



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL
ESTADO**

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA FILAGRINA EN PACIENTES CON
DERMATITIS ATÓPICA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ALERGIA E
INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

**PRESENTA
DR JUAN JOSÉ OLIVAR VÁZQUEZ**

**TUTOR
DR JAVIER GÓMEZ VERA**

**PROFESOR TITULAR
DR JAVIER GÓMEZ VERA**

MÉXICO D.F. MAYO DEL 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores titulares del curso, Dr. Javier Gómez Vera, Dr. José Jesús López Tiro, Dra. María Elena Ramírez de la Cruz por su paciencia y enseñanzas, por permitirme aprender de ellos, en más de un aspecto, las cosas que me han sido de utilidad y seguirán siéndolo, en este proyecto y en nuestro quehacer médico diario.

Al personal del área de enseñanza por la aprobación y supervisión de este proyecto y las facilidades otorgadas, por su buena disposición para que trabajos como éste salgan a la luz

A la Dra. Lorena Orozco, Jefa del Laboratorio de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica, por su ayuda desinteresada al permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones y facilitarme el uso de los recursos materiales del mismo.

A la Dra. Silvia Jiménez Morales quien durante la realización de este proyecto fue pilar indiscutible en mi estancia en el laboratorio, que pacientemente me enseñó y guió para llevar a cabo los aspectos técnicos, poco conocidos para mí en un principio, y aún después. Por promover un ambiente de cordialidad y amistad que hizo más llevaderas las largas jornadas de trabajo. A ella y a su equipo, de quienes he podido aprender mucho más que solo los aspectos técnicos inherentes a este proyecto, al Mtro. Julián Ramírez, Ing. Juan Jiménez Ruiz, Mtra. Lupita Salas, Mtro. Roberto Gamboa y Mtra. Diana Ley, muchas gracias por sus enseñanzas, su compañía y su amistad también.

Al personal del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional del ISSSTE Lic. Adolfo López Mateos, Química Lucy Rivera Barrera y Enfermera Alma Jan Mendoza por su colaboración en la identificación de los pacientes y la recolección de muestras, así como por su apoyo en el trabajo asistencial cotidiano para con nuestros pacientes, por el ánimo infundido en las horas de duda.

A mis pacientes, por permitirme aprender de ellos, por su valiosa cooperación y por los datos que aportaron con sus muestras para este estudio.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento, por el don de la vida y las metas alcanzadas, por estar conmigo en mis momentos de flaqueza, por los triunfos y por las derrotas de las cuales he aprendido. Por la esperanza.

A mi madre por ser incondicional en este caminar, por su apoyo, por su amor, por su esfuerzo, porque ha sacrificado su vida para hacer mejor la mía, interminable la lista de los motivos para darte gracias. Te debo todo y te amo con todo mi corazón.

A mi pequeña hija Renata por venir a darle sentido a todos los esfuerzos, quien con su sonrisa ilumina mi vida y es el motivo de mis días, por ser el motor aún en el cansancio más intenso durante la etapa de residencia y alegrarme la existencia con tan solo con verla crecer. No me alcanzarían las palabras para decirte todas las cosas bellas que me haces sentir. Te amo hijita.

Mis amigos de toda la vida, así como los que tuve oportunidad de hacer durante mi etapa de residencia, no quiero decir nombres para no omitir ninguno, gracias por los buenos momentos compartidos, por ser tan comprensivos, por estar a mi lado pese a las diferencias y algunos pese a la distancia. Dios los bendiga.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	4
RESUMEN.....	5
ANTECEDENTES	9
ASPECTOS CLÍNICOS Y DIAGNÓSTICOS DE LA DA.....	9
ETIOPATOGENIA DE LA DA	12
ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES.....	13
GENES ASOCIADOS A DA.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL:	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	20
DISEÑO METODOLÓGICO.....	21
TIPO DE ESTUDIO.....	21
POBLACIÓN DE ESTUDIO	21
Criterios de inclusión	21
Criterios de exclusión	22
Criterios de eliminación	22
MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	22
Extracción de ADN:	22
Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN.....	23
Análisis molecular.....	23
Análisis de secuenciación automática.....	24
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
POBLACIÓN ANALIZADA	25
RESULTADOS RELATIVOS AL GÉNERO:	26
GRAVEDAD DE DA Y ASMA	27
RESULTADOS RELATIVOS A LA EDAD DE INICIO	28
ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES 2282del4 y R501X	29
Integridad del ADN	29
Reacción en cadena de polimerasa	29

Análisis de restricción	30
Análisis de secuenciación.	30
FRECUENCIAS DE POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS ENTRE CASOS Y CONTROLES.....	32
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	34
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	38
CRONOGRAMA	39
BIBLIOGRAFIA.....	40
ANEXOS.....	42
RECURSOS MATERIALES	42
RECURSOS HUMANOS	42
RECURSOS FINANCIEROS	42
HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gen FLG.Pag. 17

Figura 2. Productos de PCR en gel de agarosa.....Pag. 29

Figura 3: gel de agarosa al 2 % con productos de PCR obtenidos con primers de delección
2282del4 y mutación R501X.....Pag. 30

Figura 4: Electroferograma de paciente homocigoto CC de mutación R501XPag. 31

Figura 5: Electroferograma de SNP rs74129461.....Pag. 32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios diagnósticos para la dermatitis atópica.....	Pag. 11
Tabla 2: Programa de termociclado para el análisis de las mutaciones R501X y 2282del4.....	Pag. 24
Tabla 3 : Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	Pag. 25
Tabla 4: Estudio de asociación de los SNPs rs11584340 y rs 74129461.....	Pag. 33
Tabla 5: Características clínicas y genéticas de pacientes con DA.....	Pag. 34
Tabla 6: Análisis de correlación entre el genotipo y variables clínicas.....	Pag. 35

RESUMEN

Antecedentes: La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica y recurrente. Ocurre típicamente en individuos con historia familiar o personal de atopia, inicia frecuentemente en la infancia y su prevalencia e intensidad disminuye con la edad. Las características de la DA son su cronicidad, recaídas de la inflamación de la piel, alteraciones de la función de la barrera epidérmica que culmina en piel seca, sensibilización a alimentos y a alérgenos ambientales mediada por Ig E. Aunque los factores ambientales son importantes para el desarrollo de DA, se ha estimado que el 80 % de la predisposición a padecerla es debido a factores genéticos. La contribución de los genes en el desarrollo de DA se evidencia por los estudios en gemelos donde los índices de concordancia son altos. Dado que se asume que la DA es primariamente inmunológica en su etiopatogenia, las investigaciones de Genética se han enfocado en los genes involucrados en la respuesta inmunológica (genes candidato), sin embargo dado que comorbilidades de DA como asma alérgica y rinitis alérgica parecen ser un factor de bajo riesgo para el desarrollo de DA, se sugiere la presencia de genes específicos para esta entidad. La identificación reciente de mutaciones en el gen que codifica la proteína estructural del estrato córneo, la filagrina, ha llevado a proponerla como un marcador importante y ampliamente reproducible para determinar el riesgo de eczema. La región con una mayor vinculación a DA se ha identificado en el cromosoma 1q21. El gen FLG consta de un solo exón codificante, y su secuenciación completa ha revelado la presencia de mutaciones y múltiples polimorfismos que varían en frecuencia entre grupos étnicos. Dentro de estas variaciones se han descrito mutaciones que inducen cambios estructurales en la proteína o que afectan los niveles de su expresión, entre los que se encuentran las mutaciones R501X y 2282del4. Se ha demostrado que las mutaciones con pérdidas de función en los genes que codifican para proteínas de barrera de la piel confieren mayor susceptibilidad a DA y a asma. Aunque la arquitectura genética de la DA es compleja, las 2 mutaciones (R501X y 2282del4) han demostrado ser una herramienta para examinar el riesgo para DA y otras entidades atópicas.

Material y métodos: Se realizó un estudio de casos y controles incluyendo 21 pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica, y 11 controles sanos. La secuenciación del gen incluyó la región codificante de FLG, obteniéndose las secuencias de ADN por PCR: La genotipificación se realizó mediante primers para aislar las secuencias en las cuales se encuentran las mutaciones R501x y 2282del4 y se La significancia estadística de las diferencias en la distribución de genotipos y alelos se evaluó mediante la prueba de χ^2 , la evaluación de equilibrio de Hardy Weinberg se realizó a través del programa Finetti. Se aplicó un análisis de regresión logística para determinar la relación entre las mutaciones en el gen de FLG y la presencia de DA, su nivel de gravedad, de acuerdo a SCORAD, asociación a asma y sensibilidad a aeroalérgenos. Los riesgos relativos con un intervalo de confianza de 95 % se estimaron bajo un modelo de regresión logística.

Resultados: Los pacientes incluidos observaron un rango de edad de 3 meses a 42 años, 13 de ellos (61.9 %) fueron mujeres, y 8 (38.09%) fueron hombres. En relación a la gravedad de DA, 12 de ellos (57.14%) se catalogaron como DA leve y 9 (42.85%) como DA moderada. No se identificaron pacientes con DA severa. Los niveles de IgE en suero variaron en un rango de 193- 23 500 UI/ml (5141.61 U/ml promedio) En relación a las pruebas cutáneas el 55% (6/11) mostró positividad a estas, mientras que 45 % no reportó una respuesta alérgica a polvo y ácaros. Ocho de los pacientes presentaron el asma como una comorbilidad de la enfermedad, de los cuales el 87.5 % (7/8) fue un asma leve intermitente y el 12.5 % restante asma leve persistente (tabla 3). En relación al sexo, del total de hombres 7 (87.5%) presentó DA leve y 1 (12.5%) DA moderada. En el grupo de mujeres 5 de ellas (38.46%) presentaron DA leve y 8 (61.53%) DA moderada. las mutaciones que se buscaron (R501X y 2282del4) no se encontraron en la población estudiada ni en los controles, no identificándose alelos mutados, sin embargo se identificaron 4 SNPs reportados en las bases de datos: rs74129461, rs11584340, rs3120655, rs3120654. La distribución de los genotipos de los SNPs tanto en casos como en controles se encontraron para rs74129461 en equilibrio de Hardy W (HWE) con $p=0.09097$ al comparar genotipo AA vs GA OR= 6 [0.671-53.681], y $p=0.80915$, al comparar AA vs GG OR= 1.5 [0.055-40.633]. El rs11584340 sólo se encontró en HWE en casos pero no en controles, con $p=0.30141$ al comparar genotipo TT vs CT, OR=3.333 [0.319-34.830] y al comparar genotipo TT vs CC se obtuvo OR=7.857 [0.284—217.1] Los otros SNPs no se encontraron en HWE.

Conclusiones: Las mutaciones R501X y 2282del4 no se asocian a DA en la población estudiada. La prevalencia de DA es mayor en el género femenino, existe una asociación entre la gravedad de DA y el género, ya que ésta fue mayor en el género femenino. La población masculina presenta una enfermedad de inicio tardío. Otros SNPs en *FLG* o en genes candidato deben estudiarse.

SUMMARY

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronically relapsing inflammatory skin disease. Occurs typically in those with history of atopic disease, with onset on childhood, and becomes less severe and frequent with growth. The principal features include chronically relapsing course, abnormalities in skin barrier function with increased transepidermal water loss, increased food allergen and aeroallergen absorption and sensitivity through IgE response. Even environmental factors are important in AD, the 80% predisposition to develop is because of genetic factors. Genes contribution to AD is demonstrated in studies with twins where there are high concordance indexes. Based on the assumption that AD is caused by immunologic mechanisms, researches in genetics have been focused in genes involved in immunity response (candidate genes). However AD comorbidities like asthma, and allergic rhinitis, seem to be a low risk factor to develop AD, that suggest specific genes implicated to it. Recently identification of loss-of-function mutations of the epidermal barrier protein, filaggrin, have been demonstrated to be a major predisposition and widely reproduced risk factor for eczema. The region most associated with AD has been identified within 1q21 chromosome. Filaggrin gene has only one encoding exon and its complete sequenciation shows mutations and polymorphisms that varies between different ethnic groups. There are loss- of- function mutations and mutations that alter levels of the protein expression. To date two common FLG variants R501X y 2282del4 has been identified with this characteristics. It has been demonstrated that these mutations cause more susceptibility to develop AD and asthma. Even genetics in AD is complex, mutations R501X y 2282del 4 have been demonstrated being a usefull tool to evaluate risk for AD and other atopic diseases.

Methods: We performed a case-control study including 21 patients with diagnosis of atopic dermatitis and 11 control subjects. The gene sequenciation included encoding gene region of FLG and we obtained DNA sequences by PCR (polymerase chain reaction). Genotyping was made by using primers to create restriction sites for the analysis of the published R501x y 2282del4. The statistical significances of the differences in genotypes and alleles distribution was evaluated by X^2 test, the evaluation of Hardy Weinberg equilibrium was made by the Finetti program. Analysis of logistic regression was used to settle if mutations en the FLG gene and presence of atopic dermatitis were related, its severity index, according to SCORAD, association to asthma and sensitivity to aeroallergens. Relative risks with a confidence interval of 95 % were estimated with a logistic regression model.

Results: The patients included were 3 months to 42 years old, 13 of them (61.9 %) were women, and 8 (38.09%) were men. According to severity of AD, 12 of them (57.14%) were categorized as mild AD y 9 (42.85%) as moderate AD. There were no patients with severe AD. The IgE serum levels varied between 193- 23 500 UI/ml (average 5141.61 U/ml) Related to skin tests 55% (6/11) were positive, while the 45 % did not show an allergic response to

dustmites. Eight patients had asthma as comorbidity disease, with 87.5 % (7/8) was intermittent mild asthma and 12.5 % was persistent mild asthma (table 3). According to gender, 7 of all men (87.5%) has mild AD y 1 (12.5%) moderate AD. In the women group 5 of them (38.46%) had mild AD and 8 (61.53%) moderate AD. The mutations (R501X y 2282del4) were not founded in the group studied, and not founded in controls either, Mutated alleles were not identified, but 4 SNPs reported in data base were identified: rs74129461, rs11584340, rs3120655, rs3120654. The genotypes distribution of the SNPs in cases and controls were founded in Hardy Weinberg equilibrium to rs74129461 (HWE) with $p=0.09097$ while compared genotype AA vs GA OR= 6 [0.671-53.681], and $p=0.80915$, while compared AA vs GG OR= 1.5 [0.055-40.633]. The rs11584340 was just founded in HWE in cases but not in controls, with $p=0.30141$ while compared genotype TT vs CT, OR=3.333 [0.319-34.830] and while compared genotype TT vs CC was obtained OR=7.857 [0.284—217.1] The others SNPs were not founded in HWE.

Conclusions: Mutations R501X and 2282del4 were not asociated to AD in the evaluated group. The prevalence of AD is higher in women. Since AD prevalence was higher in women there is an association between AD severity and gender, Male group develop a late onset AD. There are another SNPs in FLG or candidate genes that should be analyzed.

ANTECEDENTES

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica y recurrente, cuya prevalencia se ha duplicado o triplicado en países industrializados en las últimas 3 décadas. Esta enfermedad ocurre típicamente en individuos con una historia familiar o personal de atopía e inicia frecuentemente en la infancia (denominada DA de inicio temprano). De hecho es considerada una enfermedad propia de la infancia cuya prevalencia e intensidad disminuye con la edad. Se calcula que la DA se presenta en el 15 a 30% en niños mientras que en adultos se observa en el 2 a 10% de la población.

La DA inicia en el primer año de vida en el 60 % de los casos y solo el 10 % desarrolla la enfermedad después de cumplir los 7 años de edad

Del total de casos de DA menores de 7 años, el 45 % en los primeros 6 meses de vida, al primer año de vida se incrementa al 60% de los casos y a estos se suman los que inician entre 1 y 5 años de edad, aumentando esta proporción a 85 % de los casos, y en el resto de los pacientes la enfermedad inicia después de esta edad.

Más del 50 % de niños afectados menores de los 2 años de edad no tiene ningún signo de sensibilización por IgE, pero se sensibilizan durante el curso de la DA. De estos niños más del 70 % tiene remisión espontánea antes de la adolescencia. La DA en adultos se conoce como también como DA de instalación tardía,

La DA se resuelve o mejora con la edad y solo el 20-25 % desarrollan síntomas persistentes durante la edad adulta, después de la pubertad. La tendencia a la persistencia es mayor en pacientes con dermatitis grave. En dos tercios de los lactantes con DA puede esperarse una gran mejoría o resolución casi completa a los 5 años, pero con frecuencia persisten algunas alteraciones como la xerosis.

La diferencia de prevalencias de DA entre el medio rural y el medio urbano sugiere un vínculo con la "teoría de la higiene", la cual postula que la ausencia de exposición a agentes infecciosos en la niñez incrementa la susceptibilidad a enfermedades alérgicas (1)

ASPECTOS CLÍNICOS Y DIAGNÓSTICOS DE LA DA

La DA es con frecuencia el prelude de diátesis atópica que incluyen asma y otras enfermedades alérgicas.

Se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas intensamente pruriginosas que pueden adoptar la forma de eczema, liquenificación y prúrigo.(2)

Las manifestaciones clínicas de DA varían con la edad y se pueden identificar tres etapas. A) Infancia: las primeras lesiones usualmente se manifiestan en mejillas y cuero cabelludo. Los rasguños, que frecuentemente comienzan algunas semanas después, ocasionan erosiones y costras. B) Niñez: las lesiones abarcan zonas flexoras, la nuca, y las zonas dorsales de las extremidades. C) Adolescencia y la adultez: las placas liquenificadas afectan las zonas flexoras, cabeza y cuello. En cada etapa, el prurito que continúa todo el día y empeora por las noches y puede ocasionar interrupción del sueño e importante deterioro de la calidad de vida (3).

La intensidad de la lesiones tiende a remitir a partir de los 30 años, pero hasta el 40% de los pacientes con DA continuará con la enfermedad durante su edad adulta o tendrá recurrencias a lo largo de su vida. (4)

Además de los pacientes adultos con enfermedad ya conocida desde la infancia debemos tener en cuenta otro subgrupo de pacientes en los que el comienzo de la enfermedad se produce en la edad adulta. Un cambio en el ambiente climático podría estar implicado. Los pacientes nacidos en un entorno húmedo podrían tener la enfermedad en forma subclínica y en el momento de mudarse a un clima más seco, ya de adultos, podrían desarrollarla (4). La forma más frecuente de presentación en el adulto sería la que afectaría típicamente flexuras, bien en forma de eczema exudativo o liquenificado. Sin embargo hasta en un 11% de los pacientes la distribución no es típicamente flexural y pueden presentarse variantes morfológicas atípicas dificultando el diagnóstico, con aspectos clínicos parecidos al eczema numular, prurigo o dermatitis seborreica. Otro aspecto a remarcar es la relación que presenta entre el número de criterios menores que presenta el paciente y la gravedad de la DA. Esen Ozcaya (2005) en un estudio retrospectivo que incluía 63 pacientes con DA del adulto, observó que si el paciente presentaba más de 6 criterios menores la DA tenía un curso más grave. (4).

La afectación cutánea de la DA no tiene características propias específicas y, como tal, no se diferencia de otras dermatitis. No existe en la actualidad un parámetro objetivo de laboratorio y su diagnóstico se basa en la asociación de una serie de rasgos clínicos. Hanifin y Rajka publicaron en 1980 los criterios mayores y menores que, todavía hoy, rigen en el diagnóstico de esta enfermedad. (Tabla 1) (2)

TABLA I. Criterios diagnósticos de la dermatitis atópica

Debe presentar tres o más de los siguientes criterios mayores:

1. Prurito
2. Morfología y distribución típicas
3. Dermatitis crónica o crónicamente recurrente
4. Historia familiar o personal de atopía

Como mínimo tres de los siguientes criterios menores:

1. Xerosis
2. Ictiosis. Hiperlinearidad palmar. Queratosis pilaris
3. Reactividad cutánea inmediata en test cutáneos
4. IgE sérica total elevada
5. Inicio en edad temprana
6. Tendencia a infecciones cutáneas. Trastorno en la inmunidad celular
7. Tendencia a dermatitis inespecífica de manos y pies
8. Eccema del pezón
9. Queilitis
10. Conjuntivitis recurrentes
11. Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan
12. Queratocono
13. Catarata subcapsular
14. Ojeras oscuras
15. Palidez facial. Eritema facial
16. Pitiriasis alba
17. Pliegues en región anterior del cuello
18. Picor con la sudoración
19. Intolerancia a disolventes de las grasas y lana
20. Acentuación perifolicular
21. Intolerancia a alimentos
22. Curso influido por factores ambientales y emocionales
23. Dermografismo blanco y respuesta retardada frente a agentes colinérgicos.

Hanifin JM, Rajka G. *Acta Dermatol Venereol* 1980; 92 (Suppl): 44-7.

Debido a la variación de la enfermedad con la edad y las presentaciones clínicas particulares existen limitaciones para poder establecer un método universal que permita valorar la gravedad de la DA. El European Task Force on Atopic Dermatitis diseñó el SCORAD para valorar a los pacientes que cumplen los criterios diagnósticos habituales y que es el más utilizado en Europa (2)

En el SCORAD se valora la extensión del área afectada por la dermatitis, la intensidad de las diversas lesiones (eritema, edema/pápula, exudado/costra, excoriación, liquenificación, sequedad) y en una escala analógica, visual los síntomas subjetivos (prurito y pérdida de sueño). Se han establecido 3 grados: Leve: puntuación de 0-25, Moderado: puntuación de 25 a 50, Grave: puntuación > 50(2)

Las características de la DA son su cronicidad, recaídas de la inflamación de la piel, alteraciones de la función de la barrera epidérmica que culmina en piel seca, sensibilización a alimentos y a alérgenos ambientales mediada por IgE (1). En los niños con DA se asocia

con frecuencia sensibilización alérgica a alimentos en los primeros años de vida y posteriormente a aeroalergenos. El 60 % de los lactantes con DA están sensibilizados a alimentos y el 60% de los mayores de 7 años se sensibilizan a aeroalergenos (2).

Los hallazgos histológicos de eczema agudo son edema intercelular epidérmico (espongiosis) y un prominente infiltrado perivascular de linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y algunos eosinófilos en la dermis. En cuadros subagudos y placas crónicas liquenificadas y excoriadas la epidermis está engrosada y su capa superior está hipertrofiada. Varias proteínas y lípidos responsables de las funciones de barrera de la piel se han encontrado ser deficientes en la piel de pacientes con DA. Estas moléculas incluyen FLG, involucrina, colesterol, ácidos grasos libres y ceramidas (5).

Un porcentaje considerable de pacientes con eczema atópico o DA (especialmente aquellos con enfermedad moderada o severa) muestran aumentos de los niveles de IgE y sensibilización específica para algunos alérgenos ambientales. El eczema a veces precede al desarrollo de enfermedad alérgica de vías respiratorias. En relación a la IgE total existen 2 formas de DA: a) una que presenta niveles elevados de IgE sérica que se denomina DA extrínseca y que abarca el 70-80% de los pacientes, b) otra que presenta niveles de IgE sérica normal o baja llamada DA intrínseca que a su vez abarca al 20-30 % de los pacientes. De manera general se pueden considerar como niveles normales de IgE total en el adulto valores por debajo de 100-300 kUI/L, con una media de alrededor de 30 kUI/L. En el servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital general de México los valores que se manejan para la población general mexicana son: 0-2 años: 0-16 kUI/L, 3-7 años: 0-60 kUI/L, 8-14: 0-80 kUI/L, 15-50: >200 kUI/L(6)

ETIOPATOGENIA DE LA DA

Durante muchos años se consideró a la DA como una enfermedad exclusivamente mediada por IgE con una respuesta específica frente a alérgenos, en especial alimentarios. Las investigaciones inmunológicas recientes han cambiado este concepto. En el estudio de los factores inmunológicos de la DA existe una interrelación permanente entre los siguientes elementos: 1. alteración de la barrera epidérmica, 2. queratinocitos, 3. células presentadoras de antígenos monocitos, 4. subpoblaciones linfocitarias, IgE, alérgenos, 5. superantígenos, 6- factores neuroinmunológicos, 7. eosinófilos, 8. autoantígenos (6)

En el mecanismo patogénico en DA se han propuesto 2 hipótesis, una considera que el defecto primario reside en una alteración inmunológica que causa sensibilización por IgE, con disfunción de la barrera epitelial a consecuencia de la inflamación local. La otra propone que un defecto intrínseco en las células epiteliales lleva a disfunción de la barrera y el aspecto inmunológico se considera un epifenómeno.

Aunque los factores ambientales son importantes para el desarrollo de DA, se ha estimado que el 80 % de la predisposición a padecerla es debido a factores genéticos. Tanto la DA como otras enfermedades atópicas no siguen un simple proceso mendeliano de herencia sino que presentan un patrón complejo donde varios genes pueden ser relevantes en su etiología. La contribución de los genes en el desarrollo de DA se evidencia por los estudios en gemelos donde los índices de concordancia son altos en gemelos monocigóticos (77%) comparado con los dicigóticos (15%).

Debido a que se asume que la DA es primariamente inmunológica en su etiopatogenia, por muchos años las investigaciones de Genética se han enfocado en los genes involucrados en la respuesta inmunológica (genes candidato), sin embargo dado que comorbilidades de DA como asma alérgica y rinitis alérgica parecen ser un factor de bajo riesgo para el desarrollo de DA, se sugiere la presencia de genes específicos para esta entidad. De hecho la identificación reciente de mutaciones en el gen que codifica la proteína estructural del estrato córneo, la filagrina, ha llevado a proponerla como un marcador importante y ampliamente reproducible para determinar el riesgo de eczema.

ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES

La identificación de los genes que influyen en DA se ha llevado a cabo principalmente mediante estudios de ligamiento y de asociación.

Los estudios de ligamiento analizan dos o más marcadores genéticos polimórficos y evalúan su cosegregación con la enfermedad (marcadores heredados junto con la enfermedad) en familias con pedigríes extensos o pares de hermanos afectados. En los estudios de ligamiento, la cosegregación de un marcador con la enfermedad podría ser indicador de que este marcador se encuentra dentro o aledaño al gen responsable de la patología o de la susceptibilidad a padecerla (7)

Los estudios de asociación evalúan la co-ocurrencia de un marcador con la enfermedad en individuos no relacionados. Estos estudios son utilizados ampliamente en el abordaje de las entidades complejas porque son menos costosos, es más fácil obtener muestras de individuos no relacionados y se pueden detectar genes con un efecto pequeño en la enfermedad. En los estudios de asociación existen dos principales tipos de diseño: a) casos y controles y b) estudios basados en familias (tríos: padres y paciente).

a) Los estudios de casos y controles comparan las frecuencias de una variante alélica o polimorfismo específico entre el grupo de pacientes y la población de controles sanos. La predominancia o disminución del alelo en alguna de las poblaciones de estudio sugiere que

esta variante se encuentra cercana al alelo involucrado con la enfermedad o asociada a ésta como factor de susceptibilidad, de protección o como modificador de la gravedad o de la respuesta al tratamiento. b) El análisis de la asociación basada en familias (TDT) se realiza en tríos, con el objeto de obtener tanto casos como controles dentro de la misma familia. Sin embargo, la principal limitante de esta estrategia es la disponibilidad del número de tríos que permita obtener un poder estadístico adecuado (>80%)

Los estudios de asociación son la estrategia de elección para la identificación de factores genéticos asociados al desarrollo de entidades complejas como la DA. Estos estudios analizan principalmente polimorfismos.

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 y se encuentran en una frecuencia mayor al 1 % en la población general. 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 (mutación). Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de “alta penetrancia” ya que los portadores de la variante suelen manifestar las enfermedades con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de baja frecuencia (<1 %) en la población general.

En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos 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”). También se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, pero no son determinante en el desarrollo de ésta.

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, polimorfismos de un nucleótido simple (single nucleotide polymorphism SNP). Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable, de una secuencia corta (en tándem), variantes en el número de copias, inserciones deleciones (Indel), inversiones y duplicaciones (8), entre otros. Los polimorfismos pueden provocar un cambio de aminoácido en la proteína y con ello modificar su actividad o función. También pueden ocurrir en zonas del promotor (modulan el proceso de transcripción del ADN en ARN) de un gen y modificar sus niveles de expresión. (7)

Los SNPs son los polimorfismos más abundantes de variación en el genoma humano, se estima que hay una por cada 500 pares de bases, constituyendo más del 90 % de todos los polimorfismos humanos. La mayoría de los SNPs solo tienen 2 alternativas (bialélicos) y ocurren en el DNA no codificante (9). Dado que son muy abundantes los SNPs son los polimorfismos más utilizados.

Los estudios de asociación genética, son para conocer los genes responsables del desarrollo de enfermedades en las que están implicados múltiples genes, como es el caso de la DA. (10)

GENES ASOCIADOS A DA

Las amplias investigaciones en el genoma han destacado algunos posibles loci de susceptibilidad para DA en los cromosomas 1q21, 3q21, 3p26, 5q31-33, 11q13, 14q11.2, 16q, 17q25 y20p (11).

Algunos de los genes candidatos más estudiados se han identificado en el cromosoma 5q31-33. Todos ellos codifican para citocinas que participan en la regulación de la síntesis de IgE: IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 y factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). Estas y otras citocinas son producidas por dos tipos principales de linfocitos T. Las células T tipo 2(Th2), producen citocinas que aumentan la producción de IgE, como IL4, IL5 e IL13. Las células T tipo 1, (Th1) producen principalmente IL-12 e IFN gamma que estimulan la producción de anticuerpos IgG y suprimen la producción de IgE. Las mutaciones que afectan la región promotora de la citocina atrayente de linfocitos (RANTES: célula T normal, expresada y secretada, regulada en activación) la cual se localiza en la región 17q11, así como polimorfismos en la subunidad alfa del receptor del IL-4 (16q12) también se han identificado en pacientes con DA. Polimorfismos que contribuyen al cambio de Th1 a Th2 dirigen la respuesta mediada Th1 (llamada polarización Th1) o polimorfismos de los genes que codifican receptores del sistema inmune innato pueden contribuir a un desbalance entre la respuesta inmune Th1 y Th2 en DA. Recientemente en población japonesa se identificaron otros genes de susceptibilidad para DA, incluyendo IL1RL1, CARD11 y TNFRSF6B (12).

La mayoría de estas regiones genéticas asociadas a DA corresponden a loci asociados con asma alérgica, rinitis y psoriasis, aunque esta última entidad y DA rara vez están vinculadas, sugiriendo la presencia de genes específicos para DA(13).

La región con una mayor vinculación a DA se ha identificado en el cromosoma 1q21. En esta región se localizan genes que tienen una participación importante en la función del epitelio y la diferenciación epidermoide, dentro de los cuales se encuentra el gen de la Filagrina (*FLG*). Este gen fue primeramente identificado como un gen relacionado con ictiosis vulgaris, el trastorno autosómico dominante de queratinización más común.

Tomando en cuenta que la piel seca y escaldada es un síntoma tanto de ictiosis vulgaris como de DA estudiando al gen *FLG* en europeos con DA se identificaron las mismas mutaciones que en psoriasis. Posteriormente se reportaron otras mutaciones distintivas en pacientes

japoneses. El gen de la *FLG* ha mostrado el efecto más fuerte y algunos estudios han demostrado que la magnitud de sus efectos en el riesgo de eczema es mayor que cualquiera de otros genes candidatos para enfermedades atópicas y el más ampliamente demostrado con sus complejos mecanismos genéticos (14).

La FLG es expresada en la piel y en las capas externas de la mucosa nasal y oral, pero no en el epitelio respiratorio de la nariz y el de las vías respiratorias bajas. Es una proteína de barrera epitelial que juega un papel clave en la compactación de filamentos de queratina en el estrato córneo y en la regulación de la hidratación del estrato córneo. Sus funciones defensivas incluyen barrera a la permeabilidad, que retarda la pérdida de agua por evaporación y una barrera antimicrobiana, mientras, simultáneamente promueve la colonización de flora normal no patogénica que resiste el crecimiento de patógenos microbianos (15) (5). La FLG es generada durante la cornificación y su proteína precursora, profilagrina, que es proteolíticamente procesada a FLG durante la transición de células del estrato granular a corneocito. FLG inicialmente agrega filamentos de queratina en fibrillas de queratina, subsecuentemente, es degradada proteolíticamente a aminoácidos, que son desaminados a ácidos policarboxílicos, como pirrolidina, ácido carboxílico y ácido trans-urocánico (16). Estos metabolitos actúan osmóticamente, contribuyendo a la hidratación de los corneocitos, además de la acidificación del estrato córneo (17). Estos metabolitos y varios iones son conocidos como el factor natural de humectación y juegan un rol principal en mantener la hidratación del estrato córneo. La importancia de los productos derivados de la ruptura de FLG y los profundos efectos en la función de barrera en su ausencia es notado por la vida media corta de esta proteína, misma que es de solo 6 horas. (18).

El gen *FLG* consta de un solo exón codificante, y su secuenciación completa ha revelado la presencia de mutaciones y múltiples polimorfismos que varían en frecuencia entre grupos étnicos (Fig. 1) (19). Dentro de estas variaciones se han descrito mutaciones que inducen cambios estructurales en la proteína o que afectan los niveles de su expresión, entre los que se encuentran las mutaciones R501X y2282del4 (20)

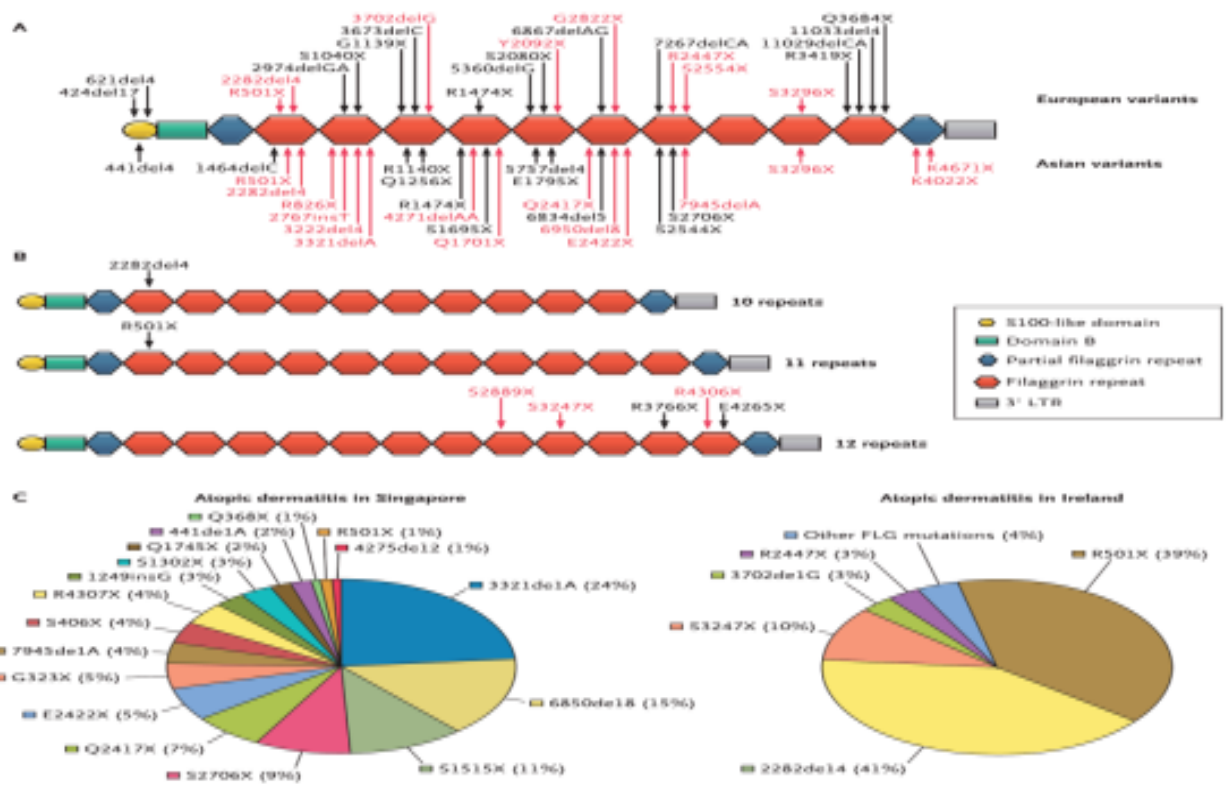


Figura 1. Gen FLG. A) Estructura del gen y localización de mutaciones en el gen; B) Estructura del gen y alelos; C) Frecuencia de mutaciones en población asiática y caucásica
Tomado de N ENGL J MED, 2011;365:1315.27

A la fecha no se sabe el papel que puedan tener las cerca de 40 mutaciones identificadas en pacientes con ictiosis vulgaris o DA en europeos y asiáticos, sin embargo se han identificado a las variantes R501X y a la 2282del4 como de riesgo para desarrollar DA en diversas poblaciones. En individuos de ascendencia europea con DA, la frecuencia estimada de portadores de alelos combinados es de aproximadamente 6 % mientras que poco se sabe de la relevancia de estas mutaciones en otras poblaciones (21). Así mismo, se ha documentado una asociación entre la R501X y 2282del4 con otros fenotipos atópicos y eczema de inicio temprano y más persistente en una cohorte de aproximadamente 7000 niños ingleses nacidos entre 1990 y 1991. Se ha identificado recientemente una nueva variante de susceptibilidad: un SNP en el cromosoma 11q13.5. El mismo estudio reportó un SNP de susceptibilidad adicional localizado dentro del gen de la hornerina (HRNR) que codifica la proteína hornerina en el cromosoma 1q21, mientras confirma la asociación de mutaciones nulas de *FLG* en la población europea (22)

Para elucidar los mecanismos patológicos de DA subyacentes a mutaciones en *FLG* se ha investigado la hidratación del estrato córneo (SC) y pérdida de agua transepidérmica (TEWL) como parámetros de función de barrera en individuos portadores de mutaciones comparados con sujetos sin mutaciones. En pacientes con mutaciones se observó una reducción

significativa de la hidratación y el grosor comparada con los controles sanos. La TEWL fue incrementada en portadores de mutaciones comparada con pacientes sanos. El score de DA para medir la gravedad clínica de la enfermedad (SCORAD) correlacionó significativamente con TEWL, hidratación subcutánea y grosor SC en DA con mutaciones en *FLG*. También se reportó una correlación significativa entre OSCORAD e IgE específica para polvo casero, alérgenos de polvo, y gato en pacientes con DA y mutaciones de *FLG*. Estos datos sugieren que los defectos de barrera de la piel, demostrables experimentalmente, por las mutaciones de *FLG* pueden jugar un papel crucial en la patogénesis de DA (23)

Por su parte Gao y cols (24) demostraron que las mutaciones con pérdidas de función en los genes que codifican para proteínas de barrera de la piel confieren mayor susceptibilidad a DA y a asma.

Gao y cols evaluaron el papel de los polimorfismos de *FLG* en las complicaciones serias de DA. Los autores determinaron que la frecuencia de la mutación R501X fue 3 veces mayor y cerca del doble de riesgo relativo de enfermedad para pacientes con eczema herpético comparado con aquellos con DA sin eczema herpético (25). Las infecciones virales diseminadas pueden resultar también de disfunción de la piel como barrera independientemente de los niveles de IgE sérica. Defectos en la función de barrera predisponen incremento de la penetración diseminación viral en la piel. De algún modo el incremento de los niveles de IgE y de sensibilización a aeroalérgenos observados en pacientes con mutación en *FLG* pueden deberse a una mayor penetración de alérgenos en la piel (26).

Aunque la arquitectura genética de la DA es compleja las 2 mutaciones (R501X y 2282de14) han demostrado ser una herramienta para examinar el riesgo para DA y otras entidades atópicas.

Las mutaciones de *FLG* ayudan a definir el perfil de riesgo de los fenotipos de niños con eczema y de “eczema más sibilancias tempranas, y “eczema más asma”. (27)

La asociación de mutaciones de *FLG* y asma parece estar limitada a asma coexpresada con eczema aunque la incidencia de alelos nulos de *FLG* en la población general y su rol en otras enfermedades que no sean eczema no se han determinado suficientemente. La expresión de *FLG* en la piel y otros epitelios queratinizados como la cavidad oral o la conjuntiva sugiere que otros órganos además de la piel pueden ser afectados por mutaciones de *FLG* (28).

Por otro lado se ha identificado una correlación entre las mutaciones de *FLG* con la DA de inicio temprano y una propensión hacia asma. No hay asociación entre mutaciones de *FLG* y enfermedades de vías respiratorias alérgicas sin DA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Los polimorfismos R501X y 2282del4 del gen de la filagrina son factores de riesgo para dermatitis atópica en la población mexicana?

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país no existen reportes confiables de la incidencia y prevalencia de dermatitis atópica, en la consulta del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional ISSSTE Lic. Adolfo López Mateos la DA representa cerca del 10 % de los pacientes atendidos.

El aumento de la afluencia de los pacientes a los servicios de salud en el sector público y privado en los servicio de Alergia e Inmunología Clínica obliga al uso adecuado y racional de los recursos de tipo diagnóstico y terapéutico. Con lo anterior se puede lograr, de manera prioritaria, una adecuada atención a los pacientes y contribuir a reducir el costo económico que tiene su tratamiento.

La identificación de mutaciones en el gen de filagrina resulta de interés, ya que se ha encontrado relación entre la presencia de ciertas mutaciones en este gen con una mayor gravedad de DA, así como con la presencia de otras enfermedades alérgicas principalmente asma. De encontrarse dicha relación podría identificarse tempranamente el riesgo de desarrollo de la enfermedad, y el manejo incluiría medidas para disminuir el riesgo de progresión de enfermedad alérgica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la asociación de las mutaciones R501X y 2282del4 y polimorfismos, del gen de filagrina, con dermatitis atópica en pacientes asistentes a la consulta externa del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar la frecuencia de las mutaciones R501X y 2282del4 en pacientes con DA.
- Determinar la asociación de polimorfismos en el gen filagrina con la susceptibilidad a desarrollar DA.
- Correlacionar la presencia de polimorfismos de filagrina con la edad de inicio de las manifestaciones clínicas y la gravedad de DA.
- Establecer la correlación entre polimorfismos del gen de filagrina con la presencia de asma en pacientes con DA.
- Determinar la relación entre los polimorfismos del gen de filagrina y la sensibilidad a ácaros y polvo en pacientes con DA.

DISEÑO METODOLÓGICO

TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio clínico, caso-control, longitudinal, observacional y comparativo

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron a pacientes de ambos géneros diagnosticados con DA por un médico Alergólogo y que acudieron a la consulta externa del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos, en el periodo comprendido entre abril del 2010 y octubre del 2010. Los pacientes se clasificaron de acuerdo a su nivel de gravedad con base al SCORAD en leve, moderada, severa. Además se realizó un cuestionario (anexo) para conocer los antecedentes familiares de alergia, edad de inicio de los síntomas, tratamientos establecidos para el padecimiento y comorbilidades alérgicas. Posteriormente se realizaron pruebas cutáneas para alergenios intramuros (polvo, D. pteronisinus y D. Farinae) En el caso de pacientes con DA y asma, esta última enfermedad también se estadió por severidad de acuerdo a la clasificación GINA (leve intermitente, leve persistente, moderada persistente, severa persistente)

El grupo control se conformó por individuos adultos sanos tomados de población abierta, sin antecedentes personales de DA, asma y atopia.

A ambos grupos se les tomó una muestra de sangre periférica después de autorizar su participación con la carta de consentimiento informado. En el caso de los menores de edad los padres o tutores firmaron dicha carta con el asentimiento de los pacientes.

Criterios de inclusión

Casos: pacientes con diagnóstico clínico de DA que acudieron a la consulta externa del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional ISSSTE Lic. Adolfo López Mateos, y que aceptaron participar en el estudio

Controles: individuos sin antecedentes personales de enfermedad alérgica o DA que aceptaron participar en el estudio, firmando un consentimiento informado

Criterios de exclusión

Por razones de seguridad se eliminaron a los pacientes y controles con entidades infectocontagiosas

Criterios de eliminación

Pacientes y controles cuyo ADN no fue suficiente para el análisis o no cumplió con la calidad e integridad

MUESTRAS BIOLÓGICAS

De cada participante se obtuvieron 5 a 10 ml de sangre periférica mediante venopunción. La muestra de sangre se almacenó en tubos Vacutainer con EDTA para evitar su coagulación.

Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN, se utilizó el Kit, QIAgen Blood (QIAGEN, GmbH D-40724, Hilden) . Se hizo la separación de los leucocitos centrifugando los tubos vacutainer a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente se separó la capa de leucocitos y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. Las células fueron lavadas con 10 ml de solución de lisis de eritrocitos y centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para obtener el botón de leucocitos. A partir de los leucocitos se realizó la extracción de ADN genómico para lo cual se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo que contenía el botón de células blancas y se agitaron vigorosamente en el vortex durante 1 min hasta eliminar los agregados celulares. Posteriormente, a este mismo tubo se le agregó 1 ml de solución para precipitar proteínas, se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min y se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, al cual se agregaron 5 ml de isopropanol para precipitar el ADN. Las hebras de ADN se hicieron evidentes después de agitar el tubo por inversión por lo menos 6 veces. Finalmente con una pipeta Pasteur se extrajo el ADN y se diluyó en 500 ul de buffer TE (TEKNOVA).

Cuantificación y evaluación de la integridad del ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm. El sistema arrojó la concentración en ng/ul, tomando en cuenta el valor de DO260 (densidad óptica a 260 nm) y la constante para ADN (0.05).

La evaluación de integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En el gel se cargaron 5 ul de ADN con 2µl de azul de bromofenol. La electroforesis se corrió a 100 volts durante 30 minutos y finalmente se observó en un transiluminador con luz UV. La integridad del ADN se consideró adecuada cuando se observó una banda de alto peso molecular.

Análisis molecular

La genotipificación de las mutaciones se realizó mediante restricción enzimática.

La amplificación de las regiones genéticas con las mutaciones R501X y 2282del4 se llevó a cabo mediante PCR en un termociclador 9700 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) a partir de ADN genómico. Los primers empleados son aquellos descritos por R Gruber et Al (29). Para el análisis de la mutación R501X, localizada en el exón 3 del gen FLG se emplearon los primers FiiH1F3/RPT1P6 y para el caso de la delección 2282del4 el par de primers RPT1P7/RPT2P1.

Las condiciones de PCR fueron 50 ng de ADN genómico, 1µl de cada iniciador, 1µl de cada dNTP, 0.3 µl de AmpliTaq Gold ADN polimerasa, 2.5 µl de MgCl₂ y 2.5 µl de buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El programa de termociclado empleado en ambos casos fueron las descritas en la tabla 2, consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 30 ciclos que consistieron cada uno en desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 65°C por 45 segundos y extensión a 68°C por 45 segundos.

Para verificar que los productos de amplificación correspondieran a lo ya reportado, éstos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante un transluminador con luz UV.

Posteriormente, de manera independiente los fragmentos amplificados fueron sometidos a restricción durante 12 horas empleando las enzimas de restricción DRA III para la mutación R501X y la enzima NLa II para 2282del4). Finalmente se determinó la presencia de ambas mutaciones mediante el corrimiento electroforético y la visualización de los productos de restricción en geles de agarosa al 2%, con productos de 360 y 600 pares de bases respectivamente.

Tabla 2: Programa de termociclado para el análisis de las mutaciones R501X y 2282del4

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización	95° C	10 minutos	1
Desnaturalización	95° C	30 segundos	30
Alineación	65° C	45 segundos	
Extensión	68° C	45 segundos	
	72° C	7 minutos	1
	4° C	α	1

Análisis de secuenciación automática

La validación de los genotipos y la identificación de nuevas mutaciones fue realizado mediante secuenciación automática.

La secuenciación del gen incluyó la región codificante de *FLG*. Se utilizó el kit Big Dye Terminator v3. Las condiciones de amplificación fueron 50 ng de ADN genómico, 2.5 pmoles de cada primer, 2 mM de cada dNTP, 1 U de AmpliTaq Gold ADN Polimerasa, 1.5mM de MgCl₂ y 1X de buffer (Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias en la distribución de genotipos y alelos fueron evaluadas mediante la prueba de X^2 , incluida en el programa Epi Info v.6.02 (CDC Atlanta USA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

La evaluación de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó a través del programa FINNETI (<http://ihg2.helmholtzmuenchen-de/cgi-bin/hw/hwa1>).

Se aplicó un análisis de regresión logística para determinar la relación entre las mutaciones en el gen de *FLG* y la presencia de DA, su nivel de gravedad de acuerdo a SCORAD y sensibilidad a aeroalergenos (ácaros y polvo)

Los riesgos relativos (ORs) con un intervalo de confianza de 95 %, se estimaron bajo un modelo de regresión logística. Se determinaron categoría de referencia para el análisis de acuerdo a cada parámetro.

RESULTADOS

POBLACIÓN ANALIZADA

Se incluyeron en el estudio un total 11 individuos sanos como controles y 21 pacientes con diagnóstico clínico de DA. Los pacientes incluidos observaron un rango de edad de 3 meses a 42 años, 13 de ellos (61.9 %) fueron mujeres, y 8 (38.09%) fueron hombres. En relación a la gravedad de DA, 12 de ellos (57.14%) se catalogaron como DA leve y 9 (42.85%) como DA moderada. No se identificaron pacientes con DA severa. Los niveles de IgE en suero variaron en un rango de 193- 23 500 UI/ml (5141.61 U/ml promedio) En relación a las pruebas cutáneas el 55% (6/11) mostró positividad a estas, mientras que 45 % no reportó una respuesta alérgica a polvo y ácaros. Ocho de los pacientes presentaron el asma como una comorbilidad de la enfermedad, de los cuales el 87.5 % (7/8) fue un asma leve intermitente y el 12.5 % restante asma leve persistente (tabla 3). En relación al sexo, del total de hombres 7 (87.5%) presentó DA leve y 1 (12.5%) DA moderada. En el grupo de mujeres 5 de ellas (38.46%) presentaron DA leve y 8 (61.53%) DA moderada

Tabla 3 : Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Pacientes	Sexo	Edad de Inicio	Niveles de IgE al dx (UI/ml)	Pruebas cutáneas	Severidad de asma	Severidad de D.A.
1	M	3 años	276	P ++/DPT+++	L. I	Moderada
2	H	10 años	76.9	P++/ DPT+++	No	Leve
3	M	26 años	2100	DPF ++	No	Moderada
4	H	2 años	201	DPF ++++	No	Leve
5	H	4 años	1500	Negativa	No	Leve
6	M	2 años	309	P +++/DPF +++	L. P.	Leve
7	M	2 años	991	Negativa	No	Moderada
8	H	42 años	466	P +++/ DPT y DPF +++	No	Moderada
9	M	4 años	221	P ++/ DPF +++	No	Leve
10	H	2 años	240	P ++/ DPF ++	L. I.	Leve
11	H	12 años	14700	DPT ++++/ DPF ++	No	Leve
12	M	3 años	631	P ++/ DPT +++	L. I.	Leve
13	M	6 meses	20700	Negativa	L. I.	Moderada
14	H	8 años	1820	Negativa	No	Leve
15	M	24 años	22000	Negativa	L. I.	Leve
16	M	6 años	23500	Negativa	No	Moderada
17	H	3 meses	529	Negativa	L. I.	Leve
18	M	4 meses	4720	P +++	No	Moderada
19	M	7 años	193	P ++/ DPT ++	L. I.	Moderada
20	M	2 años	10800	DPT y DPF +++	No	Moderada
21	M	3 años	2000	P ++++/ DPF ++++	No	Leve

D.A: dermatitis atópica, H: hombre, M: mujer, P: polvo, DPT: Dermatophagoides pteronyssinus, DPF: Dermatophagoides farinae, L.I: leve intermitente, L.P. leve persistente

RESULTADOS RELATIVOS AL GÉNERO:

Población masculina:

Del total de los pacientes del género masculino 1/8 (12.5%) inició con los síntomas de DA antes del año de edad, 3 (37.5%) entre 1 y 5 años y 4 (50%) después de los 5 años de edad.

Asma estuvo ausente en 6 casos (75%), y en 2 (25%), presentaron asma leve intermitente.

Las pruebas cutáneas para aeroalergenos fueron negativas en 3 pacientes masculinos (37.5%). 2 casos (25%) fueron positivos para ácaros (DPT y/o DPF), y 3 (37.5%) para ácaros y polvo. En este grupo, 4 (80%) con positividad en las pruebas cutáneas fueron muy reactivos (+++ en las pruebas), y positivos solo para *Dermatophagoides*

En este grupo el 12.5 % presentó niveles de IgE menores de 80 UI/ml y el 87.5% restante tuvieron niveles mayores de 200 mg/ml, de los cuales 33.3% presentaron niveles de IgE mayores de 1000 UI/ml. El promedio del nivel de IgE en este grupo fue de 2441.6 UI/ml.

Población femenina:

De las pacientes femeninas, 2 (15.38%) iniciaron sintomatología antes del año de edad, 7 (53.84%) en el rango de 1 y 5 años de edad, y 4 (30.76%) iniciaron después de los 5 años de edad

El asma estuvo ausente en 7 (53.8%) casos, 5 presentaron asma leve intermitente (38.46%) y uno (7.69%) asma leve persistente.

Las pruebas cutáneas para aeroalergenos fueron negativas en 4 mujeres (30.76%), el resto de ellas presentaron reactividad para polvo: 1 (7.69%), para ácaros (DPT y/o DPF) 2 (15.38%) y para polvo y ácaros en 6 casos (46.15%). Siete (53.84%) pacientes femeninas fueron muy reactivas en pruebas cutáneas (reporte de prueba cutánea > ó = +++), 6 (46.15%) de ellas positivas solo a *Dermatophagoides*, 1 (7.69%) reactiva solo a polvo.

Los niveles de IgE en este grupo se reportaron entre 80 y 200 UI/ml en un caso (7.69%) y fueron mayores de 200 UI en 12 casos (92.3%). Siete mujeres (53.84%) tuvieron niveles de IgE mayores a 2000 UI/ml (promedio 6803.15 UI/ml).

GRAVEDAD DE DA Y ASMA

DA Leve :

De los 12 casos de DA leve, 7 de ellos (58.33%) no presentaron asma. 4 casos (33.33%) con asma leve intermitente y un caso (8.3%) con asma leve persistente.

Los pacientes con asma leve iniciaron sintomatología antes de los 5 años de edad, en su mayoría, con un paciente (8.33%) antes del año de edad, 7 pacientes (58.33%) entre el año y los 5 años de edad, y 4 pacientes (33.33%) después de los 5 años de edad.

En este grupo 7 pacientes fueron hombres (58.3%) y 5 pacientes (41.6%) fueron mujeres

Solo en un caso (8.33%) se detectó bajos niveles de IgE, (< 80 UI/ml) y el resto (91.6%) con niveles mayores a 200 UI/ml

En ningún caso de DA leve hubo sensibilidad a polvo, como único alérgeno, pero si para ácaros (DPT/DPF), el cual se observó en 2 (16.6%) casos. Positividad tanto a ácaros como a polvo se presentó en 6 (50%) pacientes. En 4 casos (33.3%) no hubo sensibilidad para estos aeroalergenos. Siete 7 de los pacientes con DA leve tuvieron reactividad alta en las pruebas cutáneas, siendo los ácaros el alérgeno predominante en 58.3 % de los casos.

DA moderada

De los 9 casos de DA moderada no hubo concomitancia con asma en 6 casos (66.6%), 3 de los casos (33.33%) se presentaron en forma concomitante con asma leve intermitente, y ningún caso de DA moderada se presentó en forma concomitante con asma leve persistente o de mayor gravedad.

Los pacientes con asma moderada iniciaron sintomatología antes del año de edad en 2 casos (22.2%), en 3 (33.3%) pacientes entre 1- 5 años y 4 (44.4%) después de los 5 años de edad.

En este grupo solo hubo un caso de sexo masculino (11.1%) y 8 casos de mujeres (88.8%)

Solo un caso (11.1%) tuvo niveles de Ig E en el rango de 80 a 200 UI/ml y 8 casos (88.8%) mayores de 200 UI

En 3 casos de pacientes con DA moderada (33.3%) no se documentó reactividad a aeroalergenos. De los pacientes con reactividad a aeroalergenos hubo sensibilidad solo a

polvo en 1 caso (11.1%), solo a ácaros en 2 casos (22.2%), y a ambos en 3 casos (33.3%). En 4 casos (44.4%) hubo alta sensibilidad a aeroalergenos, predominando ácaros en 3 (33.3%) de estos casos y polvo en 1 caso (11.1%)

RESULTADOS RELATIVOS A LA EDAD DE INICIO

Del total de pacientes estudiados (21), 3 (14.28%) iniciaron sintomatología antes del año de edad, 10 (47.6%) entre el año y los 5 años de edad, y 8 (38.09%) después de los 5 años de edad

< 1 año de edad:

En este grupo (3 casos en total), solo 1 (33.3%) presentó DA leve, y 2 casos (66.6%) presentaron DA moderada

No hubo concomitancia con asma en 1 caso (33.3%) y en el resto de casos (66.6%) presentaron asma leve intermitente. No hubieron casos de asma de mayor gravedad

1 a 5 años de edad :

En este grupo (10 casos en total), 7 pacientes (70%) presentaron DA leve y 3 (30%) DA moderada.

En 6 casos no hubo asociación al desarrollo del asma (60 %), en 3 casos (30%) los pacientes presentaron asma leve intermitente, y en 1 caso (10%) hubo presencia de asma leve persistente

Mayores de 5 años de edad:

En este grupo (8 casos en total) presentaron DA leve en 4 casos (50%) y DA moderada en los otros 4 casos (50%)

No hubo concomitancia con asma en 6 casos (75%), y solo en 2 casos (25%) se detectó asma leve intermitente. No se reportaron casos de asma de mayor severidad.

ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES 2282del4 y R501X

Integridad del ADN

El ADN tanto de casos como de controles cumplió con los criterios de calidad requeridos para el estudio. Las bandas observadas mostraron un peso molecular mayor a 23 000 pb.

Reacción en cadena de polimerasa

Los productos de amplificación para el análisis de las mutaciones 2282del4 y R501X correspondieron a lo reportado, (600pb y 360pb respectivamente) (27). Se corroboró por visualización de los productos en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de Etidio. (Fig. 2)



Figura 2 : Análisis de productos de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. De izquierda a derecha carril I: marcador de pares de bases (mpb), carriles 2 a 6 ADN de pacientes (P1 a P5). a) mutación 2282del4 (600pb) y b) mutación R501X (360 pb)

Análisis de restricción

Una vez visualizados los productos de PCR en geles de Agarosa se incubaron con enzimas de restricción, las cuales cortaron los productos en sitios de nucleótidos específicos.

El patrón de bandeo para cada genotipo es variable, de tal forma que para un homocigoto sano XX se observa una sola banda de 550 pb, para el homocigoto mutado una banda de 300 y 250 pb, y para el heterocigoto se esperaban 3 bandas de 550, 300 y/o 250 pb. En nuestro estudio no se identificaron alelos mutados (Fig. 3)

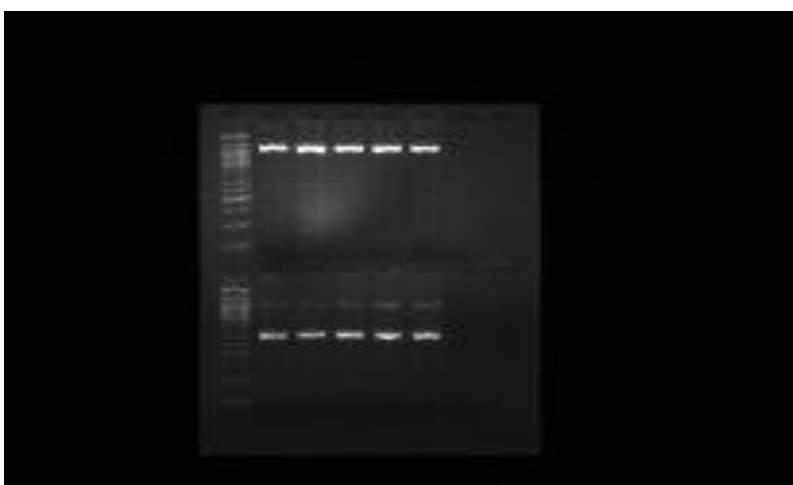


Figura 3 : gel de agarosa al 2 % en el cual se observan los productos de PCR obtenidos con primers para delección (2282del4) en la hilera superior y para la mutación R501X en la hilera inferior, en ambas hileras solo se obtuvieron bandas con el mismo número de bases

Análisis de secuenciación.

El análisis de secuenciación confirmó los hallazgos observados en el análisis de las mutaciones mediante enzimas de restricción, no se identificaron casos portadores de estas mutaciones (Fig. 4). Sin embargo al realizar el análisis comparativo de las secuencias obtenidas con las reportadas en bases de datos públicas, se identificaron cuatro cambios en la secuencia de DNA de pacientes y controles que ya han sido reportados: rs74129461, rs3120655, rs3120654 y rs11584340. Los polimorfismos se encontraron con una distribución de sus genotipos en HWE. Los SNPs rs3120654 y rs3120655 no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el primer polimorfismo (rs74129461) hay un cambio en el triplete que codifica para el aminoácido ácido glutámico (GAA) en el cual se sustituye la guanina (G) por una adenina (A), con lo cual el triplete (AAA) codifica para lisina /Fig. 5). En el segundo polimorfismo (rs3120655) hay un cambio en el triplete que codifica para treonina (ACT) en el cual se sustituye la citosina (C) por una timina (T), con lo cual el triplete (ATT) codifica para isoleucina. En el tercer polimorfismo (rs3120654) hay un cambio en el triplete que codifica para el aminoácido serina (TCC) en el cual se sustituye la citocina(C) por una adenina (A), con lo cual el triplete (TAC) codifica para tirosina. En el cuarto polimorfismo hay un cambio en el triplete que codifica para el aminoácido prolina (CCT) en el cual se sustituye la citocina(C) por tirosina (T), con lo cual el triplete (TCT) codifica para serina.

Mutación R501X

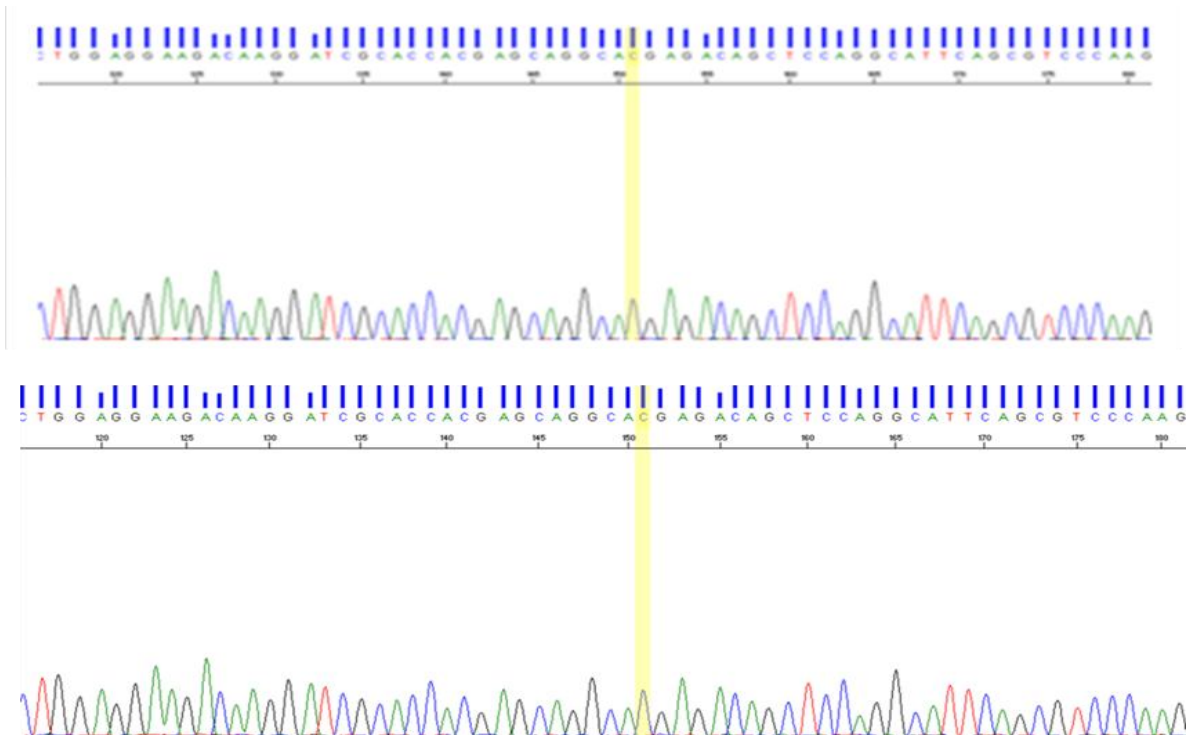


Figura 4: Electroferograma de un paciente homocigoto CC en la posición donde se esperaba la presencia de la mutación R501X (se ilustra con una banda amarilla)

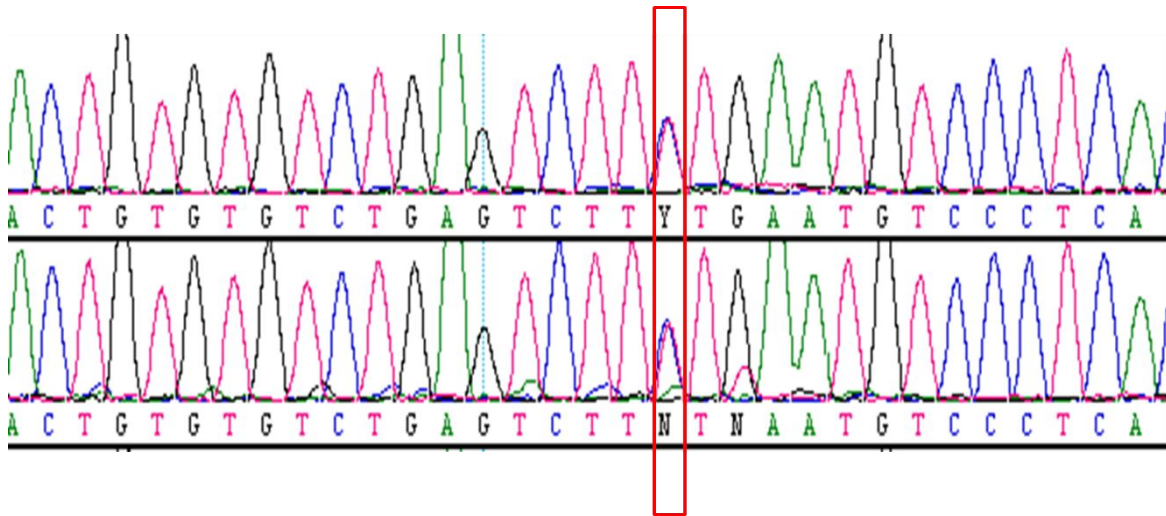


Figura 5: Ejemplo de polimorfismos aledaños al sitio de mutaciones, que se buscaban como objetivo primario en este estudio, identificados al analizar el resto de la secuencias: Rs 74129461.

FRECUENCIAS DE POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS ENTRE CASOS Y CONTROLES

La distribución de los genotipos de los SNPs tanto en casos como en controles se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg (HWE). El rs 11584340, sólo se encontró en HWE en casos pero no en controles.

El análisis comparativo de los 4 SNPs evaluados no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos o genotipos entre casos y controles (Tabla 4).

En los pacientes que mostraron el polimorfismo rs74129461 se obtuvo un valor de P 0.09097 al comparar los genotipos ancestral contra heterocigoto, sin embargo los OR obtenidos son altos (genotipo AA vs GA, OR:6 [0.671-53.681], AA vs GG, OR:1.5 [0.055-40.633]) los intervalos de confianza también se observan muy amplios.

Tabla 4: Estudio de asociación de los SNPs rs11584340 y rs 74129461

SNP	Alelos/Genotipos		Casos No (%)	Controles No (%)	OR	IC	P
Rs11584340			N:18	N:4			
	Alelos	T	20	2			
		C	16	6	0.264	[0.047-1.504]	0.24044
	Genotipos	TT	5 (27.7%)	0			
		CT	10 (55.5%)	2 (50%)			
		CC	3(16.6%)	2(50%)			
		TT vs CT			3.333	[0.319-34.830]	0.30141
		TT vs CC			7.857	[0.284-217.1]	0.11385
TT vs CT+CC				5	[0.492-50.831]	0.15016	
Rs74129461			N:15	N:7			
	Alelos	A	16	9			
		G	14	5	0.635	[0-172-2.347]	0.49452
	Genotipo	AA	2(13.33%)	3(42.8%)			
		GA	12 (80%)	3(42.8%)			
		GG	1 (6.6%)	1 (14.3%)			
		AA vs GA			6	[0.671-53.681]	0.09097
		AA vs GG			1.5	[0-055-40.633]	0.80915
AA vs GA+GG				4.875	[0.590-40.258]	0.12378	

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En la tabla 5 se describen las características clínicas de los pacientes con DA, y su genotipo.

Tabla 5: Características clínicas y genéticas de pacientes con DA (ND= No determinado)									
Pac	Edad de inicio	IgE al realizar dx (U/ml)	Sensibilidad En P.C	Asma y severidad de la misma	Gravedad de DA	Polimorfismos / genotipo			
						rs74129 461	rs31206 55	rs31206 54	rs11584 340
1	3	276	P++/DPT+++	L.I.	Mod.	GA	CC	CC	CT
2	10	76.9	P++/DPT+++	No	Leve	GA	CC	CC	CT
3	26	2100	DPF++	No	Mod.	GA	CC	CC	ND
4	2	201	DPF++++	No	Leve	GA	CC	CC	CT
5	4	1500	No	No	Leve	GA	CC	CC	CT
6	2	309	P+++/ DPT+++	L.P.	Leve	ND	ND	ND	CT
7	2	991	No	No	Mod.	ND	ND	ND	CC
8	42	466	P+++/DPT y DPF +++	No	Mod.	AA	CC	CC	TT
9	4	221	P++/DPF+++	No	Leve	ND	ND	ND	TT
10	2	240	P++/DPF++	L.I.	Leve	AA	CC	CC	TT
11	12	14700	DPT++++/DPF+++	No	Leve	GA	CC	CC	CT
12	3	631	P++/DPT+++	L.I.	Leve	GG	CC	CC	CC
13	6m	20700	No	L.I.	Mod.	GA	CC	CC	CT
14	8	1820	P+	No	Leve	GA	CC	CC	CT
15	24	2200	No	L.I.	Leve	ND	ND	ND	TT
16	6	23500	No	No	Mod.	GA	CC	CC	CT
17	3m	529	No	L.I.	Leve	GA	CC	CC	TT
18	4m	4720	P+++	No	Mod.	GA	CT	CA	ND
19	7	193	P++/DPT++	L.I.	Mod.	ND	ND	ND	CT
20	2	10800	DPT y DPF +++	No	Mod.	ND	ND	ND	CC
21	3	2000	P++++/DPF+++ +	No	Leve	GA	CC	CC	ND

Se realizó también un análisis de regresión logística para determinar si existía una asociación entre los genotipos, con las variables clínicas. No se identificó correlación entre el rs 11584340 con edad de inicio de la enfermedad, niveles séricos de IgE, gravedad de la enfermedad o presencia y gravedad de asma (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis de correlación entre el genotipo y variables clínicas							
Variable		Rs11584340/ Genotipo CT			Rs74129461/ Genotipo GA		
		OR	IC	P	OR	IC	P
Edad de inicio	<1 año	1.127	[0.029-44.084]	0.949	1.039 ⁸		0.998
	1-5 años	6.216 ⁻⁹	[3.28 ¹⁰ -1.176 ⁷]	0	2		0.676
	5-10 años	2.769		1	1.039 ⁸		0.998
Niveles séricos de IgE U/ml	<80	8.195 ⁷		0.998	1.390 ⁷		0.998
	80-200	8.196 ⁷		0.998			
Sensibilidad en pruebas cutáneas	Negativa	0.750	[0.32-17.506]	0.858	1.385 ⁸		0.997
	(+) solo a ácaros	0.5	[0.019-12.848]	0.676	1.385 ⁸		0.998
	(+) solo a polvo	5.463 ⁷		0.998	1.385 ⁸		0.998
Presencia y gravedad de asma	No	3.732 ⁸		0.998	3	[0.140-4.262]	0.482
	Leve intermitente	3.732 ⁸		0.998			
Gravedad de DA	Leve	3	[0.199-45.244]	0.427	1.4	[0.070-28.12]	0.826

En términos clínicos los pacientes estudiados fueron mujeres en su mayoría (61.9%) y el resto hombres (38.09%), Sin embargo las mujeres tuvieron peor evolución ya que el 61.53 % presentó DA moderada, comparado con solo 12.5 % de hombres que tuvieron este nivel de severidad. Cabe señalar que solo se documentaron 2 grados de severidad de DA: leve y moderada, sin embargo los pacientes estudiados, en su mayoría ya conocidos y tratados por el servicio de Alergia e Inmunología Clínica, tenían terapia farmacológica que incluyó antihistamínicos, esteroides tópicos y sistémicos en algunos casos, una minoría incluso recibió terapia con anticuerpos monoclonales anti Ig E (omalizumab) en los meses previos por lo que prácticamente en todos los casos tratados se pudo observar una disminución del SCORAD.

Los hombres también mostraron inicio más tardío de síntomas (50 % después de los 5 años de edad), sin casos de asma en el 75 % de los casos, mientras que en las mujeres el 53.8 % inició síntomas antes del año de edad, se asoció a asma en el 46.15 % de los casos, y a diferencia de los hombres, llegó a ser de mayor severidad (leve persistente) en el 7.69 % de los casos.

Solo en 30.76 % de las mujeres fueron negativas a las pruebas cutáneas, mientras que en los hombres lo fue el 37.5 %, sin embargo los hombres positivos en las pruebas cutáneas fueron muy reactivos (>+++) en 80 % de los casos, comparado con el 53.84 % de las mujeres.

Las mujeres también mostraron los niveles más altos de IgE, hallando cifras de IgE mayores de 2000 hasta en el 53.84 %, con una IgE promedio de 6803.15 UI/ml, mientras que en el grupo de varones solo el 12.5 % tuvo niveles mayores de 2000 UI/ml, con cifras promedio de IgE, en estos pacientes, de 2441.6 UI/ml.

A menor severidad de DA los pacientes tuvieron menor asociación con asma (58.33% no asociados), y en los asociados solo llegó a ser leve persistente en 8.3 % de los casos, sin mayor severidad. El alérgeno predominante en las pruebas cutáneas fue Dermatophagoydes (58.3%). Los casos con mayor severidad de DA, no mostraron correlación con mayor severidad de asma, ya que ésta solo se documentó en 33.3 % de los casos, todos ellos leve intermitente.

Los pacientes que iniciaron más tempranamente síntomas de DA (<1 año) presentaron mayor severidad de DA (66.6 % tuvieron DA moderada), y el 66.6 % se asociaron a asma, mayor que lo mostrado por los otros grupos de edad.

DISCUSION

A diferencia de lo que se ha reportado en poblaciones caucásicas, ninguno de los pacientes evaluados fue portador de estas mutaciones. Aunque el presente estudio observa una importante limitación por el tamaño del mismo, nuestros datos no difieren significativamente de lo reportado para otras poblaciones. De hecho en un estudio reciente de población croata, estudiando a 423 niños con entidades alérgicas, se identificó una frecuencia del 0.1 % y 1 % para las mutaciones R501x y 2282del4, respectivamente (Sabolic et al 2012). En otro estudio realizado en pacientes asiáticos, donde se incluyeron 103 casos, se identificaron nuevas variantes, pero no la R501X.

El presente estudio representa el primer análisis de pacientes mexicanos con DA, se requiere del análisis de una población mayor para determinar las contribuciones de polimorfismos y mutaciones del gen de la *FLG* en la patogénesis de DA.

En el presente estudio no se documentaron, tanto en casos, como en controles la presencia de las mutaciones R501X y 2282de4. Es factible que esta situación pueda asociarse a que estas mutaciones predominan en los estudios de pacientes caucásicos con alteraciones de la piel como DA, ictiosis vulgaris y susceptibilidad a infecciones cutáneas, pero no son predominantes en los estudios en asiáticos, con los cuales nuestra población comparte una proporción mayor del genoma, sin embargo no hay tantos estudios en asiáticos, como tampoco los hay en latinoamericanos. Por otra parte la muestra estudiada es pequeña, lo cual determina poco poder estadístico de los resultados de este estudio, además de que al incluir las secuencias para hacer el análisis se redujo aún más el tamaño de la muestra por las complicaciones asociadas a la metodología, como la obtención de secuencias muy cortas que no incluían los sitios de los nucleótidos específicos para el análisis.

En algunos pacientes, sin mutaciones detectables (R501x y 2282del4) han tenido disminución de la expresión de FLG, por inmunohistoquímica, lo que indica que otras mutaciones y/o en otros genes pueden estar sin identificar.

Los polimorfismos reportados en nuestro estudio pueden ser, a futuro, sujetos de estudio en investigaciones posteriores, con poblaciones mayores, con lo cual podremos determinar si son predominantes en nuestra población y que puedan utilizarse como marcadores genéticos para identificar a pacientes potenciales.

CONCLUSIONES

Los datos derivados de este estudio sugieren que:

- La prevalencia de la DA es mayor en el género femenino.
- Existe una asociación entre la gravedad de la DA y el género, ya que ésta fue mayor en casos femeninos.
- La población masculina presenta una enfermedad de inicio tardío (>5 años de edad).
- Las mutaciones R501X y 2282del4 no se identificaron en los casos estudiados, sin embargo dado el tamaño de la muestra no se puede concluir que no se presentan en nuestra población.
- Otros SNPs en FLG o en genes candidato deben ser investigados

CRONOGRAMA

	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept	Oct	Nov	Dic.	Enero	Febrero
Presentación al comité de investigación para autorización	x										
Selección de Pacientes	X	X									
Realización de Cuestionario		X	X	X	X	X	X				
Toma de muestras y extracción de ADN		X	X	X	X	X	X				
Análisis molecular						X	X	X	X	X	X
Análisis de resultados									X	X	X
Escritura de la tesis.										X	X

BIBLIOGRAFIA

- (1) Adkinson NF, Busse WW, Bochner BS et al Middleton's Allergy Principles and practice, Seventh Edition, Mosby Elsevier, Philadelphia USA 2009; pp: 1083-1104
- (2) Martorell A, Bosch M, Inmunología clínica y alergología, pp: 23- 32
- (3) Bieber T, Atopic Dermatitis, N Engl J M 2008; 358: 14: 1483- 94
- (4) Laguna C, Dilata J, Dermatitis atópica del adulto, Med Cutan Iber Lat Am, 2006; 34 (1): 5-10.
- (5) Ong P. Y., Leung D, The infectious aspects of Atopic Dermatitis, Immunol Allergy Clin N Am 30 (2010) 309-321.
- (6) Méndez de I. J, Alergia Enfermedad multisistémica, Fundamentos básicos y clínicos, Editorial Médica Panamericana, 1era, edición, México D.F 2008; pp: 235-241
- (7) Iniesta R, Guió E, Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos, Gac. Sanit. 2005; 19 (4): 333-41
- (8) Baye T, Martin L, Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders, J Allergy Clin Immunol 2010; 126:425-36.
- (9) M. Twyman R, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques- An Overview, Encyclopedia Diagnostic Genomics and Proteomics 2005; 1202-7
- (10) Estrategias de descubrimiento e identificación de SNPs, Genoma España, pp: 34-46
- (11) Mogica M, Macías W. A, Lineamientos del Colegio Mexicano de Inmunología Clínica y Alergia AC, para el diagnóstico y tratamiento de la dermatitis atópica, Rev Alergia Mex 2006; 53 (suplemento): S3-S17
- (12) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. Nat Genet. 2012 Oct 7;44(11):1222-6.
- (13) Morar N, Willis-Owen S, The genetics of atopic dermatitis, J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 24-34
- (14) Baurecht H, Irvine A, Novak N, Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data ; J Allergy Clin Immunol 2007; 120:1406-12.
- (15) Elias P, Schmuth M, Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis, Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2009 October; 9 (5): 437-446
- (16) O'Regan G, Kemperman P, Raman profiles of the stratum corneum define 3 filaggrin genotype-determined atopic dermatitis endophenotypes ,J Allergy Clin Immunol 2010; 126: 574-80
- (17) Elias P.M, Hatano Y, Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms, J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 1337-43

- (18) Regan G.M., Sandilands A, Filaggrin in atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 689-93
- (19) Irvine A, Mc Lean I, Leung D, Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases, *N Engl J M*, 2011; 365: 1315-27
- (20) Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, et al Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: Robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123 (6): 1361-70
- (21) Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int.* 2011 Mar;60(1):1-9.
- (22) O'Regan G, Campbell L., Chromosome 11q13.5 variant associated with childhood eczema: An effect supplementary to filaggrin mutations, *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 170-4
- (23) Nemoto- Hasebe, Clinical severity correlates with impaired barrier function in filaggrin-related eczema, *J investigative dermatol*, 01 march 2009, 129 (3): 682-9
- (24) Gao P, Rafaels N, Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum, *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 507-13
- (25) Barnes K, An update on the genetics of atopic dermatitis: Scratching the surface in 2009, *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 16-29
- (26) Leung D Y, Our evolving understanding of the functional role of filaggrin in atopic dermatitis, *J of Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 494-5
- (27) Henderson J, Northstone K, Lee Simon P, The burden of disease associated with filaggrin mutations: A population – based, longitudinal birth cohort study , *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 872 -7.
- (28) Weidinger S, O'Sullivan M, Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children, *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1203-9.
- (29) Gruber R, Janecke A, Fauth C, Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris, *European J Human Genetics* (2007) 15, 179-184

ANEXOS

RECURSOS MATERIALES

Hojas blancas para realizar las tablas de condensación de datos

1 Paquete de bolígrafos

Computadora con programa SPSS para análisis estadístico , Impresora

Las pruebas cutáneas de sensibilidad alérgica se realizaron rutinariamente como parte del protocolo diagnóstico de pacientes con enfermedad alérgica, por lo que no se requirieron recursos adicionales para su realización

Los reactivos para la identificación de mutaciones del gen de Filagrina fueron proporcionados por Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica)

RECURSOS HUMANOS

Investigador Principal: Dr. Juan José Olivar Vázquez

Investigadores asociados: Dr. Javier Gómez Vera, Dra. María Elena Ramírez del Pozo, Dra. Silvia Jiménez Morales

RECURSOS FINANCIEROS

El apoyo financiero para la realización del análisis de las mutaciones del gen de la filagrina fue otorgado, por el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del INMEGEN



ANEXOS

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente hago constar que mi hijo (a), mi conyuge y yo estamos de acuerdo en participar en el proyecto de investigación. **Análisis de polimorfismos en el gen de la Filagrina en pacientes con dermatitis atópica.** A realizarse en el servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional ISSSTE Lic. Adolfo López Mateos

Estamos enterados de que nuestra participación en el estudio consistirá en responder un cuestionario sobre antecedentes de la enfermedad y en donar una muestra de sangre del paciente y de un familiar consanguíneo en primer grado para poder analizarse.

LA muestra de sangre se tomara de una vena del brazo, con todos los requisitos de seguridad e higiene, con material nuevo y por personal calificado, lo cual no representa riesgo para nosotros, excepto el de la formación de un hematoma en el sitio de punción, mismo que desaparecerá en el transcurso de días

La información obtenida del análisis de las muestras y la información obtenida por el cuestionario son de uso confidencial y será utilizada por los investigadores en el desarrollo del trabajo de investigación

Nuestra participación es voluntaria, no implica pago o alguna forma de retribución y tenemos la facultad de no continuar en este estudio si así lo decidimos

Hemos leído la información escrita y nuestras preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Nombre y firma del padre o tutor (si es menor de edad) Firma del paciente

Nombre y firma del Investigador Firma de un testigo

México D.F, a de de 2010

Cuestionario

- Nombre:
- Clave:
- Sexo: Masculino () Femenino ()
- Edad:
- Edad de inicio de síntomas cutáneos:
- Edad de diagnóstico:
- Coexistencia con otras enfermedades alérgicas:
 - Asma () Rinitis Alérgica () Alergia a alimentos ()
 - Alergia a medicamentos () Ninguna ()
- Antecedentes familiares
 - Asma () Rinitis Alérgica () Alergia a alimentos ()
 - Dermatitis atópica () Alergia a medicamentos () Ninguna ()
- Tratamiento al momento del estudio:
 - Inmunoterapia específica ()
 - Esteroides tópicos ()
 - Antihistamínicos
 - Inhibidores de calcineurina ()
 - Anticuerpos anti IgE (omalizumab) ()

Niveles séricos de IgE

Niveles al diagnóstico y/o inicio del tratamiento (UI) :

Niveles actuales (UI):

Reactividad en pruebas cutáneas:

Tamaño de roncha: + <10 mm, ++ = 10-20 mm, +++ = 20-30 mm, ++++ > 30 mm

Negativo ()

Polvo: + (), ++ (), +++ (), ++++ ()

Acaros (DPT o DPF): + (), ++ (), +++ (), ++++ ()

Si tiene diagnóstico de asma o presenta signos y síntomas de asma:

FEV1:

> 80% () 60-80 % () < 60 % ()

Síntomas diurnos (días /semana):

- < 2/semana () > 2/semana, pero no diario ()
- diarios, afectan sueño y actividad diaria () continuos, crisis frecuente ()

Síntomas nocturnos:

< 2/ mes () >2/mes, pero < 1 semana () >1/semana () Frecuentes ()

**SCORAD
EUROPEAN TASK FORCE
ON ATOPIC DERMATITIS**

INSTITUTION

PHYSICIAN

Last Name First Name

Date of Birth: DD/MM/YY

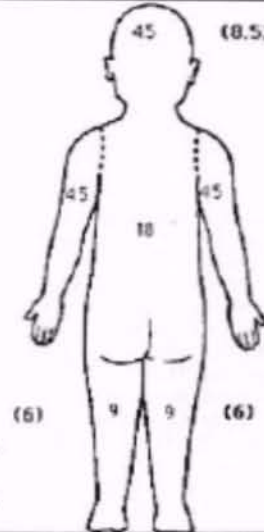
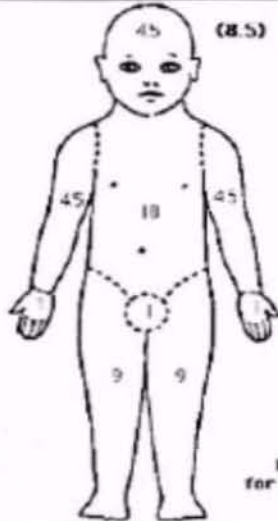
Date of Visit:

Topical Steroid used:

Potency (brand name)

Amount / Month (6)

Number of flares / Month



Figures in parentheses for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Edema/Population	
Crusting/ooze	
Excoration	
Lichenification	
Dryness	

MEANS OF CALCULATION

INTENSITY (IDS)
(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 (0 to 10)

SLEEP LOSS (0 to 10)

0 10

TREATMENT:

REMARKS: