mutaciones de pérdida de función en el gen *FLG* suponen el principal factor de riesgo genético para el desarrollo de DA, y como tal, así lo demuestran los grandes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) publicados recientemente (29, 182). Así mismo, las mutaciones de pérdida de función en el gen *FLG* analizadas en este trabajo, quedan perfectamente descritas como mutaciones patogénicas, con elevado grado de evidencia, en todas las bases de datos consultadas (*OMIM, ClinVAR, Ensembl...* etc).

Los resultados del estudio de asociación entre genotipo *FLG* y enfermedad que se derivan de este trabajo, coinciden en esta misma línea, ya que se demuestra esta asociación. La presencia de alguna de las tres mutaciones de pérdida de función analizadas en el gen *FLG* supone un factor de riesgo de DA, puesto que aumenta la probabilidad de padecerla en 6,81 veces. Estos resultados son muy superiores (casi el doble) a los obtenidos previamente por Rodríguez *et al.* (111) y Van den Oord *et al.* (112) que presentan valores de OR de 3,12 y 4,78 respectivamente. Estos trabajos son los dos únicos metaanálisis publicados hasta la fecha en relación con el estudio de asociación entre genotipo *FLG* y DA. Una posible razón que explique las diferencias observadas aquí, en comparación con la bibliografía previa, se debe a que en los metaanálisis indicados se tuvieron en cuenta grupos poblacionales muy diversos, incluso de fuera del continente europeo. Como se ha visto en el apartado anterior, las frecuencias poblacionales referentes al gen *FLG* son muy dispares, por tanto, no sería del todo correcto utilizar cálculos de OR a nivel general, sino que deberían establecerse por áreas geográficas, tal como se ha realizado en este trabajo. Por otro lado, ha de tenerse en cuenta, que las mutaciones más prevalentes en el gen *FLG* relacionadas con la DA en el continente europeo, difieren de las mayoritarias en otros continentes, y por ello, la comparación de riesgos de las mutaciones R501X y 2282del4 no tendría sentido en otras poblaciones no europeas.

Si se tiene en cuenta todo lo expuesto anteriormente en relación al cálculo de asociación entre genotipo *FLG* y DA, los resultados que aquí se obtienen se deberían comparar únicamente con estudios europeos. En este sentido, como ya se ha visto en el apartado 6.1 referente a la prevalencia de mutaciones en *FLG*, las cifras de OR son igualmente muy variantes, desde un OR de 1,69 obtenido por Rice *et al.* (183) al 11,56 de Palmer *et al.* (26) (Tabla 60).

Tabla 60. Estudios de asociación entre FLG y DA en la literatura.

Autor (año)	Población	R501X (OR)	2282del4 (OR)	G. Comb (OR)
Palmer et al., (2006)	Irlandesa/Escocesa	9,22	15,77	11,56
Sandilands et al., (2007)	Irlandesa	14,05	8,78	8,18
González-Tarancón et al. (2019)	Española	9,88	1,87	6,81
Novak et al., (2008)	Alemana	6,25	4,86	6,78
Barker et al., (2007)	Inglesa	5,09	7,27	6,29
Brown et al., (2008)	Inglesa	5,55	2,02	5,61
Hubiche et al., (2007)	Francesa	3,35	9,14	5,59
Weidinger et al., (2007)	Alemana	3,59	5,07	4,33
Stemmler et al., (2007)	Alemana	1,23	1,93	3,82
Marenholz et al., (2006)	Alemana	6,42	2,44	3,62
Weidinger et al., (2006)	Alemana	4,10	2,80	3,60
Total Estimado		3,54	2,97	3,39
Weidinger et al., (2008)	Inglesa	3,66	2,78	3,05
Lerbaek et al., (2007)	Danesa	3,39	2,61	2,84
Henderson et al., (2008)	Inglesa	2,50	2,43	2,48
Rogers et al., (2007)	EEUU	3,09	2,02	2,38
Lerbaek et al., (2007)	Danesa	2,14	2,14	2,32
Palmer et al., (2006)	Escocesa	nd	nd	2,27
Betz et al., (2007)	CentroEuropea	nd	nd	2,14
Morar et al., (2007)	Asiática	2,55	1,93	2,03
Rice et al., (2008)	Inglesa	2,08	1,30	1,69
Giardina et al., (2008)	Italiana	5,96	1,78	nd

G.Comb; genotipo combinado. Adaptado de Rodríguez *et al.* (184). Se presentan los estudios ordenados de mayor a menor OR obtenido para genotipo combinado.

La mutación R501X es la única, entre las analizadas, que predispone al desarrollo de DA en población española, con un OR muy superior al resto de autores (OR 9,88), mientras que para la mutación 2282del4, la OR obtenida, a pesar de no ser un resultado estadísticamente significativo, es muy inferior al que se indica en la bibliografía (Tabla 60). Estos resultados, demuestran una vez más, que R501X es la mutación más prevalente en la población española afecta de DA y el principal factor genético predisponente para su desarrollo, y deja a las mutaciones R2447X y 2282del4 como variantes poco frecuentes en nuestra población, con una prevalencia entre la población afecta similar a la poblacional y con escaso protagonismo como factores predisponentes para el desarrollo de DA.

Pero las mutaciones en *FLG* no sólo suponen un factor de riesgo para el desarrollo de DA, sino que también se ha demostrado ampliamente que la presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen *FLG*, constituyen un factor pronóstico, puesto que los pacientes con DA y presencia de mutaciones en *FLG* (DA_{FLG}) presentan un inicio más temprano (113), mayor gravedad clínica (114) y mayor sensibilización alérgica y desarrollo de asma, en comparación con los pacientes no mutados (DA_{no-FLG}) (85). Según algunos estudios publicados, aproximadamente el 50% de las formas graves de la

enfermedad se deben, al menos en parte, a mutaciones de pérdida de función en *FLG*, mientras que en las formas más leves-moderadas sólo se presenta mutación en un 4-15% de los pacientes (114). Un estudio muy reciente, similar a éste, demuestra que existe correlación entre el genotipo y gravedad de la DA debido a que las mutaciones en *FLG* son más frecuentes en pacientes con enfermedad grave (60,0%) respecto a las formas moderadas y leves (30,2 y 16,7 % respectivamente) (185).

En este sentido, se han intentado confirmar estas hipótesis, pero no se ha podido establecer una asociación clara entre genotipo *FLG* y gravedad de la DA, medida a través de la escala SCORAD, como era esperable en base al planteamiento inicial. Nuestros datos si son coincidentes con estudios previos para las formas de DA leve (16%) pero no son coincidentes con las formas moderadas (11,1%) y graves (0%) (Tabla 32). El hecho de que no se haya identificado ninguna mutación en pacientes con enfermedad grave se debe a que la distribución de los grupos no es homogénea, y por tanto estos resultados que se obtienen aquí no son concluyentes. Un aumento del tamaño muestral y una homogeneización de los grupos permitirá alcanzar conclusiones con mayor potencia estadística y, por lo tanto, con mayor validez.

Por otro lado, se ha postulado que la gravedad de la enfermedad pudiese estar condicionada por la presencia de mutaciones bialélicas en el gen *FLG* (o lo que es lo mismo, heterocigotos compuestos). Sin embargo, esta hipótesis ha generado controversia y no ha sido confirmada por todos los autores. Los resultados que se presentan confirmarían que la presencia de mutaciones bialélicas en el gen *FLG* no condicionan un curso clínico de la enfermedad más grave, puesto que los dos sujetos con mutación bialélica identificada, fueron catalogados, en ambos casos, como pacientes con enfermedad leve (SCORAD <25, Tabla 29). Este resultado confirmaría los estudios previos que defienden que no todos los individuos con mutaciones bialélicas en *FLG* tienen mayor gravedad de la enfermedad, e incluso, no llegan a desarrollarla (186), demostrándose una vez más el carácter poligénico y multifactorial de la DA.

Finalmente, dado que también es conocida la fuerte asociación que existe entre DA y desarrollo de otras enfermedades atópicas como asma y rinitis alérgica, se ha planteado su evaluación en este trabajo. Los estudios poblacionales consultados han demostrado que los portadores de mutaciones en *FLG* tienen un riesgo mayor de desarrollar asma (OR de 1,8) que se incrementa notablemente en aquellos pacientes con DA en los que la OR se eleva a 3,3 (85, 108, 187, 188).

En nuestro estudio, además de la asociación ya demostrada entre mutaciones en *FLG* y DA, también se ha podido establecer asociación entre el genotipo *FLG* y asma, puesto que el riesgo de desarrollo de asma en sujetos portadores de mutación identificada en el gen *FLG* ha sido de 5,71 veces (OR 5,71; 95%IC, 1,92-17,0; p-valor 0,002) respecto a los sujetos no portadores, muy superior a las cifras obtenidas en los estudios previos. En concreto, R501X se presenta como la única mutación en *FLG*, de entre las analizadas, que se establece como factor de riesgo para el desarrollo de asma (OR 7,78) ya que tanto 2282del4 como R2447X no presentan esta asociación, indicando una vez más el carácter protagonista de la mutación R501X en población atópica española.

En el caso de la rinitis alérgica, los portadores de mutación tienen también un riesgo incrementado (OR de 2,64) (108), aunque en nuestro estudio no se ha podido demostrar esta asociación, ni de manera aislada ni en combinación con el asma (asma+rinitis). En lo referente a otras enfermedades alérgicas, como el desarrollo de alergias alimentarias, no se ha tenido en cuenta en este trabajo, por lo que podría plantearse como una interesante línea para la continuación de esta investigación en estudios futuros.

En conclusión, los resultados que se presentan en este trabajo confirman la asociación, previamente demostrada, entre mutaciones de pérdida de función en *FLG* y desarrollo de enfermedades atópicas como la DA y asma. Esta asociación ha resultado ser muy superior a la que previamente se había planteado, y a falta de nuevos estudios que confirmen o desmientan lo aquí expuesto, la presencia de R501X en población española, supone el principal factor de riesgo genético para el desarrollo de DA, dejando a las mutaciones R2447X y 2282del4 con escaso o nulo protagonismo como factores genéticos predisponentes de DA.

A pesar de que no se ha podido demostrar la relación entre genotipo *FLG* y gravedad de la DA, este estudio establece el inicio de una nueva línea de investigación que evaluará la relación entre el genotipo molecular del gen *FLG* y la respuesta al tratamiento con metrotexato, azatriopina, ciclosporina o dupilumab en las formas más graves de la enfermedad. El conocimiento del estatus genético del individuo va a permitir clasificar a los pacientes y con ello mejorar e individualizar los tratamientos disponibles en cada momento, como ya se está reflejando en algunos trabajos científicos recientes (189).

Finalmente, dado que sólo se han publicado dos metaanálisis que estudien la asociación entre el genotipo *FLG* y DA, y éstos se publicaron en 2009 y 2012, se abre una importante vía de estudio futuro, en la que se intentará realizar nuevos metaanálisis con datos más recientes a los publicados, y en la que, además, se tengan en cuenta éstas conclusiones, realizando una mejor estimación del riesgo de DA y otras enfermedades atópicas por grupos poblacionales.

6.3. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO *VDR-CYP24A1*, DA Y ATOPIA.

La presencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en genes implicados en el metabolismo de la vitamina D, como *VDR* y *CYP24A1*, pueden tener un papel importante como factores de riesgo genético para el desarrollo de DA, debido a la importancia que tiene la vitamina D en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos en el estrato epidérmico.

Algunos SNPs como *FokI* (rs2228570), *BsmI* (rs1544410), *Apal* (rs7975232) y *TaqI* (rs731236), se han asociado previamente con el desarrollo de enfermedades inflamatorias caracterizadas por una hiperactividad del sistema inmune como DA o asma (157-160, 190). Aunque estos resultados podrían ser contradictorios en base a un reciente metaanálisis, que demuestra que sólo los polimorfismos rs1544410 y rs731236 se asocian con el desarrollo de DA y asma (191).

Se ha analizado la asociación entre DA y un total de 12 SNPs seleccionados (10 del gen *VDR* y 2 del gen *CYP24A1*), lo que supone uno de los trabajos más extensos en cuanto al número de SNPs analizados en estos dos genes en relación con la DA. Los estudios existentes en la literatura que investigan esta asociación, únicamente analizan 3-4 SNPs por estudio, mayoritariamente, los polimorfismos clásicos (*Apal*, *TaqI*, *BsmI* y *FokI*). Sólo se ha encontrado un artículo publicado similar a este, que analiza 13 SNPs, pero en éste caso en relación con asma, no con DA (192). Por esta razón se quiere destacar la complejidad del estudio que se presenta.

A pesar de que no se ha podido demostrar la asociación entre la DA y los SNPs clásicos descritos en la bibliografía (rs1544410 y rs731236), sí se ha encontrado asociación significativa entre DA y los polimorfismos rs2238136 y rs2239182, ambos correspondientes a regiones intrónicas del gen *VDR*, y ninguno de ellos descrito previamente en la literatura científica como factor asociado al desarrollo de DA ni otras enfermedades atópicas.

Los resultados indican que los pacientes con genotipo rs2238136-CT tienen 3 veces más riesgo de desarrollar DA que los sujetos con genotipo rs2238136-CC. En el caso de rs2239182, se observa un efecto protector, concluyendo que la presencia del alelo C aislado (rs2239182-CT) o el genotipo rs2239182-CC, reducen el riesgo de DA entre un 58 % y un 66 % respectivamente.

El polimorfismo rs2238136 se localiza en una región intrónica, entre los exones 1 y 2 del gen *VDR*. Aunque en las bases de datos consultadas no se ha reportado ninguna información clínica referente a la funcionalidad de la proteína, podría ser importante su funcionalidad ya que se localiza en una región de unión a factores de transcripción (*GATA1*) y por tanto, podría regular la expresión génica. Los trabajos publicados en referencia a este SNP (17 en *ClinVar*, 22 en *Ensembl*) no han evaluado en ningún caso esta asociación, y únicamente, hacen referencia a su asociación con algunos tipos de cáncer, especialmente melanoma, parkinson, diabetes y otras enfermedades relacionadas con el metabolismo. Por tanto, éste es el primer trabajo que evalúa y establece la asociación entre rs2238136 y la DA.

El polimorfismo rs2239182 se localiza igualmente en una región intrónica, en este caso entre los exones 5 y 6 del gen *VDR*, por lo que es poco probable que origine pérdida o ganancia de funcionalidad de la proteína. Se han encontrado 18 trabajos científicos en *ClinVar* y 22 en *Ensembl* que mencionan o contienen el SNP, pero que en ningún caso se identifica asociación con la DA. Por tanto, al igual que lo expuesto anteriormente, no es posible discutir y comparar los resultados obtenidos con la bibliografía previa, puesto que éste trabajo parece ser el primero que analiza la asociación entre rs2238136 y DA.

El resto de SNP analizados, y para los que no se ha obtenido significación estadística, se localizan en distintas regiones intrónicas del gen *VDR*: rs1544410 y rs7975232 entre los exones 9 y 10; y los SNPs rs2107301, rs1540339 y 2239179 entre los exones 4 y 5. Otros polimorfismos, al igual que rs2238136, pueden ser lugar de unión de factores de transcripción (rs2239185, rs1540339) o estar presentes en regiones de regulación de la expresión génica (rs3782905 y rs1540339). Sólo se ha analizado un SNP localizado en una región codificante, exón 10, rs731236 (*TaqI*), que se ha descrito como una variante sinónima que no implica cambio en el aminoácido isoleucina.

Además del análisis de los polimorfismos individualmente, teniendo en cuenta la localización génica de cada SNPs, se ha realizado un estudio de haplotipos para evaluar la posible asociación de varios SNPs en conjunto. El haplotipo GCC (rs2239185-G, rs1540339-C, rs2238136-C) parece ser un haplotipo protector frente al desarrollo de DA, puesto que reduce el riesgo de DA en un 49%. Este resultado confirma que la presencia del alelo T en rs2238136 es un importante factor de riesgo para el desarrollo de DA, en cambio el alelo C, en el conjunto del haplotipo GCC supone un factor protector. Los polimorfismos del gen *CYP2A1* analizados se localizan en el caso de rs2296241 en el exón 4 del gen, y se corresponde con una variante sinónima (sin cambio de sentido). En el caso de rs2248359 se

localiza en la región promotora y se considera como una variante asociada a región reguladora, ya que está en posición 5'UTR. En cualquiera de los dos casos, no se ha encontrado en la bibliografía ninguna asociación con la DA de forma individual, pero si con los haplotipos TA (rs2248359-T, rs2296241-A) y CA (rs2248359-C, rs2296241-A)(163). En nuestro estudio, ninguna combinación de haplotipos confirma estos resultados previos.

Al evaluar la asociación entre polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1* y la gravedad de la DA medida a través de la escala SCORAD, tampoco se evidencia ningún tipo de asociación, a pesar de que algunos estudios previos publicados si establecen esta asociación, aunque sólo en referencia a *BsmI* (rs1544410) y *TaqI* (rs731236) (159). En los resultados que aquí estamos evaluando, se debe tener en cuenta que la distribución de los grupos no es homogénea y que la división de la población DA en subgrupos origina *clusters* pequeños cuyos resultados deberían interpretarse con cautela en éste y en el resto de estudios.

Éste mismo razonamiento se puede aplicar a los resultados obtenidos en el estudio de asociación con otras enfermedades atópicas. No se ha podido establecer asociación entre asma y rinitis con ninguno de los SNPs analizados como previamente se había descrito en otros estudios para los polimorfismos rs7975232, rs731236 y rs3782905 (193).

Respecto al análisis descriptivo realizado en este trabajo, es posible establecer las frecuencias poblacionales de estos polimorfismos en la población pediátrica seleccionada (española), puesto que el total de datos recogidos, es para todos los SNPs, superior al número de datos empleado por la población de referencia para la población ibérica (n=107). Al comparar los resultados de frecuencias poblacionales en los grupos de estudio y la población de referencia (*1000 Genomes Project*), se obtiene un equilibrio para prácticamente todos los polimorfismos analizados. Se destaca que para rs2238136 las frecuencias genotípicas observadas difieren de la población de referencia (0.676, 0.243 y 0.081 para CC, CT, TT vs 0.505, 0.449 y 0.047). Estas diferencias podrían deberse al tamaño muestral de las poblaciones seleccionadas.

Por tanto, en base a la evidencia científica actual, y a la espera de nuevos resultados que confirmen o desmientan lo aquí expuesto, se considera que el polimorfismo rs2238136 constituye un factor de riesgo para el desarrollo de DA y, además, el polimorfismo rs2239182 junto con el haplotipo GCC

(rs2239185-G, rs1540339-C, rs2238136-C) constituyen factores protectores frente al desarrollo de la enfermedad.

Además, no se ha podido establecer ningún tipo de asociación entre los polimorfismos de los genes *VDR* y *CYP24A1* y la gravedad de la enfermedad, ni tampoco con otras enfermedades atópicas. Dado que tampoco existen estudios similares al aquí realizado en la literatura previa, estos resultados supondrían una primera aproximación y serán necesarios nuevos estudios que continúen esta línea de investigación.

6.4. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D.

Numerosos trabajos científicos han demostrado que la deficiencia de vitamina D está asociada con diferentes enfermedades dermatológicas como la DA, la psoriasis, el vitíligo, la micosis fungoide, el LES o la alopecia areata entre otras (102). En el caso de la DA, la vitamina D juega un papel esencial en el desarrollo y gravedad de la enfermedad.

Los resultados que se obtienen en este trabajo confirman los estudios previos puesto que se demuestra que los pacientes con DA tienen niveles de vitamina D inferiores a los de los controles sanos.

Teniendo en cuenta las recomendaciones de la *Endocrine Society* (133) el grupo DA se clasifica como población insuficiente en vitamina D. Estos resultados podrían apoyar la suplementación con vitamina D como parte del tratamiento coadyuvante en la DA, tal como se propone en un metaanálisis recientemente publicado (194). No obstante, para otros autores, este beneficio no está del todo demostrado y faltan evidencias que sugieran que la suplementación con vitamina D genere un beneficio a los pacientes afectados de DA (149, 150).

El grupo control presentaría niveles óptimos (o suficientes) de esta hormona, y aunque no es uno de los objetivos de este trabajo, merece la pena discutir un poco a cerca de estos resultados. El estudio de los niveles de vitamina D en sangre como parte de la práctica clínica habitual está cada vez más extendido, no obstante, los valores de referencia que se emplean deberían revisarse. En este estudio la población control-sana, presenta unos niveles de vitamina D, que, aun siendo óptimos, son muy bajos en relación al tipo de población de estudio (niños de procedencia mediterránea-española). Además, el porcentaje de población no suficiente para esta hormona es superior al 30%. Todo ello sugiere, que los intervalos de normalidad establecidos están sobreestimados, y que en base a la población actual el intervalo de normalidad debería ser inferior. En el último consenso internacional sobre vitamina D (195), se han propuesto como niveles óptimos valores de entre 20-50 ng/ml (50-150 nmol/L), que según lo aquí expuesto parece ser un intervalo mucho más razonable. Por ello, estos datos ayudan a reforzar la idea de modificar los valores de referencia clásicos para interpretar los niveles séricos de vitamina D.

Cuando se revisa la bibliografía que estudia la asociación entre vitamina D y mutaciones de pérdida de función en el gen *FLG*, los resultados son contrarios a los expuestos anteriormente, ya que parece ser que los individuos portadores de mutaciones en el gen *FLG* tienen niveles séricos de vitamina D un 10% superiores a los controles (196), aunque todavía se desconocen los mecanismos que generan esto (124). Los resultados obtenidos en este trabajo no han permitido establecer una asociación entre niveles de vitamina D y la presencia de mutaciones en el gen *FLG*, por lo que no se puede replicar los resultados obtenidos en estudios anteriores a este.

Como era de esperar, se observa mayor asociación con algunos polimorfismos del gen *VDR* y *CYP24A1*. En concreto la presencia de un alelo C en los SNPs rs2239182 y rs2238136, se asocian con niveles de vitamina D más elevados y los SNPs rs2239185-GA y rs2248359-TT se asocian con niveles más bajos de vitamina D, ya que, en proporción, los portadores de estas variantes son mayoritariamente poblaciones deficientes en vitamina D.

No se ha podido establecer ninguna asociación en el estudio de los SNPs del gen *CYP24A1* ni con el resto de parámetros séricos relacionados con el metabolismo fosfocálcico (calcio, fósforo y PTH).

Este estudio pone de manifiesto, una vez más, la asociación entre la hipovitaminosis D y la DA, ya que se ha podido demostrar que existe una relación inversa entre las concentraciones de vitamina D séricas y la gravedad de la DA, aunque sólo ha podido establecerse esta asociación en niños con fototipos claros. Estos hallazgos han sido recientemente publicados por nuestro grupo de investigación en *Pediatric Dermatology* (197) Aunque no se ha podido demostrar ninguna asociación entre niveles de vitamina D y genotipo *FLG*, si se ha demostrado asociación con algunos polimorfismos del gen *VDR* y *CYP24A1*, siendo rs2239182 y rs2238136 factores protectores frente al desarrollo de DA (al tener niveles de vitamina D más elevados), y rs2239185 y rs2248359 factores favorecedores de la enfermedad al reducir las concentraciones de vitamina D.

6.5. ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS Y PERFIL LIPÍDICO

En los últimos años, se ha producido un incremento significativo de las enfermedades atópicas (DA, asma, rinitis y/o alergias alimentarias). Al mismo tiempo ha ido aumentando la prevalencia de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico: obesidad, dislipemia, HTA y diabetes; lo que sugiere que ambas entidades, atopia y enfermedades metabólicas, podrían estar relacionadas.

Se ha planteado que en los pacientes con DA, la deficiencia de vitamina D, ya sea por la carencia en sus concentraciones séricas, por la hipofuncionalidad de su receptor (*VDR*), o por la alteración de enzimas implicadas en su metabolismo (*CYP24A1*), pudiese ser responsable de la alteración del perfil lipídico con la consiguiente aparición del síndrome metabólico, especialmente en la infancia (163).

En estudios previos se ha demostrado que los polimorfismos clásicos del gen *VDR* (*FokI*, *Apal* y *TaqI*) se asocian con el desarrollo de obesidad (175) pero en la mayoría de estos estudios, no se evalúa la posible asociación entre polimorfismos y el perfil de lípidos séricos, o si se realiza, no se presentan resultados significativamente relevantes por lo que no se comentan.

Por todo ello, en este trabajo, se quiere dar valor al trabajo experimental realizado, con un significativo número de pacientes analizados, con la intención de mostrar y comentar los resultados obtenidos y que pueden ser de interés para la comunidad científica en estudios posteriores.

No se ha podido comprobar la asociación descrita por otros autores entre los polimorfismos clásicos de *VDR* y el perfil lipídico en la población seleccionada. En cambio, se ha podido establecer asociación entre los niveles de lípidos séricos y otros polimorfismos, no clásicos, del gen *VDR* (Tabla 57). En concreto, rs2239185-AA, rs2239182-CC y rs1540339-CC se asocian a mayores concentraciones séricas de colesterol total que sus correspondientes alternativas genotípicas para el modelo seleccionado, y rs2239182-TT con mayor nivel de colesterol LDL y su polimorfismo TC con menor nivel de colesterol HDL. En todos los casos, el nivel de colesterol obtenido se corresponde con un valor óptimo, por tanto, las diferencias son únicamente cuantitativas, y no tendrían influencia sobre el estado de salud del individuo. Estos resultados no se han descrito previamente por ningún autor.

En el caso de la relación entre mutaciones en *FLG* y perfil lipídico, no se encuentra ningún estudio previo en las bases de datos consultadas que analicen esta asociación con el que se puedan comparar

los resultados que se presentan aquí. Ocurre lo mismo cuando se analiza esta asociación con los polimorfismos citados en el gen *CYP24A1*.

En el estudio de asociación entre genotipo *FLG* y concentraciones de lípidos séricos únicamente se han encontrado diferencias significativas en el nivel de triglicéridos séricos ante la presencia/ausencia de mutación 2282del4 (128,67 vs 74,19 mg/dl respectivamente). Si bien, debido al pequeño tamaño muestral que presenta el grupo mutado, los resultados deben considerarse con cautela. A la vista de estos resultados, no es posible establecer asociación estadística entre genotipo *FLG* y concentración de lípidos séricos.

Por otro lado, ambos SNPs del gen *CYP24A1*, rs2296241-AA y rs2248359-TT se asocian con mayores niveles de colesterol HDL, y al igual que ocurría en la discusión de los resultados anteriores, en ningún caso estas diferencias serían indicativas de patología.

Una fortaleza del estudio es que este es el primer trabajo que evalúa la relación entre las principales mutaciones en *FLG* y parámetros relacionados con el metabolismo fosfocálcico y de la vitamina D, y los relacionados con el perfil lipídico, aunque no es posible obtener conclusiones destacadas y por tanto serán necesarios nuevos estudios, con mayor tamaño muestral y mejor selección de los grupos, que permitan analizar esta asociación.

Igualmente, en este trabajo se analiza por primera vez la relación entre numerosos SNPs del gen *VDR* y *CYP24A1* con el perfil lipídico en una población infantil. A pesar de que los resultados no permiten establecer conclusiones importantes, si aportan conocimiento a la comunidad científica que va a permitir profundizar en el conocimiento y la relación existente entre vitamina D, metabolismo lipídico y DA, que deberá ser corroborada en estudios futuros.

Por último, cabe destacar que, si tuviésemos en cuenta únicamente los resultados del grupo control, por el diseño del estudio que hemos planteado de población infantil sana/no atópica, estos resultados podrían emplearse para calcular valores de referencia de los parámetros evaluados en la población pediátrica, con aplicación en la práctica clínica diaria.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En primer lugar, se destaca que debido a que se tuvo cierta flexibilidad a la hora de seleccionar los controles, las cohortes no son exactamente comparables en edad, y por consiguiente peso y talla. Esto pudiera tener influencia sobre parámetros bioquímicos, no así en los genéticos. Por otro lado, debido a que la selección de pacientes en una enfermedad tan prevalente como la DA es complicada, se asume que algún paciente que haya sido clasificado como control sano, a lo largo de los años evolucione a paciente atópico. Así mismo, la DA es una enfermedad muy heterogénea, en la que intervienen tanto factores genéticos inherentes al individuo como la exposición a factores ambientales, por lo que, podría ocurrir, que algunas conclusiones asociadas al genotipo se deban al ambiente, o a la interacción de ambos efectos.

Otra limitación del estudio se deriva de la dificultad de selección de poblaciones “puras” que permitan obtener conclusiones robustas en la estimación de prevalencias poblacionales. Por otro lado, no se ha realizado un cálculo del tamaño muestral mínimo necesario, por lo que un aumento del tamaño muestral permitirá alcanzar conclusiones con mayor potencia estadística y validez.

Respecto a la estratificación de la DA, se debe destacar que se ha utilizado una estratificación en base a la escala SCORAD que ha permitido obtener grupos lo más homogéneos posibles, y por tanto los resultados que aquí se presentan sólo hacen referencia a esta estratificación. Al usar otros puntos de corte alternativos en la escala SCORAD, como en el ejemplo de la vitamina D (Tabla 26), se podrían obtener otros resultados, que aquí no se han valorado.

Otra limitación deriva del estudio estadístico de los SNPs, ya que sólo se ha tenido en cuenta el modelo codominante, a fin de simplificar las tablas y la evaluación de los resultados. En caso de analizar todas las posibles combinaciones de resultados en base a todos los modelos genéticos existentes, podríamos encontrar resultados que no hemos podido evidenciar.

Para terminar, en el estudio de vitamina D, no se han tenido en cuenta factores modificadores de la misma como la estación del año, la latitud, el número de horas de exposición solar semanal, o la alimentación.

8. FORTALEZAS Y FUTUROS ESTUDIOS

En este estudio se evalúa por primera vez la frecuencia de las principales mutaciones de pérdida de función del gen *FLG* (R501X, 2282del4 y R2447X) en una cohorte de niños españoles con fenotipo mediterráneo afectados de DA. Además, el hecho de que se haya realizado sobre una cohorte de pacientes amplia, permite realizar una buena estimación de la prevalencia poblacional, como demuestra la concordancia de los resultados con las poblaciones de *1000 Genomes Project* y con la bibliografía previa.

Metodológicamente la discusión de los resultados presentados se acerca más a la realidad en algunos aspectos que las realizadas en trabajos publicados previos, puesto que la comparación entre poblaciones se debe realizar entre aquellas que están evolutivamente más emparentadas, por áreas geográficas, sin tener en cuenta grupos poblacionales muy diversos, incluso de fuera del continente europeo.

Este estudio permite ampliar el conocimiento sobre el ambiente genético tan complejo que rodea a las enfermedades alérgicas en general y a la DA en particular, y supone una primera aproximación, en este sentido, en la población española. Por otro lado, el diseño experimental y resultados que aquí se muestran, van a servir de base para estudios de similares características que puedan realizarse sobre diferentes grupos étnicos, y que permitan abordar, con mayor profundidad, el ambiente genético de la DA en Europa en general, y en España en particular.

Podría ser interesante ampliar esta línea de investigación a otras enfermedades alérgicas, como alergias alimentarias (que no se ha tenido en cuenta en este trabajo). También sería muy interesante reevaluar a los pacientes a lo largo del tiempo, reclasificar en función de la gravedad y evaluar la relación entre el genotipo molecular del gen *FLG* y la respuesta a diferentes tratamientos.

Finalmente, sería interesante realizar un nuevo metaanálisis que establezca la asociación entre el genotipo *FLG* y DA, con nuevos datos más recientes a los publicados, para realizar una mejor estimación del riesgo de DA y otras enfermedades atópicas por grupos poblacionales.

9. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de las principales mutaciones de pérdida de función del gen *FLG* en población pediátrica española es del 1,94% a nivel global, y del 12,6% en afectados por dermatitis atópica, siendo esta última cifra superior a la de otras poblaciones sur y centro europeas.
2. La presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen *FLG* suponen un factor de riesgo genético para el desarrollo de dermatitis atópica ya que aumenta la probabilidad de padecerla en 6,81 veces.
3. La presencia de la mutación R501X en el gen *FLG* supone el principal factor de riesgo genético para el desarrollo de dermatitis atópica en la población pediátrica española, mientras que las mutaciones R2447X y 2282del4 tienen escaso o nulo protagonismo como factores genéticos predisponentes para el desarrollo de dermatitis atópica en la misma población.
4. El polimorfismo rs2238136 del gen *VDR* incrementa el riesgo de desarrollar dermatitis atópica entre 2,70 a 3,09 veces,
5. El polimorfismo rs2239182 del gen *VDR* se presenta como un factor protector para el desarrollo de dermatitis atópica ya que reduce el riesgo de desarrollarla de entre un 58% y un 66%.
6. El haplotipo GCC (rs2239185-G, rs1540339-C, rs2238136-C) se constituye como un factor protector frente al desarrollo de dermatitis atópica.
7. La presencia de un alelo C en los SNPs rs2239182 y rs2238136, se asocian con niveles de vitamina D más elevados y los SNPs rs2239185-GA y rs2248359-TT se asocian con niveles de vitamina D más bajos en la población pediátrica.
8. La presencia de los polimorfismos rs2239185-AA, rs2239182-CC y rs1540339-CC, se asocian a mayores concentraciones séricas de colesterol total en población pediátrica, independientemente del desarrollo de DA.
9. Los polimorfismos rs2296241-AA y rs2248359-TT se asocian con mayores niveles de colesterol HDL en población pediátrica, independientemente del desarrollo de DA.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2004;113(5):832-6.
2. Ker J, Hartert TV. The atopic march: what's the evidence? *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2009;103(4):282-9.
3. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10023):1109-22.
4. Garnacho-Saucedo G, Salido-Vallejo R, Moreno-Gimenez JC. Atopic dermatitis: update and proposed management algorithm. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2013;104(1):4-16.
5. Ring J. *Atopic Dermatitis: Eczema*. Springer International Publishing Switzerland. 2016(1):2-5.
6. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Annals of nutrition & metabolism*. 2015;66 Suppl 1:8-16.
7. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014;70(2):338-51.
8. Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *The American journal of managed care*. 2017;23(8 Suppl):S115-s23.
9. Deckert S, Kopkow C, Schmitt J. Nonallergic comorbidities of atopic eczema: an overview of systematic reviews. *Allergy*. 2014;69(1):37-45.
10. Liu P, Zhao Y, Mu ZL, Lu QJ, Zhang L, Yao X, et al. Clinical Features of Adult/Adolescent Atopic Dermatitis and Chinese Criteria for Atopic Dermatitis. *Chinese medical journal*. 2016;129(7):757-62.
11. Katsarou A, Armenaka M. Atopic dermatitis in older patients: particular points. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2011;25(1):12-8.
12. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergologia et immunopathologia*. 2013;41(2):73-85.
13. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9537):733-43.
14. Odhiambo JA, Williams HC, Clayton TO, Robertson CF, Asher MI. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(6):1251-8.e23.
15. [Prevalence of symptoms suggestive of allergic rhinitis and atopic dermatitis in adolescents (Spanish ISAAC Study Group)]. *Anales espanoles de pediatria*. 1999;51(4):369-76.
16. Draaisma E, Garcia-Marcos L, Mallol J, Sole D, Perez-Fernandez V, Brand PL. A multinational study to compare prevalence of atopic dermatitis in the first year of life. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2015;26(4):359-66.
17. Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*. 2005;352(22):2314-24.
18. Ellis CN, Mancini AJ, Paller AS, Simpson EL, Eichenfield LF. Understanding and managing atopic dermatitis in adult patients. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. 2012;31(3 Suppl):S18-22.
19. Fennessy M, Coupland S, Popay J, Naysmith K. The epidemiology and experience of atopic eczema during childhood: a discussion paper on the implications of current knowledge for health care, public health policy and research. *Journal of epidemiology and community health*. 2000;54(8):581-9.
20. Martorell Aragones A, Felix Toledo R, Martorell Calatayud A, Cerda Mir JC. Epidemiologic, clinical and socioeconomic factors of atopic dermatitis in Spain: *Alergologica-2005*. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2009;19 Suppl 2:27-33.
21. Bieber T. Mechanisms of disease: Atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(14):1483-94.
22. Totri CR, Diaz L, Eichenfield LF. 2014 update on atopic dermatitis in children. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(4):466-71.
23. Leung DY, Guttman-Yassky E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;134(4):769-79.
24. Silverberg NB, Silverberg JI. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? *Cutis*. 2015;96(6):359-61.

25. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *The New England journal of medicine*. 2011;365(14):1315-27.
26. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao YW, Liao HH, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*. 2006;38(4):441-6.
27. Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao YW, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature genetics*. 2006;38(3):337-42.
28. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(3 Pt 2):949-63.
29. Loset M, Brown SJ, Saunes M, Hveem K. Genetics of Atopic Dermatitis: From DNA Sequence to Clinical Relevance. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2019;235(5):355-64.
30. Brunner PM, Guttman-Yassky E. Racial differences in atopic dermatitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2018.
31. Kaufman BP, Guttman-Yassky E, Alexis AF. Atopic dermatitis in diverse racial and ethnic groups- Variations in epidemiology, genetics, clinical presentation and treatment. *Experimental dermatology*. 2018;27(4):340-57.
32. Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4(1):1.
33. Otsuka A, Nomura T, Rerknimitr P, Seidel JA, Honda T, Kabashima K. The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Immunological reviews*. 2017;278(1):246-62.
34. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(3 Suppl 2):R7-r12.
35. Thaci D, Simpson EL, Beck LA, Bieber T, Blauvelt A, Papp K, et al. Efficacy and safety of dupilumab in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical treatments: a randomised, placebo-controlled, dose-ranging phase 2b trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10013):40-52.
36. Meng J, Moriyama M, Feld M, Buddenkotte J, Buhl T, Szollosi A, et al. New mechanism underlying IL-31-induced atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2018;141(5):1677-89.e8.
37. Silverberg JI, Hanifin J, Simpson EL. Climatic Factors Are Associated with Childhood Eczema Prevalence in the United States. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(7):1752-9.
38. Garcia-Diez A, Puig L, Ortiz J, Blanco A. [Validity of a telephone survey for determining the prevalence of atopic dermatitis and its seasonal variation in Spain]. *Actas Dermosifiliogr*. 2009;100(4):298-306.
39. Du Toit G, Santos A, Roberts G, Fox AT, Smith P, Lack G. The diagnosis of IgE-mediated food allergy in childhood. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2009;20(4):309-19.
40. Thomsen SF. Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN allergy*. 2014;2014:354250.
41. Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010;105(2):99-106; quiz 7-9, 17.
42. Drucker AM, Wang AR, Li WQ, Severson E, Block JK, Qureshi AA. The Burden of Atopic Dermatitis: Summary of a Report for the National Eczema Association. *The Journal of investigative dermatology*. 2017;137(1):26-30.
43. McNally NJ, Phillips DR, Williams HC. The problem of atopic eczema: aetiological clues from the environment and lifestyles. *Social science & medicine (1982)*. 1998;46(6):729-41.
44. Golding J, Peters TJ. The epidemiology of childhood eczema: I. A population based study of associations. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 1987;1(1):67-79.
45. Cho SH, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DY. Fibronectin and fibrinogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(2):269-74.
46. Buda A, Miedzobrodzki J. The Role of *Staphylococcus aureus* in Secondary Infections in Patients with Atopic Dermatitis (AD). *Polish journal of microbiology*. 2016;65(3):253-9.
47. Wollina U. Microbiome in atopic dermatitis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2017;10:51-6.

48. Han SH, Cheon HI, Hur MS, Kim MJ, Jung WH, Lee YW, et al. Analysis of the skin mycobiome in adult patients with atopic dermatitis. *Experimental dermatology*. 2018;27(4):366-73.
49. Breuer K, S HA, Kapp A, Werfel T. Staphylococcus aureus: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*. 2002;147(1):55-61.
50. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*. 2003;361(9352):151-60.
51. Strickland I, Hauk PJ, Trumble AE, Picker LJ, Leung DY. Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 1999;112(2):249-53.
52. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, et al. Evidence for a disease-promoting effect of Staphylococcus aureus-derived exotoxins in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(4):814-9.
53. Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1980;92(suppl):44-7.
54. Leung DY, Hanifin JM, Charlesworth EN, Li JT, Bernstein IL, Berger WE, et al. Disease management of atopic dermatitis: a practice parameter. Joint Task Force on Practice Parameters, representing the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, the American College of Allergy, Asthma and Immunology, and the Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Work Group on Atopic Dermatitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1997;79(3):197-211.
55. Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*. 1994;131(3):383-96.
56. Eichenfield LF, Hanifin JM, Luger TA, Stevens SR, Pride HB. Consensus conference on pediatric atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;49(6):1088-95.
57. Ricci G, Patrizi A, Bellini F, Medri M. Use of textiles in atopic dermatitis: care of atopic dermatitis. *Current problems in dermatology*. 2006;33:127-43.
58. Silverberg NB. A practical overview of pediatric atopic dermatitis, part 2: triggers and grading. *Cutis*. 2016;97(5):326-9.
59. Silverberg NB. A practical overview of pediatric atopic dermatitis, part 1: epidemiology and pathogenesis. *Cutis*. 2016;97(4):267-71.
60. Sicherer SH. Early introduction of peanut to infants at high allergic risk can reduce peanut allergy at age 5 years. *Evidence-based medicine*. 2015;20(6):204.
61. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(2):231-41.
62. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of cell science*. 2009;122(9):1285-94.
63. Dale BA. Purification and characterization of a basic protein from the stratum corneum of mammalian epidermis. *Biochimica et biophysica acta*. 1977;491(1):193-204.
64. Brown SJ, Kroboth K, Sandilands A, Campbell LE, Pohler E, Kezic S, et al. Intragenic Copy Number Variation within Filaggrin Contributes to the Risk of Atopic Dermatitis with a Dose-Dependent Effect. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(1):98-104.
65. Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, Dale BA. Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;104(2):218-23.
66. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunsuksiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(33):23772-81.
67. Aho S, Harding CR, Lee JM, Meldrum H, Bosko CA. Regulatory role for the profilaggrin N-terminal domain in epidermal homeostasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(10):2376-85.
68. Yoneda K, Nakagawa T, Lawrence OT, Huard J, Demitsu T, Kubota Y, et al. Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with loricrin in human cultured keratinocytes and epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(4):1206-14.
69. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, Iizuka H. Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1998;78(10):1245-53.

70. McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(2):280-91.
71. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & molecular medicine*. 1999;31(1):5-19.
72. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*. 2008;17(12):1063-72.
73. Heimal J, Spergel JM. Filaggrin mutations and atopy: consequences for future therapeutics. *Expert review of clinical immunology*. 2012;8(2):189-97.
74. Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(4):792-9.
75. Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997;108(2):179-87.
76. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 17):3069-70.
77. Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2002;24(9):789-800.
78. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(4):328-40.
79. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic therapy*. 2004;17 Suppl 1:43-8.
80. Barresi C, Stremnitzer C, Mlitz V, Kezic S, Kammeyer A, Ghannadan M, et al. Increased Sensitivity of Histidinemic Mice to UVB Radiation Suggests a Crucial Role of Endogenous Urocanic Acid in Photoprotection. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(1):188-94.
81. Walterscheid JP, Nghiem DX, Kazimi N, Nutt LK, McConkey DJ, Norval M, et al. Cis-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT2A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17420-5.
82. Noonan FP, De Fabo EC. Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. *Immunology today*. 1992;13(7):250-4.
83. Brown SJ, McLean WHI. One Remarkable Molecule: Filaggrin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(3):751-62.
84. Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin T-K, Brandner JM, Hachem J-P, et al. Filaggrin Genotype in Ichthyosis Vulgaris Predicts Abnormalities in Epidermal Structure and Function. *American Journal of Pathology*. 2011;178(5):2252-63.
85. Armengot-Carbo M, Hernandez-Martin A, Torrelo A. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2015;106(2):86-95.
86. Thyssen JP, Godoy-Gijon E, Elias PM. Ichthyosis vulgaris: the filaggrin mutation disease. *British Journal of Dermatology*. 2013;168(6):1155-66.
87. Angelova-Fischer I, Dapic I, Hoek A-K, Jakasa I, Fischer TW, Zillikens D, et al. Skin Barrier Integrity and Natural Moisturising Factor Levels After Cumulative Dermal Exposure to Alkaline Agents in Atopic Dermatitis. *Acta dermato-venereologica*. 2014;94(6):640-4.
88. Vavrova K, Henkes D, Struever K, Sochorova M, Skolova B, Witting MY, et al. Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(3):746-53.
89. Flohr C, England K, Radulovic S, McLean WHI, Campbell LE, Barker J, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with early-onset eczema, eczema severity and transepidermal water loss at 3 months of age. *British Journal of Dermatology*. 2010;163(6):1333-6.
90. Kezic S, Novak N, Jakasa I, Jungersted JM, Simon M, Brandner JM, et al. Skin barrier in atopic dermatitis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2014;19:541-56.
91. Hachem J-P, Wagberg F, Schmuth M, Crumrine D, Lissens W, Jayakumar A, et al. Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(7):1609-21.

92. Takai T. TSLP Expression: Cellular Sources, Triggers, and Regulatory Mechanisms. *Allergy International*. 2012;61(1):3-17.
93. Landheer J, Giovannone B, Mattson JD, Tjabringa S, Bruijnzeel-Koomen CAFM, McClanahan T, et al. Epicutaneous application of house dust mite induces thymic stromal lymphopoietin in non-lesional skin of patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;132(5):1252-4.
94. Sano Y, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Matsunaka H, Murakami Y, Yamashita R, et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2013;171(3):330-7.
95. Wilson SR, The L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The Epithelial Cell-Derived Atopic Dermatitis Cytokine TSLP Activates Neurons to Induce Itch. *Cell*. 2013;155(2):285-95.
96. Park Y-H, Jang W-H, Seo JA, Park M, Lee TR, Park Y-H, et al. Decrease of Ceramides with Very Long-Chain Fatty Acids and Downregulation of Elongases in a Murine Atopic Dermatitis Model. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(2):476-9.
97. Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E, et al. Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal alpha-toxin-induced keratinocyte death. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(2):421-+.
98. Cai SCS, Chen H, Koh WP, Common JEA, van Bever HP, McLean WHI, et al. Filaggrin mutations are associated with recurrent skin infection in Singaporean Chinese patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*. 2012;166(1):200-3.
99. Gao P-S, Rafaels NM, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, Hata T, et al. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;124(3):507-U178.
100. Mlitz V, Latreille J, Gardinier S, Jdid R, Drouault Y, Hufnagl P, et al. Impact of filaggrin mutations on Raman spectra and biophysical properties of the stratum corneum in mild to moderate atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(8):983-90.
101. Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, et al. Knockdown of Filaggrin Impairs Diffusion Barrier Function and Increases UV Sensitivity in a Human Skin Model. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(9):2286-94.
102. Navarro-Trivino FJ, Arias-Santiago S, Gilaberte-Calzada Y. Vitamin D and the Skin: A Review for Dermatologists. *Actas Dermosifiliogr*. 2019;110(4):262-72.
103. Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*. 1993;18(1):92-9.
104. McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM, et al. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(13):4848-52.
105. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*. 1991;30(23):5814.
106. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, et al. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nature genetics*. 2007;39(5):650-4.
107. Weidinger S, Rodriguez E, Stahl C, Wagenpfeil S, Klopp N, Illig T, et al. Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(3):724-6.
108. Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, et al. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(5):1203-9.
109. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Hogh JK, et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*. 2010;65(7):911-8.
110. Marenholz I, Nickel R, Rueschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118(4):866-71.
111. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: Robust risk factors in atopic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;123(6):1361-70.

112. van den Oord RAHM, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*. 2009;339.
113. Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, et al. Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(6):1591-4.
114. Brown SJ, Relton CL, Liao H, Zhao Y, Sandilands A, McLean WH, et al. Filaggrin haploinsufficiency is highly penetrant and is associated with increased severity of eczema: further delineation of the skin phenotype in a prospective epidemiological study of 792 school children. *The British journal of dermatology*. 2009;161(4):884-9.
115. Margolis DJ, Apter AJ, Gupta J, Hoffstad O, Papadopoulos M, Campbell LE, et al. The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;130(4):912-7.
116. Chen H, Common JEA, Haines RL, Balakrishnan A, Brown SJ, Goh CSM, et al. Wide spectrum of filaggrin-null mutations in atopic dermatitis highlights differences between Singaporean Chinese and European populations. *British Journal of Dermatology*. 2011;165(1):106-14.
117. On HR, Lee SE, Kim SE, Hong WJ, Kim HJ, Nomura T, et al. Filaggrin Mutation in Korean Patients with Atopic Dermatitis. *Yonsei medical journal*. 2017;58(2):395-400.
118. Zhang H, Guo Y, Wang W, Shi M, Chen X, Yao Z. Mutations in the filaggrin gene in Han Chinese patients with atopic dermatitis. *Allergy*. 2011;66(3):420-7.
119. Park J, Jekarl DW, Kim Y, Kim J, Kim M, Park YM. Novel FLG null mutations in Korean patients with atopic dermatitis and comparison of the mutational spectra in Asian populations. *The Journal of dermatology*. 2015;42(9):867-73.
120. Li K, Oh WJ, Park KY, Kim KH, Seo SJ. FLG mutations in the East Asian atopic dermatitis patients: genetic and clinical implication. *Experimental dermatology*. 2016;25(10):816-8.
121. Li M, Liu Q, Liu J, Cheng R, Zhang H, Xue H, et al. Mutations analysis in filaggrin gene in northern China patients with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2013;27(2):169-74.
122. Cascella R, Cuzzola VF, Lepre T, Galli E, Moschese V, Chini L, et al. Full Sequencing of the FLG Gene in Italian Patients with Atopic Eczema: Evidence of New Mutations, but Lack of an Association. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(4):982-4.
123. Pipinic IS, Macan J. [FILAGGRIN GENE NULL-MUTATIONS AND ATOPIC DISEASES]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*. 2015;69(5):467-73.
124. Thyssen JP, Elias PM. It Remains Unknown Whether Filaggrin Gene Mutations Evolved to Increase Cutaneous Synthesis of Vitamin D. *Genome biology and evolution*. 2017;9(4):900-1.
125. Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Watson RM, et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(8):1770-5.
126. Brown SJ, Relton CL, Liao H, Zhao Y, Sandilands A, Wilson IJ, et al. Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: A population-based case-control study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(4):940-6.
127. Cubero JL, Isidoro-Garcia M, Segura N, Benito Pescador D, Sanz C, Lorente F, et al. Filaggrin gene mutations and new SNPs in asthmatic patients: a cross-sectional study in a Spanish population. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;12:31.
128. Kechichian E, Ezzedine K. Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists. *American journal of clinical dermatology*. 2018;19(2):223-35.
129. Serrano MA. Contribution of sun exposure to the vitamin D dose received by various groups of the Spanish population. *The Science of the total environment*. 2018;619-620:545-51.
130. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88(2):296-307.
131. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995;53(1-6):599-602.
132. Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutrition reviews*. 2008;66(10 Suppl 2):S153-64.

133. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(4):1153-8.
134. Martinez Suarez V, Moreno Villares JM, Dalmau Serra J. [Recommended intake of calcium and vitamin D: positioning of the Nutrition Committee of the AEP]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*. 2012;77(1):57.e1-8.
135. Henry HL, Bouillon R, Norman AW, Gallagher JC, Lips P, Heaney RP, et al. 14th Vitamin D Workshop consensus on vitamin D nutritional guidelines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):4-6.
136. Sommer I, Griebler U, Kien C, Auer S, Klerings I, Hammer R, et al. Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia: a systematic review and meta-analysis. *BMC geriatrics*. 2017;17(1):16.
137. Shen L, Ji HF. Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutrition journal*. 2015;14:76.
138. Parker GB, Brotchie H, Graham RK. Vitamin D and depression. *Journal of affective disorders*. 2017;208:56-61.
139. Biswas S, Kanwal B, Jeet C, Seminara RS. Fok-I, Bsm-I, and Taq-I Variants of Vitamin D Receptor Polymorphism in the Development of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Cureus*. 2018;10(8):e3228.
140. Lucato P, Solmi M, Maggi S, Bertocco A, Bano G, Trevisan C, et al. Low vitamin D levels increase the risk of type 2 diabetes in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2017;100:8-15.
141. Lin J, Liu J, Davies ML, Chen W. Serum Vitamin D Level and Rheumatoid Arthritis Disease Activity: Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(1):e0146351.
142. Limketkai BN, Bechtold ML, Nguyen DL. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Current gastroenterology reports*. 2016;18(10):52.
143. Eloi M, Horvath DV, Ortega JC, Prado MS, Andrade LE, Szejnfeld VL, et al. 25-Hydroxvitamin D Serum Concentration, Not Free and Bioavailable Vitamin D, Is Associated with Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *PloS one*. 2017;12(1):e0170323.
144. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple sclerosis and related disorders*. 2017;14:35-45.
145. Kim MJ, Kim SN, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Vitamin D Status and Efficacy of Vitamin D Supplementation in Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2016;8(12).
146. Rajabbik MH, Lotfi T, Alkhaled L, Fares M, El-Hajj Fuleihan G, Mroueh S, et al. Association between low vitamin D levels and the diagnosis of asthma in children: a systematic review of cohort studies. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;10(1):31.
147. Oren E, Banerji A, Camargo CA, Jr. Vitamin D and atopic disorders in an obese population screened for vitamin D deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(2):533-4.
148. Mutgi K, Koo J. Update on the role of systemic vitamin D in atopic dermatitis. *Pediatric dermatology*. 2013;30(3):303-7.
149. Solman L, Lloyd-Lavery A, Grindlay DJC, Rogers NK, Thomas KS, Harman KE. What's new in atopic eczema? An analysis of systematic reviews published in 2016. Part 1: treatment and prevention. *Clinical and experimental dermatology*. 2019;44(4):363-9.
150. Vaughn AR, Foolad N, Maarouf M, Tran KA, Shi VY. Micronutrients in Atopic Dermatitis: A Systematic Review. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, NY)*. 2019;25(6):567-77.
151. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(10):3294-8.
152. Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *Human molecular genetics*. 2003;12(16):1973-9.
153. Malerba G, Lauciello MC, Scherpbier T, Trabetti E, Galavotti R, Cusin V, et al. Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(4 Pt 1):1587-90.

154. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics*. 1999;58(1):1-8.
155. Hughes MR, Malloy PJ, Kieback DG, Kesterson RA, Pike JW, Feldman D, et al. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science (New York, NY)*. 1988;242(4886):1702-5.
156. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):684-700.
157. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(9):967-73.
158. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(10):1057-65.
159. Heine G, Hoefler N, Franke A, Nothling U, Schumann RR, Hamann L, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *The British journal of dermatology*. 2013;168(4):855-8.
160. Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2010;30(3):397-409.
161. Kilic S, Silan F, Hiz MM, Isik S, Ogretmen Z, Ozdemir O. Vitamin D Receptor Gene BSMI, FOKI, APAI, and TAQI Polymorphisms and the Risk of Atopic Dermatitis. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2016;26(2):106-10.
162. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *The Journal of nutrition*. 1995;125(6 Suppl):1704s-8s.
163. Hallau J, Hamann L, Schumann RR, Worm M, Heine G. A Promoter Polymorphism of the Vitamin D Metabolism Gene Cyp24a1 is Associated with Severe Atopic Dermatitis in Adults. *Acta dermato-venereologica*. 2016;96(2):169-72.
164. Agon-Banzo PJ, Sanmartin R, Garcia-Malinis AJ, Hernandez-Martin A, Puzo J, Doste D, et al. Body mass index and serum lipid profile: Association with atopic dermatitis in a paediatric population. *The Australasian journal of dermatology*. 2019.
165. Bruno A, Pace E, Cibella F, Chanez P. Body mass index and comorbidities in adult severe asthmatics. *BioMed research international*. 2014;2014:607192.
166. Skaaby T, Husemoen LL, Thuesen BH, Hammer-Helmich L, Linneberg A. Atopy and cause-specific mortality. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2014;44(11):1361-70.
167. Thyssen JP, Linneberg A, Carlsen BC, Johansen JD, Engkilde K, Hansen T, et al. A possible association between a dysfunctional skin barrier (filaggrin null-mutation status) and diabetes: a cross-sectional study. *BMJ open*. 2011;1(1):e000062.
168. Godoy-Gijon E, Meseguer-Yebra C, Palacio-Aller L, Godoy-Rocati DV, Lahoz-Rallo C. [New populations at increased cardiovascular risk: Cardiovascular disease in dermatological diseases]. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*. 2016;28(3):143-53.
169. Park JE, Pichiah PBT, Cha YS. Vitamin D and Metabolic Diseases: Growing Roles of Vitamin D. *Journal of obesity & metabolic syndrome*. 2018;27(4):223-32.
170. Gul A, Ozer S, Yilmaz R, Sonmezgoz E, Kasap T, Takci S, et al. Association between vitamin D levels and cardiovascular risk factors in obese children and adolescents. *Nutricion hospitalaria*. 2017;34(2):323-9.
171. Kim MR, Jeong SJ. Relationship between Vitamin D Level and Lipid Profile in Non-Obese Children. *Metabolites*. 2019;9(7).
172. Fu J, Han L, Zhao Y, Li G, Zhu Y, Li Y, et al. Vitamin D levels are associated with metabolic syndrome in adolescents and young adults: The BCAMS study. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2019;38(5):2161-7.
173. Kazemian E, Amouzegar A, Akbari ME, Moradi N, Gharibzadeh S, Jamshidi-Naeini Y, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms affecting changes in visceral fat, waist circumference and lipid profile in breast cancer survivors supplemented with vitamin D₃. *Lipids in health and disease*. 2019;18(1):161.
174. Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;165(Pt B):369-81.

175. Bienertova-Vasku J, Zlamal F, Pohorala A, Mikes O, Goldbergova-Pavkova M, Novak J, et al. Allelic variants in vitamin D receptor gene are associated with adiposity measures in the central-European population. *BMC medical genetics*. 2017;18(1):90.
176. Gonzalez-Tarancon R, Sanmartin R, Lorente F, Salvador-Ruperez E, Hernandez-Martin A, Rello L, et al. Prevalence of FLG loss-of-function mutations R501X, 2282del4, and R2447X in Spanish children with atopic dermatitis. *Pediatric dermatology*. 2019.
177. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2008;216(1):83-4.
178. Debinska A, Danielewicz H, Drabik-Chamerska A, Kalita D, Boznanski A. Filaggrin loss-of-function mutations as a predictor for atopic eczema, allergic sensitization and eczema-associated asthma in Polish children population. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*. 2017;26(6):991-8.
179. Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, et al. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(3):564-7.
180. Greisenegger E, Novak N, Maintz L, Bieber T, Zimprich F, Haubenberger D, et al. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2010;24(5):607-10.
181. Wozniak M, Kaczmarek-Skamira E, Romanska-Gocka K, Czajkowski R, Kaluzna L, Zegarska B. The prevalence of mutations in the gene encoding filaggrin in the population of Polish patients with atopic dermatitis. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2016;33(2):128-33.
182. Mucha S, Baurecht H, Novak N, Rodriguez E, Bej S, Mayr G, et al. Protein-coding variants contribute to the risk of atopic dermatitis and skin-specific gene expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019.
183. Rice NE, Patel BD, Lang IA, Kumari M, Frayling TM, Murray A, et al. Filaggrin gene mutations are associated with asthma and eczema in later life. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;122(4):834-6.
184. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(6):1361-70.e7.
185. Holm JG, Agner T, Clausen ML, Thomsen SF. Determinants of disease severity among patients with atopic dermatitis: association with components of the atopic march. *Archives of dermatological research*. 2019;311(3):173-82.
186. Sekiya A, Kono M, Tsujiuchi H, Kobayashi T, Nomura T, Kitakawa M, et al. Compound heterozygotes for filaggrin gene mutations do not always show severe atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2017;31(1):158-62.
187. Henderson J, Northstone K, Lee SP, Liao H, Zhao Y, Pembrey M, et al. The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(4):872-7.e9.
188. Chan A, Terry W, Zhang H, Karmaus W, Ewart S, Holloway JW, et al. Filaggrin mutations increase allergic airway disease in childhood and adolescence through interactions with eczema and aeroallergen sensitization. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2018;48(2):147-55.
189. Igawa K. Future trends in the treatment of atopic dermatitis. *Immunological medicine*. 2019;42(1):10-5.
190. Kilic M, Ecin S, Taskin E, Sen A, Kara M. The Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Asthmatic Children: A Case-Control Study. *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*. 2019;32(2):63-9.
191. Zhang L, Zhang S, He C, Wang X. VDR Gene Polymorphisms and Allergic Diseases: Evidence from a Meta-analysis. *Immunological investigations*. 2019:1-12.
192. Wjst M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC genetics*. 2005;6:2.

193. Han JC, Du J, Zhang YJ, Qi GB, Li HB, Zhang YJ, et al. Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*. 2016;53(8):790-800.
194. Hattangdi-Haridas SR, Lanham-New SA, Wong WHS, Ho MHK, Darling AL. Vitamin D Deficiency and Effects of Vitamin D Supplementation on Disease Severity in Patients with Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis in Adults and Children. *Nutrients*. 2019;11(8).
195. Sempos CT, Heijboer AC, Bikle DD, Bollerslev J, Bouillon R, Brannon PM, et al. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. *British journal of clinical pharmacology*. 2018;84(10):2194-207.
196. Thyssen JP, Bikle DD, Elias PM. Evidence That Loss-of-Function Filaggrin Gene Mutations Evolved in Northern Europeans to Favor Intracutaneous Vitamin D3 Production. *Evolutionary biology*. 2014;41(3):388-96.
197. Sanmartin R, Pardos C, Doste D, Aguilera J, Alijarde R, Jesus Agon-Banzo P, et al. The association between atopic dermatitis and serum 25-hydroxyvitamin D in children: Influence of sun exposure, diet, and atopy features-A cross-sectional study. *Pediatric dermatology*. 2020.
198. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 1993;186(1):23-31.

Recursos electrónicos y bases de datos consultadas:

- **Ensembl** Release 98. *Ensembl is a genome browser for vertebrate genomes that supports research in comparative genomics, evolution, sequence variation and transcriptional regulation. Ensembl annotate genes, computes multiple alignments, predicts regulatory function and collects disease data. Ensembl tools include BLAST, BLAT, BioMart and the Variant Effect Predictor (VEP) for all supported species. Dirección web: <https://www.ensembl.org/index.html>*
- **Clin Var**. *ClinVar aggregates information about genomic variation and its relationship to human health. Dirección web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>*
- **OMIM**. *OMIM is a comprehensive, authoritative compendium of human genes and genetic phenotypes that is freely available and updated daily. OMIM is authored and edited at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, under the direction of Dr. Ada Hamosh. Its official home is omim.org. Dirección web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>*
- **Pubmed**. *PubMed comprises more than 30 million citations for biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books. Citations may include links to full-text content from PubMed Central and publisher web sites. Dirección web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>*
- **IGSR**. *The International Genome Sample Resource was established to ensure the ongoing usability of data generated by the 1000 Genomes Project and to extend the data set. Dirección web: <https://www.internationalgenome.org/>*

11. ANEXOS

11.1. ANEXO A: HOJA DE CÁLCULO DE SCORAD

Plantilla para el cálculo de SCORAD, extraída de "Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis" (198).

SCORAD
EUROPEAN TASK FORCE
ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name First Name

Date of Birth: DD/MM/YY

Date of Visit:

INSTITUTION

PHYSICIAN

Topical Steroid used:

Potency (brand name)

Amount / Month (6)

Number of flares / Month

45 (8.5)

45 18 45

9 9

45 (8.5)

45 18 45

(6) 9 9 (6)

Figures in parenthesis for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	<input type="text"/>
Edema/Papulation	<input type="text"/>
Oozing/crust	<input type="text"/>
Excoriation	<input type="text"/>
Lichenification	<input type="text"/>
Dryness *	<input type="text"/>

MEANS OF CALCULATION

INTENSITY ITEMS (average representative area)

0= absence
1= mild
2= moderate
3= severe

* Dryness is evaluated on uninvolved areas

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS
PRURITUS+SLEEP LOSS

SCORAD A/5+7B/2+C

Visual analog scale (average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0to10) 0 10

SLEEP LOSS (0to10) 0 10

TREATMENT:

REMARKS:

11.2. ANEXO B: VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Parámetro	Unidades	Sexo	Edad	Inferior	Superior
Calcio	mg/dl		0-10 días	7.6	10.4
			10 d. – 2 a.	9.0	11.0
			2-12 años	8.8	10.8
			12-60 años	8.6	10.0
			> 60 años	8.8	10.2
Fósforo	mg/dl		< 18 años	4.0	7.0
			> 18 años	2.5	4.5
PTH-i	pg/ml			15.0	88.0
Colesterol total	mg/dl			120.0	220.0
El valor de Colesterol recomendado debe estar por debajo de 200 mg/dL. (recomendaciones de la ESC/EAS 2019)					
Colesterol HDL	mg/dl	Masculino		40.0	
		Femenino		50.0	
Colesterol LDL	mg/dl			0.0	150.0
El valor de Colesterol LDL recomendado debe estar por debajo de 55 mg/dL si la categoría de riesgo CV es "muy elevado", 70 mg/dL si es "elevado", 100 mg/dL si es "moderado" y 116 mg/dL si es "bajo". (recomendaciones de la ESC/EAS 2019).					
Triglicéridos	mg/dl			30.0	175.0
El valor de Triglicéridos recomendado (en ayunas) debe estar por debajo de 150 mg/dL. (recomendaciones de la ESC/EAS 2019).					

Los valores de referencia de la 25-OH-vitamina D se definen en la Tabla 10.

ESC/EAS 2019 Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS).

11.3. ANEXO C: RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE ARAGÓN



Departamento de Salud y Consumo

CEIC Aragón (CEICA)

Informe Dictamen Protocolo Favorable

C.P. - C.I. P108/81

16 de diciembre de 2015

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que este Comité en su reunión de 16 de diciembre de 2015, correspondiente al Acta nº CP20/2015, ha evaluado la modificación relevante referida al estudio:

Título: Niveles de vitamina D en niños y su relación con la atopía.

Investigador: Yolanda Gilaberte

2º. Dicha enmienda propone:

- **Ampliación del número de controles**

Documento de información y consentimiento de los controles: diciembre 2015

3º. Considera que

- Se respetan los principios éticos básicos y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- Se realiza de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

4º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE a la modificación.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 16 de diciembre de 2015

Fdo:

Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

11.4. ANEXO D: HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Control

"Prevalencia de las mutaciones en el gen FLG y del receptor de la vitamina D y su relación con la dermatitis atópica"

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un proyecto de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido autorizado por el Sistema Nacional de Salud, de acuerdo a la legislación vigente y en concreto, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, y por el comité de ética de Aragón en sus actas 07/2015 y CP20/2015.

Nuestra intención en estas líneas, es que usted reciba la información suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere que su hijo/a participe o no en este estudio.

Debe saber que su participación es voluntaria, pudiendo cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que ello tenga repercusiones en su atención sanitaria.

El proceso consiste en realizar el estudio de ciertas mutaciones y polimorfismos de los genes FLG y VDR que se ha demostrado que pueden predisponer con mayor probabilidad al desarrollo de dermatitis atópica y otras alteraciones de la barrera epidérmica.

Este objetivo, puede alcanzarse sin la necesidad de ninguna extracción de sangre adicional, únicamente sería necesario extraer ADN de la sangre sobrante del proceso de análisis solicitado a su hijo/a dentro de la rutina clínica asistencial.

La colaboración en el presente estudio comprende la realización de una pequeña encuesta así como la firma del correspondiente consentimiento informado para que esta muestra de ADN pueda ser utilizada a tal fin.

Dicho esto, su participación en el estudio, como control/sano, estaría encaminada a determinar la prevalencia de las mutaciones y polimorfismos del gen FLG y del receptor de la vitamina D en la población infantil sana, que no presenta enfermedad atópica, para poder comparar estos resultados con la población afecta y ayudar a comprender mejor el desarrollo y manejo de la enfermedad.

En cuanto a la **confidencialidad** de sus muestras, y siguiendo el protocolo para estos casos, éstas serán analizadas y conservadas en el Servicio de Bioquímica Clínica y Genética Médica del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza).

Los datos recogidos en el estudio tendrán únicamente carácter científico y en ningún caso, serán utilizados con fines comerciales. Asimismo, estarán a disposición de los padres de los intervinientes en el estudio, siempre y cuando así lo deseen. En caso de obtención de datos genéticos, estos se conservarán al menos 5 años y posteriormente a esa fecha Vd. podrá pedir su cancelación. Si existieran descubrimientos inesperados que requieran de consejo genético se le informará una vez obtenidos y evaluados los resultados.

En lo ateniende a los datos personales, éstos serán anonimizados y confidenciales, no pudiendo ser utilizados salvo que medie su consentimiento expreso.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) y al Comité Ético de Investigación Clínica, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente

Zaragoza a de de 20...

Fdo: Ricardo González Tarancón
Investigador Principal del estudio

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Título del proyecto: Prevalencia de las mutaciones en el gen FLG y del receptor de la vitamina D y su relación con la dermatitis atópica (Control)

D./Dña , con DNI nº , padre/madre/tutor del niño/a , de años de edad, manifiesta que he sido informado/a sobre la aportación que, la utilización del sobrante de sangre que le ha sido extraída a su hijo/a como parte de la rutina clínica asistencial, pueda tener para llevar a cabo el Proyecto de Investigación anteriormente indicado.

He sido informado/a de que sus datos personales serán protegidos. Si No

Comprendo que la participación de mi hijo es voluntaria y que puedo revocar el consentimiento y retirarlo del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones.

Deseo ser informado sobre los resultados de mi hijo: Si No

En caso afirmativo indique su e-mail

Tomando esto en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta muestra de ADN pueda ser empleada a tal fin y pueda contribuir a conseguir los objetivos especificados en el proyecto.

He recibido una copia firmada de este consentimiento informado

Firma del participante o representante legal:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio mencionado.

Firma del investigador:

Fecha:

Ricardo González Tarancón

11.5. ANEXO E: VALOR DE AIC PARA CADA MODELO GENÉTICO Y SNP

En la siguiente tabla se muestran los valores de coeficiente de información de Akaike (AIC) para cada gen y en cada modelo. El mejor modelo es el que tiene un valor del AIC menor.

SNP	codominante	dominante	recesivo	overdominante	aditivo
rs731236	230,2	229,0	230,2	228,2	230,0
rs1544410	254,7	253,0	253,2	252,7	253,2
rs2239185	225,9	225,2	224,2	224,2	224,9
rs2239182	281,5	280,3	280,4	282,1	279,5
rs2107301	66,0	66,1	64,8	67,9	65,0
rs1540339	248,0	246,4	246,0	246,3	246,2
rs2239179	223,4	223,0	221,9	222,0	222,9
rs3782905	285,6	284,5	283,7	284,4	284,3
rs2238136	160,9	159,8	166,3	159,2	162,2
rs2296241	115,9	114,1	114,4	114,8	113,9
rs2248359	103,5	101,7	101,5	101,6	101,6