



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

TESIS DOCTORAL

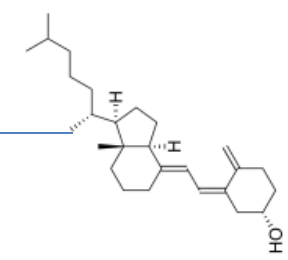
**Determinación de los polimorfismos del receptor
de la Vitamina D en niños asmáticos alérgicos a
los ácaros del polvo**

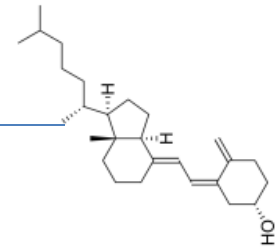
Sara Ferrer Suay

**Directores: Eulalia Alonso Iglesias
Miguel Tortajada Girbes
Pilar Codoñer Franch**

Julio, 2021







VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

TESIS DOCTORAL

**Determinación de los polimorfismos del receptor
de la Vitamina D en niños asmáticos alérgicos a
los ácaros del polvo**

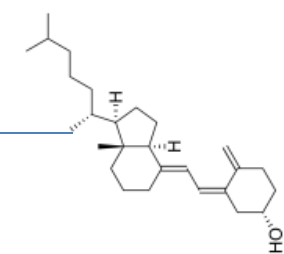
Sara Ferrer Suay

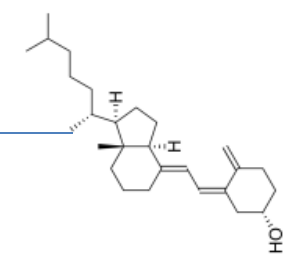
Directores: Eulalia Alonso Iglesias

Miguel Tortajada Girbes

Pilar Codoñer Franch

Tutor: Guillermo Sáez Tormo

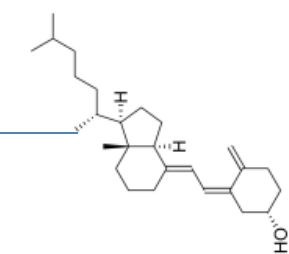


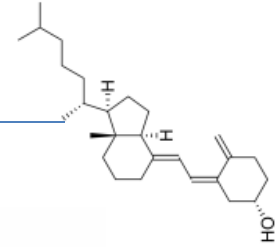


“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry (El principito)







VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Dña Eulalia Alonso Iglesias, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València.

D Miguel Tortajada Girbes, Profesor Asociado del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València y Jefe de Sección del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

Dña Pilar Codoñer Franch, Catedrática del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València y Jefa del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

CERTIFICAN:

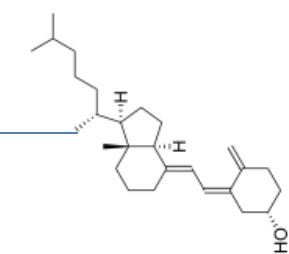
Que la presente memoria, titulada “Determinación de los polimorfismos del receptor de la Vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña Sara Ferrer Suay, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología de la Universitat de València.

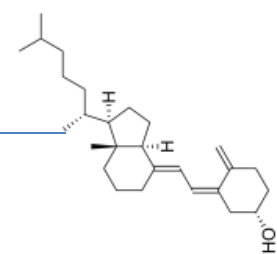
Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 20 de julio de 2021.

Fdo. E. Alonso-Iglesias

Fdo. M. Tortajada-Girbes

Fdo. P. Codoñer-Franch





Agradecimientos

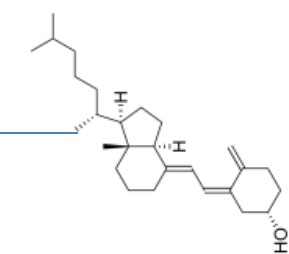
He tenido la suerte de poder contar con la ayuda de tres directores de muy alta reputación y nivel académico. Por eso quiero agradecer este trabajo principalmente a ellos, Eulalia Alonso Iglesias, Miguel Tortajada Girbes y Pilar Codoñer Franch, por su confianza y apoyo en todo momento y por las horas (que son muchas) invertidas en él; tanto en la orientación del trabajo como en consejos y aclaraciones. Gracias por vuestros conocimientos y apoyo, los cuales me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba. Quiero agradecer también a Joaquín Carrasco Luna por su paciencia y su constante ayuda en el manejo de la base de datos. Ha sido una tesis complicada porque coincidió en el tiempo con varias mudanzas y varios cambios de trabajo y siempre habéis estado ayudándome y apoyándome. Llegó a mí justo en un momento de cambio y crecimiento personal tanto como profesional como familiar muy grande y estoy muy orgullosa de lo que hemos conseguido entre todos. Si me lo permite el resto, quiero agradeceréte en especial a ti Laly por tu más sincera disposición y tu amistad, no hay duda de que sin ti esto no habría sido posible.

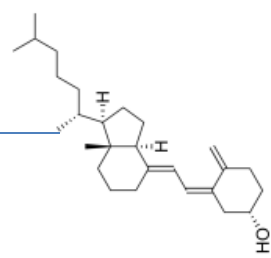
Agradecer a mi familia es algo que hemos de dar por hecho pero en mi caso es excepcionalmente verdad. La ayuda de mis padres como de mi hermana en mis inicios son un reflejo de todo lo que soy ahora. Gracias teta por estar siempre ahí y acompañarme en todo desde el primer momento. Pero todo lo que he conseguido nunca habría sido posible sin ti Pascual, por estar a mi lado en mis días interminables de estudio y trabajo siempre entendiéndome y ayudándome a sobrellevarlo todo de la mejor manera posible y sobretodo quien ahora me acompaña en la crianza de nuestros tres hijos.

En especial este trabajo se lo dedico a ellos. **Alex, Vega y Leia** sois más de lo que alguna vez imagine.

Muchas gracias

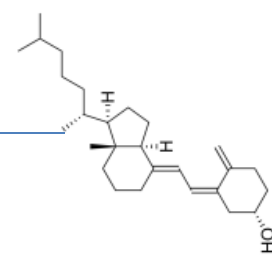






ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Asma.....	19
1.1.1 Definición.....	19
1.1.2 Prevalencia.....	20
1.1.3 Fisiopatogénia.....	22
1.1.4 Relación entre estrés oxidativo y asma.....	26
1.1.5 Diagnóstico.....	29
1.1.6 Alergia a los ácaros del polvo.....	32
1.2 Vitamina D.....	34
1.2.1 Generalidades.....	34
1.2.2 Metabolismo.....	37
1.2.3 Mecanismo de acción.....	39
1.2.4 Efecto de la vitamina D sobre el sistema inmunitario.....	41
1.2.5 Relación entre vitamina D y asma.....	47
1.2.6 Relación entre la Vitamina D, asma y marcadores de inflamación y estrés oxidativo/nitrosativo y su influencia en enfermedades cardiovasculares y degenerativas.....	49
1.2.7 Receptor de la vitamina D (VDR).....	50
1.2.8 Polimorfismos en el receptor de la vitamina D (VDR).....	54
1.3 Justificación.....	57
1.4 Hipótesis.....	58
1.5 Objetivos.....	58
1.5.1 Objetivo principal.....	58
1.5.2 Objetivos específicos.....	59
2. METODOLOGÍA.....	60
2.1 Diseño.....	62
2.2 Población de estudio.....	62
2.2.1 Niños asmáticos.....	63
2.2.2 Niños control.....	64
2.3 Variables de estudio.....	65
2.3.1 Parámetros clínicos.....	65
2.3.1.1 Analítica clínica.....	66
2.3.2 Análisis experimentales.....	68
2.4 Análisis estadístico.....	72
3. RESULTADOS.....	76
3.1 Análisis comparativo entre niños asmáticos y controles de los parámetros incluidos en el estudio..	78
3.2 Análisis comparativo entre niños asmáticos y controles de las frecuencias de los SNPs de VDR evaluados en el estudio.....	79
3.3 Estudio de asociación cuantitativo.....	82
3.4 Estudio de asociación cualitativo.....	87
3.5 Análisis de haplotipos.....	92
4. DISCUSIÓN.....	94
5. CONCLUSIONES.....	108
6. BIBLIOGRAFÍA.....	111
7. ANEXOS.....	127

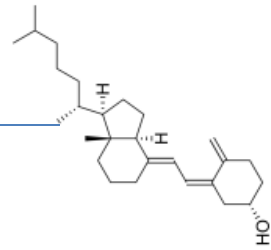


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatología de la respuesta alérgica. Sensibilización de las células tras estímulo por un Ag inhalado.....	25
Figura 2: Fisiopatología de la respuesta alérgica. Reexposición al Ag inhalado y la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios.....	26
Figura 3. Algoritmo diagnóstico de asma.....	31
Figura 4: Países con raquitismo por deficiencia de vitamina D.....	36
Figura 5. Principales formas representativas de la vitamina D.....	38
Figura 6: Síntesis y metabolismo de la vitamina D.....	39
Figura 7: Regulación de la inmunidad adaptativa por la 1,25 dihidroxivitamina D.....	43
Figura 8: Efectos de la vitamina D en células del sistema inmunitario.....	45
Figura 9: Principales mecanismos involucrados en las acciones genómicas y no genómicas de la 1,25 dihidroxivitamina D.....	52
Figura 10: Modelo de los efectos transcripcionales de la 1,25 dihidroxivitamina D.....	53
Figura 11: Organización genómica de VDR.....	55
Figura 12. Polimorfismos del receptor VDR más relacionados con asma.....	55
Figura 13. Generación de 8-isoprostano y malondialdehído (MDA).....	69
Figura 14: Esquema del procedimiento seguido para la cuantificación de Nitrato + Nitrito (NO _x) como indicadores de la producción de NO.....	71
Figura 15: Imagen ilustrativa de la obtención de los datos de discriminación alélica (derecha) y genotipado (izquierda).....	72
Figura 16: Programa estadístico SNPStats.....	75
Figura 17: Genotipado SNP ApaI.....	80
Figura 18: Genotipado SNP TaqI.....	80
Figura 19: Genotipado SNP FokI.....	81
Figura 20: Discriminación alélica.....	81

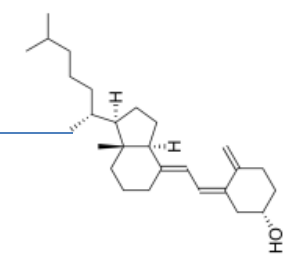
ÍNDICE DE TABLAS

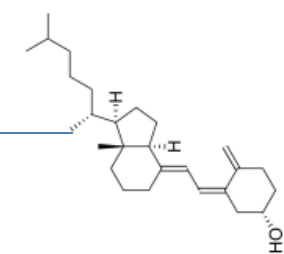
Tabla 1: Características antropométricas y analíticas de las poblaciones de estudio.....	78
Tabla 2: Frecuencia de genotipos de ApaI, TaqI y FokI en las poblaciones alérgica y control.....	82
Tabla 3. Asociación cuantitativa del SNP rs7975232 ApaI (C>A) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	84
Tabla 4. Asociación cuantitativa del SNP rs731236 TaqI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	85
Tabla 5. Asociación cuantitativa del SNP rs2228570 FokI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	86
Tabla 6: Valores umbrales establecidos para cada una de las variables de estudio.....	87
Tabla 7. Asociación cualitativa del SNP rs7975232 ApaI (C>A) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	89
Tabla 8. Asociación cualitativa del SNP rs731236 TaqI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	90
Tabla 9. Asociación cualitativa del SNP rs2228570 FokI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población.....	91
Tabla 10: Análisis de haplotipos.....	93



ABREVIATURAS

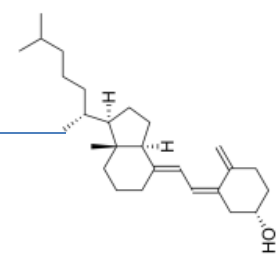
Ag	Antígeno
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AP	Atención Primaria
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPH II o MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II o complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
ECRHS	Estudio Europeo del Asma
EIA	Enzimoimmuno ensayo
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FEV1 o VEMS	Volumen espirado máximo en el primer segundo de espiración forzada
GEMA	Guía Española para el Manejo del Asma
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito macrófago
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HRB	Hiperrespuesta bronquial
HWE	Test del equilibrio de Hardy-Weinberg
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LDH	Lactato deshidrogenasa
NADPH	Hidrofosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitritos
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAF	Factor activador de plaquetas
PEF	Pico flujo espiratorio
PCR	proteína C reactiva
PTH	Hormona paratiroidea
PRR	Receptores de reconocimiento de PAMP
RBCs	Glóbulos rojos
ROS	Especies reactivas del oxígeno
ROS/RNS	Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Temperatura Ambiente
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VDBP	Proteína de unión a vitamina D
VDR elements	Elementos de respuesta a la vitamina D
VDR	Receptor de la vitamina D
WBCs	Glóbulos blancos
8-iso-PGF ₂ α	8-isoprostaglandina F ₂ α





RESUMEN





RESUMEN

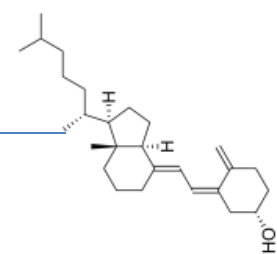
Durante los primeros años de vida, una alta proporción de niños, padecen síntomas respiratorios que pueden ser etiquetados de asma. La definición de asma infantil, mayormente aceptada por la comunidad científica, es la de episodios repetidos de «sibilancias recurrentes y/o tos persistente en una situación en la que el asma es probable y se han descartado otras enfermedades». Sin embargo, se trata de síntomas que pueden confundirse con otro tipo de patologías respiratorias que pueden llevar al retraso en el diagnóstico y por lo tanto al tratamiento. De ahí la necesidad de buscar alternativas diagnósticas que nos permitan detectar los inicios tempranos de esta enfermedad y poder actuar en consecuencia.

En el desarrollo de un gran número de enfermedades pulmonares, junto con la inflamación y el consiguiente remodelado que tiene lugar en las vías aéreas, se genera un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes, denominado estrés oxidativo. Este fenómeno se ha implicado tanto en la patogenia como en la cronificación del asma. Por ello, en nuestro estudio, nos planteamos evaluar marcadores tanto de la producción de NO como de estrés oxidativo para caracterizar el daño al que se ven sometidas las células durante un proceso asmático.

El papel que puede tener la vitamina D en el asma puede ser a través de su receptor (VDR) en células implicadas en la reacción inmunitaria tales como células presentadoras de antígeno y linfocitos T activados, en su efecto inmunomodulador y en el efecto directo sobre el músculo liso bronquial.

Ya que la vitamina D es un modulador importante de la respuesta del sistema inmunitario, y el VDR se localiza en el cromosoma 12q, cerca de una región vinculada al asma, cabría esperar que variantes en genes de la vía de la vitamina D puedan afectar el asma y atopia. Además se ha comprobado una clara relación entre el aumento de enfermedades como asma y atopia y una tendencia a la disminución de los niveles circulantes de vitamina D en la población; y los estudios observacionales parecen confirmar que la deficiencia de vitamina D puede contribuir a un aumento de las alergias y el asma.

Numerosos estudios han observado correlaciones inversas entre los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D y, entre otros, enfermedad cardiovascular, lípidos séricos, inflamación y estrés oxidativo. Y está claramente establecido que tanto el estrés oxidativo como la inflamación crónica son eventos primarios de la disfunción endotelial que precede y acompaña a las enfermedades cardiovasculares. El papel protector de la vitamina D en estos eventos podría estar mediado, al menos en parte, por sus efectos constatados en prevenir la liberación de citoquinas proinflamatorias y mediadores de estrés oxidativo por diferentes tipos celulares. Entre ellos las células del sistema inmune.

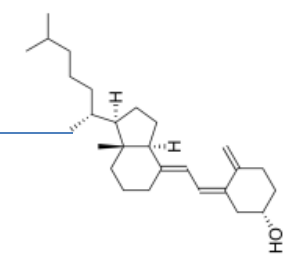


Esta relación es debida a que en la fisiopatología del asma juega un papel importante la inflamación, esta misma inflamación es la implicada en los fenómenos aterotrombóticos que pueden causar un mayor riesgo cardiovascular. Tal asociación es plausible ya que se sabe que el asma está asociada con inflamación sistémica de bajo grado y deterioro de la función pulmonar lo que se ha relacionado con un mayor riesgo cardiovascular.

Por otra parte, se ha visto una relación entre asma y riesgo cardiovascular que puede estar mediada a través de la inflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo generado por la primera. Es bien conocido el efecto que tiene la vitamina D a nivel del sistema inmunológico y el asma. También se ha observado que esta relación lleva asociado un aumento de estrés oxidativo que puede llegar a facilitar la aparición de eventos cardiovasculares aumentando el riesgo de estos. Se ha visto que el asma está relacionada con bajos niveles de vitamina D y a su vez está relacionada con mayor riesgo cardiovascular por lo que debemos de pensar que existe también relación entre este riesgo cardiovascular con los niveles de vitamina D y por lo tanto que polimorfismos en su receptor estén también asociados.

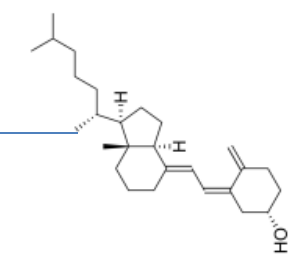
De todo esto se discierne la necesidad de realizar más investigaciones para clarificar la asociación entre polimorfismos de genes implicados en las acciones de la vitamina D, asma y su relación con los parámetros de inflamación y de estrés oxidativo.

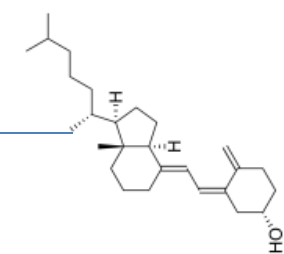
En este estudio se han evaluado parámetros hematológicos (hemograma, incluyendo eosinófilos absolutos); de bioquímica convencional (glucosa, urea, creatinina, colesterol total y sus fracciones HDL, LDL y VLDL, triglicéridos, GOT, GPT, GGT y PCR ultrasensible); y relacionados específicamente con la temática del trabajo como los niveles de inmunoglobulinas totales (IgG, IgA, IgM e IgE) e IgE específica frente a los ácaros del polvo (*D pteronysimus* y *D farinae*). También se han analizado para todos los pacientes los niveles de vitamina D (25-OH vitamina D). Dentro de los parámetros experimentales se analizaron como marcadores inflamatorios IL-6, TNF- α e Interferón- γ y como indicadores de estrés oxidativo/nitrosativo se determinaron nitratos e isoprostanos. En el presente trabajo también se han genotipado las variantes alélicas rs2228570 A>G (FokI), rs7975232 C>A (ApaI) y rs731236 A>G (TaqI) del VDR y se ha evaluado si existe relación entre estos polimorfismos con las variables analizadas.



INTRODUCCIÓN







1. INTRODUCCIÓN

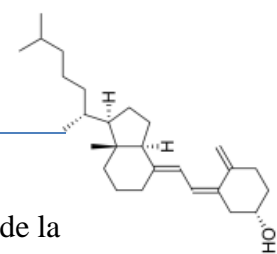
La continua demanda social de mejora de la atención sanitaria, tanto a nivel preventivo como diagnóstico y terapéutico, convierte a la investigación biomédica en una necesidad. En este sentido, la investigación de todos sus ámbitos supone un deber ético, que apela no sólo a las instituciones responsables de la atención sanitaria, sino a cada profesional, a quien se le presupone un continuo afán por un mayor y mejor conocimiento científico. La investigación clínica en la infancia y adolescencia, es necesaria y deseable ya que actuando de una manera precoz en los posibles eventos adversos de salud se puede mejorar la calidad de vida de estos pacientes para que la práctica clínica sea científicamente correcta y éticamente buena. Cabe destacar la importancia sociosanitaria de este proyecto en el marco de la problemática que supone el tratamiento del asma en la población infantil y su prevalencia.

Durante los primeros años de vida, una alta proporción de niños, padecen síntomas respiratorios que pueden ser etiquetados de asma. La definición de asma infantil, mayormente aceptada por la comunidad científica, es la de episodios repetidos de «sibilancias recurrentes y/o tos persistente en una situación en la que el asma es probable y se han descartado otras enfermedades». Sin embargo, se trata de síntomas que pueden confundirse con otro tipo de patologías respiratorias que pueden llevar al retraso en el diagnóstico y por lo tanto al tratamiento. De ahí la necesidad de buscar alternativas diagnósticas que nos permitan detectar los inicios tempranos de esta enfermedad y poder actuar en consecuencia.

1.1 ASMA

1.1.1 Definición

Aunque no existe unanimidad en la definición del asma, es ampliamente aceptada la que propuso en 1995 el National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI) (1), que lo considera como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas. En individuos susceptibles la inflamación produce episodios recurrentes de disnea, sibilancias, opresión torácica y tos, particularmente por la noche o durante la



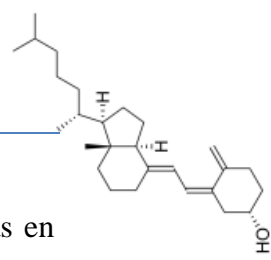
madrugada. Estos episodios se asocian habitualmente a la obstrucción generalizada de la vía aérea aunque de intensidad variable, que suele ser reversible de forma espontánea o con tratamiento. La inflamación también produce un aumento de la hiperreactividad bronquial frente a una amplia variedad de estímulos (2,3).

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia. En su origen intervienen factores genéticos y ambientales, pero hay aspectos etiopatogénicos todavía no dilucidados (4,5). Pero no solo afecta a la infancia, es una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y su prevalencia ha ido aumentando en las últimas décadas (6). Su causa exacta permanece desconocida, como hemos dicho parece tener un origen multifactorial, en complejas interacciones entre múltiples factores genéticos y ambientales (7).

1.1.2 Prevalencia

El asma se ha convertido en una de las enfermedades crónicas más comunes en niños y una causa importante de hospitalización (8). Es la principal enfermedad crónica infantil en países desarrollados con una prevalencia en aumento, afectando al 12% de sujetos menores de 18 años, según el International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) (9). Sin embargo, los niños afectados podrían ser muchos más ya que el asma es una de las enfermedades más infradiagnosticadas e infratratadas debido a sus síntomas, a veces sutiles o que se confunden con otros procesos (6,9). En países industrializados la prevalencia de asma se ha incrementado del 25% al 75% desde 1960. Este gran aumento en la prevalencia del asma se ha visto que podría ser debido a los cambios medioambientales asociados a un estilo de vida urbano (10).

El estudio ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) investigó la prevalencia del asma y su gravedad en niños de 6-7 años y de 13-14 años; se desarrolló en más de 150 áreas de todo el mundo, 9 de ellas en España: Almería, Barcelona, Bilbao, Cádiz, Cartagena, Castellón, Pamplona, Valencia y Valladolid. La prevalencia de síntomas asmáticos en España se encuentra entre las de rango medio-bajo, en comparación a otras zonas del mundo participantes en el estudio ISAAC (9).

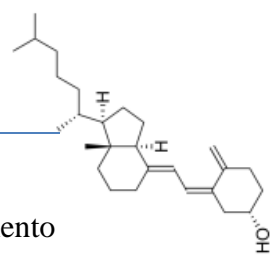


Los resultados del estudio español mostraron una prevalencia de sibilancias en reposo referidas a “alguna vez” del 15,4% en varones frente al 12,6% en mujeres. Se encontraron variaciones geográficas sensibles situándose Castellón entre las zonas con baja prevalencia de síntomas asmáticos, mientras que la zona de Valencia se ubicó entre las de prevalencia media-alta (4).

El Estudio Europeo del Asma (ECRHS) (11) incluye información de 140.000 individuos de 22 países. En este estudio encontramos amplias diferencias geográficas en la prevalencia del asma, con tasas de elevada prevalencia en países de habla inglesa y tasas de baja prevalencia en la región mediterránea y en la Europa del este (1). En España participaron 5 áreas: Albacete, Barcelona, Galdakao, Huelva y Oviedo. En ellas la frecuencia global de síntomas varió entre el 4,9% y el 14,9%. La prevalencia del asma, definida como presencia de hiperreactividad bronquial y síntomas relacionados con el asma, osciló entre el 1% y el 4,7%. Por otra parte, durante los últimos 15 años se ha producido, en la mayoría de los países europeos, un aumento anual del 2-4% en las tasas de prevalencia del asma (12).

Las tasas de mortalidad por asma en España son bajas, 0,12-0,15/100.000 personas y año en el grupo de 5-34 años de edad; sin embargo el progresivo aumento en la prevalencia del asma que vamos encontrando a lo largo de los años y el hecho de ser una causa de muerte evitable hace que se le deba prestar una especial atención a la mejora en su manejo (12).

Dado el carácter multifactorial de esta enfermedad donde interactúan el clima, la geografía y el medio ambiente podría explicar la variación internacional en las tasas de prevalencia de asma; en los países asiáticos se encuentran las tasas más bajas por total de población, variando entre el 2 y el 4%. Por otro lado, las tasas más altas, que oscilan entre el 15 y el 20%, se encuentran en los Estados Unidos, Canadá, Australia y países desarrollados de Europa. Se ha demostrado que en los países latinoamericanos la prevalencia del asma ronda el 5% de la población en general (13).



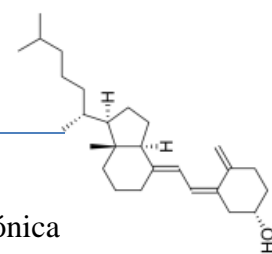
Por lo tanto, la prevalencia del asma en nuestro entorno y el progresivo aumento en la prevalencia, el encontrarse en muchos casos insuficientemente diagnosticada, controlada y tratada y, por ser una enfermedad habitualmente manejada en Atención Primaria (AP), justifican sobradamente la inclusión del asma bronquial en sucesivos estudios para poder definir con más exactitud cuáles son las causas que lo provocan.

1.1.3 Fisiopatogénia

Los síntomas respiratorios relacionados con asma se asocian a un flujo de aire espiratorio variable, es decir, dificultad para expulsar el aire de los pulmones debido a broncoconstricción (estrechamiento de las vías respiratorias), engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias y aumento de la mucosidad (5).

Aunque el espectro clínico del asma es muy variable, la presencia de **inflamación** de la vía respiratoria es una característica patológica común, que está presente siempre aun cuando los síntomas sean temporales o correspondan a episodios aislados y afecta a toda la vía respiratoria, incluida la mucosa nasal. En la mayoría de los pacientes asmáticos, el patrón inflamatorio que caracteriza esta enfermedad incluye un aumento del número de mastocitos, eosinófilos activados, células Natural Killer y linfocitos T helper tipo 2, que son capaces de liberar mediadores que ocasionan los síntomas de la enfermedad (14). Las células estructurales de la vía respiratoria también producen mediadores inflamatorios que facilitan la persistencia de la inflamación por varios mecanismos.

Además de la respuesta inflamatoria, los pacientes asmáticos presentan con frecuencia cambios estructurales característicos, conocidos como **remodelación** de las vías respiratorias que incluyen: engrosamiento de la capa reticular de la membrana basal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial, proliferación y dilatación de los vasos, hiperplasia de las glándulas mucosas e hipersecreción de moco, que se asocian con una progresiva pérdida de la función pulmonar (14). Algunos de estos efectos se relacionan con la gravedad de la enfermedad y pueden conducir a una obstrucción bronquial en ocasiones irreversible. Estos cambios a nivel

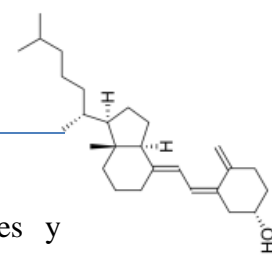


pulmonar pueden ser consecuencia de una respuesta reparadora a la inflamación crónica que ha tenido lugar o pueden aparecer independientemente del proceso inflamatorio.

La **obstrucción bronquial** es la consecuencia común a la que conducen los cambios fisiopatológicos en el asma y el origen de la mayoría de los síntomas asmáticos. Sin embargo, la limitación al flujo aéreo que aparece en estos pacientes y los síntomas que desencadena pueden resolverse de forma espontánea o en respuesta a la medicación e incluso permanecer ausentes (14).

La **hiperrespuesta bronquial (HRB)** es otra de las características que forman parte de la fisiopatología del asma; ocasiona un estrechamiento de las vías respiratorias en respuesta a estímulos que normalmente son inocuos en personas sin asma. Conduce a una limitación variable al flujo aéreo y a la aparición de síntomas intermitentes. La HRB está vinculada con la inflamación y la reparación de las vías respiratorias y puede ser reversible parcialmente con el tratamiento. Se han implicado diversos mecanismos en su aparición. El grado de HRB se correlaciona parcialmente con la gravedad clínica del asma y con marcadores de la inflamación. El tratamiento antiinflamatorio se ha demostrado que mejora el control del asma y reduce la HRB, pero no la elimina totalmente (14). El asma se caracteriza por una gran variabilidad, definida por la variación o fluctuación de los síntomas y de la función pulmonar en el tiempo, incluso en un mismo día y que puede determinarse con la medida diaria del flujo espiratorio máximo (14).

Las células inflamatorias tienen la capacidad para generar especies oxidantes como cualquier célula, ya que este proceso forma parte del metabolismo normal y es fundamental para la homeostasis celular; pero una vez reclutadas en las vías aéreas en la reacción inmune bronquial, los linfocitos, eosinófilos y macrófagos poseen una capacidad excesiva en la producción de oxidantes, y las propias células ciliadas y caliciformes del epitelio poseen también esta característica. Para protegerse contra la exposición a los oxidantes nocivos producidos se ha demostrado que el pulmón tiene un sistema de defensa antioxidante muy bien desarrollado (enzimático y no enzimático), pero por el gran número de agentes inflamatorios prooxidantes es incapaz de mantener



el balance; esto conlleva a la aparición de un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, evento que se denomina **estrés oxidativo del asmático** (13) y que analizaremos en detalle en el presente estudio.

Por lo tanto, entendemos como **asma** aquel síndrome crónico que incluye diversos fenotipos, con etiologías probablemente diferentes, cuyas manifestaciones clínicas son compartidas y que incluyen tos, sibilancias, opresión en el pecho y/o dificultad para respirar. Estos síntomas normalmente ocurren periódicamente, generalmente asociados a algún fenómeno desencadenante, y se manifiestan mediante un estrechamiento de los conductos aéreos.

Los factores que pueden actuar como desencadenantes o pueden agravar los síntomas asmáticos son infecciones víricas, alérgenos domésticos o laborales (por ejemplo, ácaros del polvo doméstico, polen o cucarachas), humo del tabaco, ejercicio y estrés. Estas respuestas suelen ser más probables cuando el asma no está controlada. Algunos medicamentos pueden inducir o desencadenar el asma, por ejemplo, los betabloqueantes y, en algunos pacientes, el ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (5).

Para comprender los mecanismos fisiopatológicos por los que se desencadena el asma alérgica haremos una pequeña introducción sobre la base inmunológica e inflamatoria implicada en el proceso.

Según la clasificación de Gell y Coombs (15), el asma responde a una respuesta de hipersensibilidad tipo I, con una primera etapa de sensibilización que conduce a la adhesión de IgE a la superficie de mastocitos y basófilos, y una segunda etapa de reexposición en la que se produce la degranulación de estos dos tipos celulares (15).

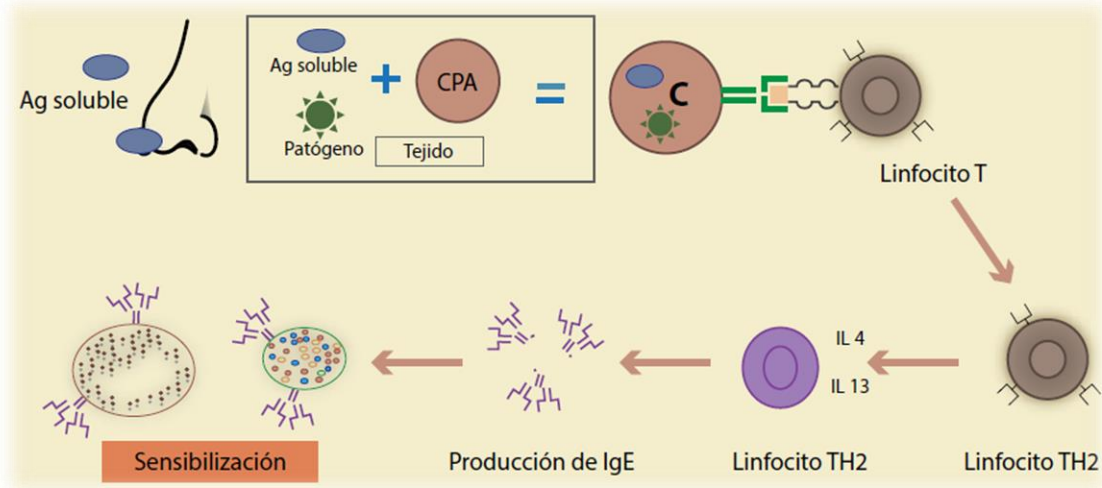
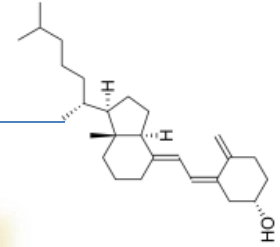
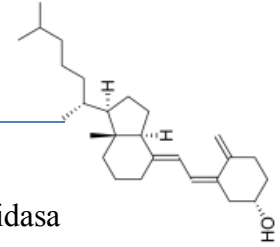


Figura 1: Fisiopatología de la respuesta alérgica. Sensibilización de las células tras estímulo por un antígeno (Ag) inhalado. Tomado de (15).

En la etapa de sensibilización (Figura 1) el antígeno entra en el organismo y es reconocido por una célula presentadora de antígeno (CPA), que lo internaliza, procesa y presenta al linfocito T CD4. El reconocimiento es posible gracias a la presencia en las CPA de receptores de reconocimiento (PRR) para antígenos solubles o presentes en la membrana del patógeno (“patrones moleculares asociados a patógenos”; (PAMP)). Una vez internalizado, el antígeno es procesado y exteriorizado a través de la membrana junto con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) para su presentación al linfocito T CD4. El reconocimiento por el linfocito T CD4 del complejo péptido-MHCII promueve la transducción de señales citoplásmicas (a través de STAT6 y GATA3) que conducen a la expresión de moléculas coestimuladoras como IL12 que permiten la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos TH2. Éstos, en presencia de IL4 e IL13 estimulan la diferenciación de linfocitos B para la producción de IgE la cual, una vez liberada, se adhiere a las membranas de diferentes tipos celulares como basófilos, mastocitos y linfocitos entre otras células.

La fase de reexposición (Figura 2) se inicia con una nueva entrada del antígeno en el organismo y su contacto con un mastocito previamente sensibilizado a través de las IgE que revisten su membrana. Un antígeno tiene que entrar en contacto con 2 moléculas entrecruzadas. La interacción promueve, como respuesta temprana, la liberación de mediadores preformados como histamina, triptasa, quimasa,



carboxipeptidasa, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), eotaxina, B hexosaminidasa o B glucuronidasa, entre otros. También se inicia la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos, TNF- α , interleuquinas 3, 5, 6, 10 y 13, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM CSF), factor activador de plaquetas (PAF), etc., que permiten la atracción de eosinófilos y el desencadenamiento de toda la respuesta inflamatoria característica del asma (15).

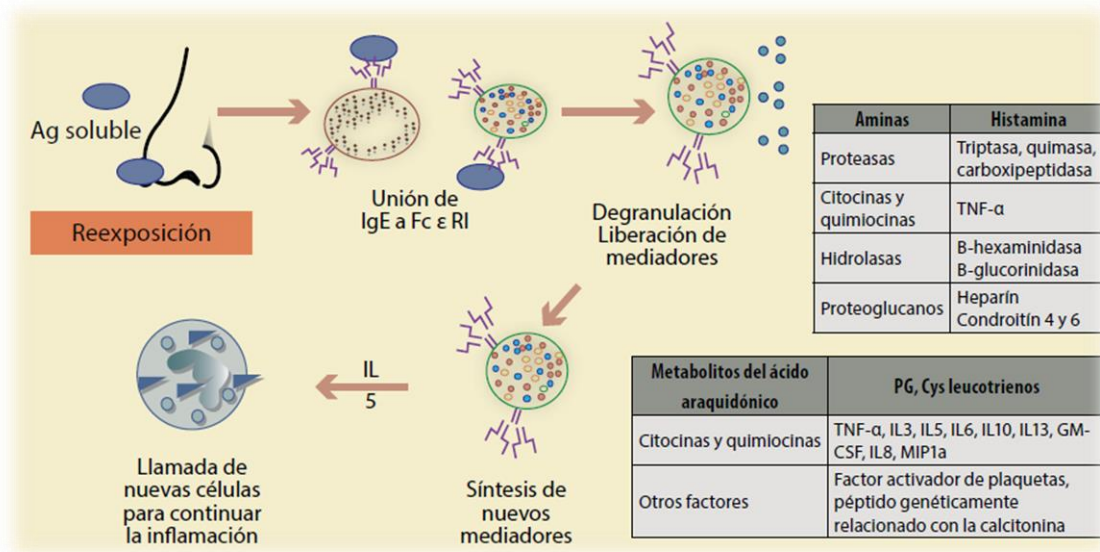
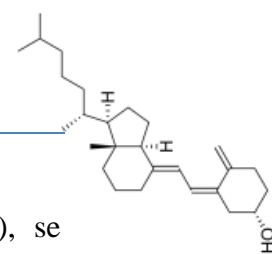


Figura 2: Fisiopatología de la respuesta alérgica. Reexposición al Ag inhalado y la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios. Tomado de (15).

1.1.4 Relación entre estrés oxidativo y asma

Diversas investigaciones a lo largo de los últimos 30 años han identificado el estrés oxidativo como uno de los mecanismos biológicos que contribuye en la fisiopatología del asma (16).

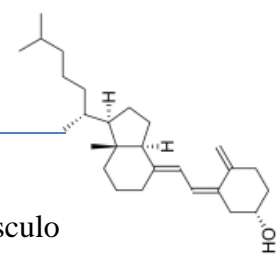
En el desarrollo de un gran número de enfermedades pulmonares, junto con la inflamación y el consiguiente remodelado que tiene lugar en las vías aéreas, se genera un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes, denominado **estrés oxidativo**. Este fenómeno se ha implicado tanto en la patogenia como en la cronificación del asma. Las especies reactivas del oxígeno (ROS), incluido el anión



superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los radicales hidroxilos y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se sintetizan como respuesta de las células inflamatorias y serán las causantes de la oxidación de los ácidos nucleicos, de las proteínas y de los lípidos de membrana. Esta oxidación es capaz de causar daño celular y de potenciar la inflamación (17).

En los procesos inflamatorios de las vías aéreas se observa frecuentemente una respuesta inmunoinflamatoria caracterizada por la activación de células epiteliales y macrófagos, así como por el reclutamiento y activación de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos. Las células que son desplazadas al espacio aéreo adquieren la capacidad de generar ROS en respuesta a diversos estímulos, incluidas las citoquinas. La activación de células fagocitarias, como los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, provoca la liberación de aniones superóxido, que rápidamente, por la acción de la superóxido dismutasa, se transforman en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ROS y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) se sintetizan de forma endógena a partir de la respiración mitocondrial, la activación de las oxidasas de NADPH y xantina, y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Las mieloperoxidasas y peroxidasas sintetizadas por los eosinófilos interactúan con los nitritos (NO_2^-) y el H_2O_2 e inducen la formación de RNS, de la misma manera que las células epiteliales de origen pulmonar pueden sintetizar distintas ROS. Tanto las ROS como las RNS interactúan con aminoácidos del tipo metionina, tirosina y cisteína, y dan lugar a proteínas dañadas con gran capacidad inflamatoria en el tejido pulmonar (16, 17).

Por otra parte, en estrecha relación con el estrés oxidativo y la inflamación se encuentra la síntesis y actividad biológica del óxido nítrico (NO), un compuesto que, a través de una gran variedad de mecanismos, favorece un correcto funcionamiento de la función vascular. El NO es un potente vasodilatador del músculo liso, a su vez es capaz de provocar la inhibición de la adhesión de leucocitos al endotelio activado y es capaz de regular el reclutamiento de células inflamatorias dentro de la pared vascular entre otras actividades. La falta de oxígeno en las células lleva a una situación de acidosis en el organismo y como consecuencia un aumento considerable de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido. Se ha demostrado que este radical libre, debido a la presencia de un electrón desapareado en su último orbital, puede combinarse con el NO dando lugar a la aparición del anión peroxinitrito, un potente oxidante capaz

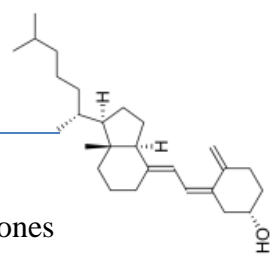


de producir daño celular y que carece de la actividad relajante del NO sobre el músculo liso. Por ello, en nuestro estudio, nos planteamos evaluar marcadores tanto de la producción de NO como de estrés oxidativo para caracterizar el daño al que se ven sometidas las células durante un proceso asmático. De hecho, se ha comprobado que los niveles de NO son mayores en las vías aéreas de pacientes asmáticos que en las de no asmáticos (16).

El NO es un mediador gaseoso que se produce de manera endógena por las NO sintasas (NOSs), y es ampliamente considerado como un marcador indirecto de inflamación de la vía aérea. Se ha demostrado que las personas con asma, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), entre otras, exhalan elevadas cantidades de NO que disminuyen en respuesta a los corticosteroides (18). El NO es producido por las células epiteliales que recubren el interior de las vías aéreas altas (nariz y senos paranasales) y bajas (bronquios). Cuando hay inflamación eosinofílica, su producción aumenta y este NO puede medirse de distintas maneras.

Junto a la mayor actividad oxidante que se observa en el parénquima de los asmáticos, se ha comprobado que disminuyen los valores de agentes antioxidantes tanto en las muestras obtenidas de plasma como en el lavado broncoalveolar (17). El pulmón tiene una gran variedad de agentes antioxidantes (glutatión, catalasa y superóxido dismutasas (SODs)), pero los niveles elevados de ROS superan esta actividad antioxidante (16).

Numerosas investigaciones han mostrado que las ROS tienen múltiples efectos sobre las vías aéreas. Son numerosos los hallazgos que prueban la capacidad de las ROS para regular el funcionamiento de las fibras musculares de las vías aéreas. Así, se ha observado que tanto el H_2O_2 como los niveles elevados de oxígeno ambiental son capaces de inducir contracciones en las fibras musculares lisas del tejido pulmonar bovino. De igual modo, se ha demostrado la capacidad del H_2O_2 para estimular la proteína mitógena activadora relacionada con el control de la proliferación de los miocitos traqueales (19). También se ha reconocido la capacidad del ozono y del H_2O_2 para potenciar la hiperrespuesta bronquial desencadenada por la acetilcolina y la



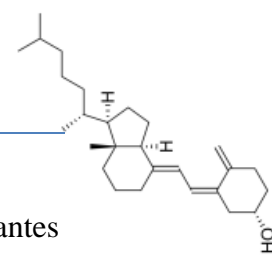
bradiquinina. Se ha demostrado que las ROS participan en la génesis de lesiones vasculares como las asociadas a la hipertensión, la aterosclerosis y la trombosis (17).

Por lo tanto, como se ha comentado anteriormente, el aumento en la producción de ROS incrementa la peroxidación lipídica y el daño a las proteínas y el ADN; también se ha observado un aumento en la inflamación de las vías aéreas a través de múltiples mecanismos como puede ser a través de mediadores proinflamatorios y efectos en el musculo liso o en la secreción de moco. Por otro lado, los mecanismos de defensa antioxidante se ven sobrepasados por el estrés oxidativo y esto tiene como consecuencia la alteración de la homeostasis del líquido alveolar y también pueden aparecer infecciones, las cuales pueden contribuir a aumentar este estrés oxidativo (20). El riesgo de la aparición de estrés oxidativo en el asma es debido a una alteración de los mecanismos enzimáticos o no enzimáticos contra una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS) generadas por células inflamatorias (eosinófilos activados, neutrófilos, monocitos y macrófagos) (21).

El asma es una enfermedad heterogénea que generalmente se caracteriza por inflamación crónica de las vías respiratorias en cuya génesis se encuentra el estrés oxidativo/nitrosativo y la inflamación que acompañan al asma. También se asocia con enfermedades inflamatorias sistémicas crónicas más allá de las vías respiratorias. Varios estudios han demostrado que los procesos inflamatorios son en parte responsables de la fisiopatología del asma, aterosclerosis y disfunción endotelial. Además, nuestro conocimiento de la participación e interacción con la coagulación, vías anticoagulantes, el sistema fibrinolítico y plaquetas en la fisiopatología del asma ha aumentado considerablemente. Por tanto, varios estudios ya han demostrado que el asma está relacionada con un aumento de la incidencia de enfermedad cardiovascular (22).

1.1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de asma siempre debe ser considerado ante la presencia de síntomas y signos clínicos de sospecha, como sibilancias (el más característico), disnea (o dificultad respiratoria), tos y opresión torácica. Éstos son habitualmente variables, de



predominio nocturno o de madrugada, provocados por diferentes desencadenantes (infecciones víricas, alérgenos, humo del tabaco, ejercicio, emociones, etc.). Los cambios climáticos asociados a los cambios estacionales y los antecedentes familiares y personales de atopia intrínsecos de cada persona son aspectos importantes a considerar. Ninguno de estos síntomas y signos son específicos del asma como se ha comentado anteriormente, de ahí la necesidad de incorporar alguna prueba objetiva diagnóstica, habitualmente pruebas funcionales respiratorias (14). Esta es una de las causas por las que también planteamos nuestro estudio, la necesidad de realizar una prueba objetiva específica que nos permita diagnosticar el asma con certeza, como puede ser la detección de determinadas variantes poligénicas relacionadas con el asma, como veremos más adelante.

En la anamnesis que se le realiza al paciente en la consulta se deben tener en cuenta varios factores como son cuando han tenido lugar los primeros síntomas, si existe o no rinitis alérgica o eczema y la historia familiar de asma o atopia, que aumentan la probabilidad de diagnóstico de asma (14).

En los primeros años de vida, el diagnóstico de asma puede ser difícil de establecer. Por ello, en dicho periodo, los estudios y las guías se apoyan en la presencia de sibilancias (wheezing), término que suele emplearse como sucedáneo del asma que resulta controvertido diagnosticar, principalmente por la dificultad para practicar pruebas de función pulmonar. Como se demuestra en la Figura 3 la espirometría es la prueba diagnóstica de primera elección. Sin embargo la utilidad de esta prueba de función respiratorio en el niño para el diagnóstico del asma es menor que en el adulto ya que la mayoría de niños con asma tienen un FEV₁ (volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada) dentro de los valores de referencia. Por eso en estos casos un incremento del 12% es condición suficiente para considerar la prueba como positiva aunque sea inferior a 200 ml (14).

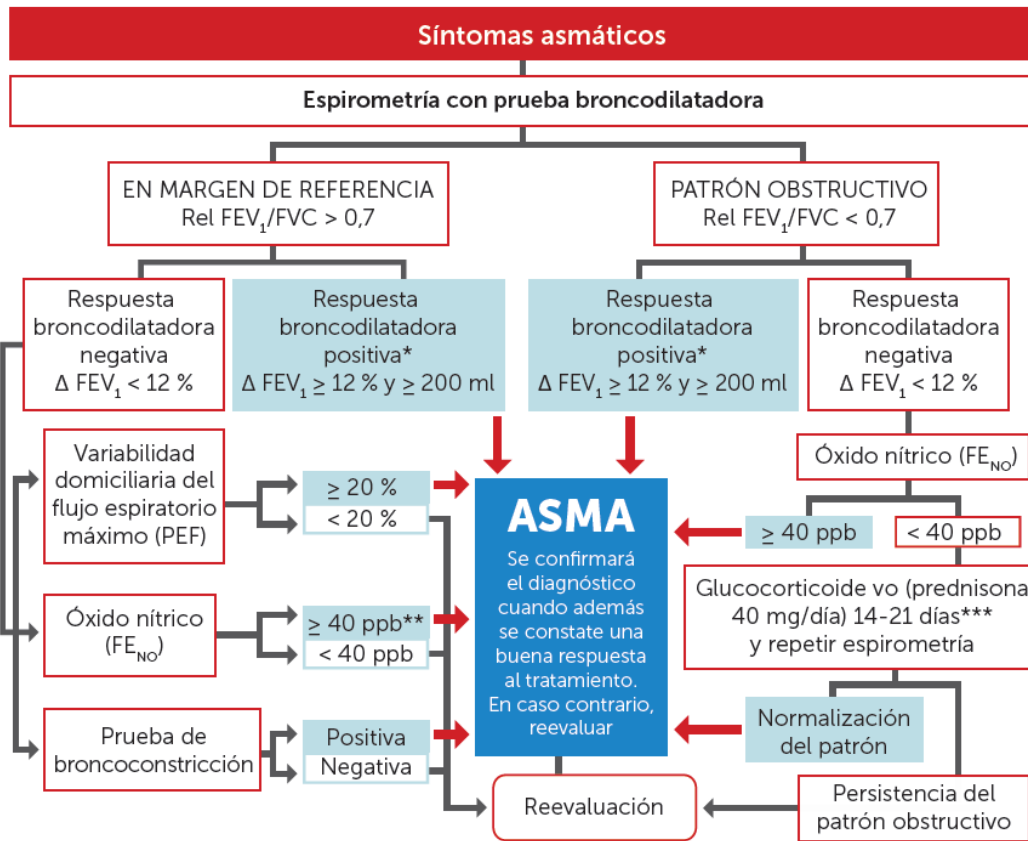
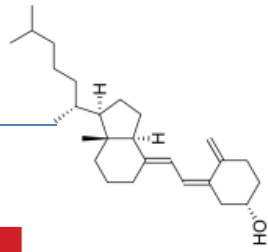
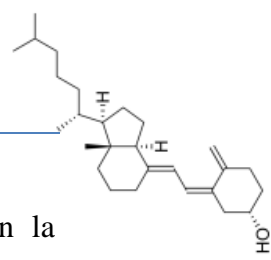


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de asma. Tomado de la última actualización de la Guía Española para el Manejo de Asma (14).

Como hemos visto, la reacción inflamatoria de las vías aéreas en el asma se caracterizan por responder a estímulos externos, como agentes alérgenos, virus, bacterias, pero también a estímulos mecánicos, como la hiperventilación en la actividad física (13). Una de las causas más frecuentes de asma es la relacionada con la alergia a los ácaros del polvo, que es concretamente en la que nos centraremos en nuestro estudio. Por ello, muchas veces junto al diagnóstico de asma es necesario realizar un diagnóstico de alergia para ver si están relacionados.

El objetivo del estudio alergológico que normalmente se lleva a cabo en la consulta es el de determinar la existencia de sensibilización a aeroalérgenos que sean capaces de influir en el desarrollo del fenotipo de asma alérgica, o que puedan desencadenar exacerbaciones. Puede realizarse en cualquier paciente con asma, independientemente de su edad. Mediante la historia clínica se valoran los antecedentes personales o familiares de atopia como puede ser la presencia de rinoconjuntivitis,



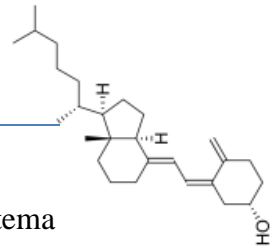
eczema o alergia a algún tipo de alimento y la relación de los síntomas con la exposición a aeroalérgenos que pueden ser tanto de interior como de exterior u ocupacionales. Para el diagnóstico de asma alérgica, además de apreciarse sensibilización frente a alérgenos inhalados, es preciso constatar la relevancia clínica de los resultados obtenidos (14).

La prueba de punción epidérmica o prick es el método de elección por su alta sensibilidad, bajo coste y porque nos da la ventaja de disponer de una valoración inmediata. Los mejores resultados se obtienen con la utilización de extractos estandarizados, cuando se conocen las variables que afectan a sus resultados como puede ser la utilización de fármacos o dermatografismo y se posee experiencia en su interpretación ante la presencia de reactividad cruzada o de panalérgenos (14). Todos los pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo incluidos en nuestro estudio fueron diagnosticados con la realización de un prick, como veremos más adelante.

1.1.6 Alergia a los ácaros del polvo

Se entiende por alergia a toda aquella reacción anormal, excesiva, del sistema de defensa del organismo ante una sustancia que, en sí misma, es inofensiva y que por tanto no sería capaz de causar ningún daño a las personas no alérgicas. Las personas alérgicas son capaces de producir una cantidad anormal del anticuerpo IgE, cuyos mecanismos fisiopatológicos se han descrito anteriormente.

La alergia a los ácaros del polvo es muy frecuente. El polvo que se acumula en el interior de los domicilios es una compleja mezcla de gran cantidad de materiales de diferente origen y composición: restos de fibras textiles, pelos, escamas cutáneas de personas y animales, restos de insectos y plantas, mohos, bacterias, pólenes y, sobretodo, ácaros. Los ácaros son artrópodos microscópicos de ocho patas, cuyas especies más cercanas son las arañas y las garrapatas. Son inofensivos ya que no pican y no transmiten contagio de ningún tipo sin embargo se les considera la causa más importante de alergia fuera de la temporada del polen. Existen múltiples especies, dos de las cuales (*Dermatophagoides Pteronysynus* y *Farinae*) son la causa más frecuente



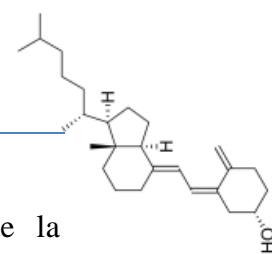
en todo el mundo de alergia respiratoria, una respuesta exagerada del sistema inmunitario (alergia) a las proteínas inocuas de estos ácaros que se inhalan con el aire interior. Es por ello que normalmente a este fenómeno se le denomina alergia por inhalación.

Las proteínas desencadenantes que se encuentran en los ácaros y en sus heces son alérgenos. Algo característico de las alergias a los ácaros del polvo es que los síntomas normalmente se producen durante todo el año y no se limitan a un determinado periodo anual como las alergias al polen. Sin embargo, las molestias de los alérgicos a los ácaros del polvo también pueden aumentar en función de la estación del año, normalmente esto ocurre cuando se empieza a usar la calefacción.

Dado el enorme impacto que esta enfermedad tiene sobre la población actual es importante buscar nuevos criterios diagnósticos que nos permitan detectarla en edades tempranas. Es por ello por lo que además de revisar los síntomas del asma y el tratamiento, sería importante averiguar si el diagnóstico del asma sigue siendo apropiado ya que es una parte importante de la atención clínica (23). Por este motivo nos planteamos la búsqueda de nuevos criterios diagnósticos que nos permitan diagnosticar con certeza el asma evitando así la morbimortalidad que la falta de tratamiento conlleva en los pacientes.

A pesar de la investigación acelerada y de los avances en el tratamiento del asma en los últimos años, la carga sociosanitaria sigue siendo elevada; incluso en los países con recursos el 50% de los pacientes pueden experimentar un control deficiente de la enfermedad. Se trata de un importante desafío mundial que exige una respuesta colectiva. Así, establecer estrategias futuras para de esta manera mejorar los resultados del asma es una responsabilidad importante tanto para los médicos como para la población en general (24).

Durante la primera infancia, la respuesta de nuestro sistema inmunitario en constante contacto frente a microbios y alérgenos en el medio ambiente parece ser fundamental en el desarrollo de enfermedades alérgicas. Los cambios en el perfil de esta



microbiota son probablemente la causa principal del aumento dramático de la prevalencia del asma (24). Por este motivo, en el futuro aumentará el número de pacientes con asma. Por todo ello creemos que la mejora de los resultados del asma es una prioridad y una meta alcanzable y es lo que nos proponemos en este estudio.

Por lo tanto, entendemos el **asma** como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con HRB y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente.

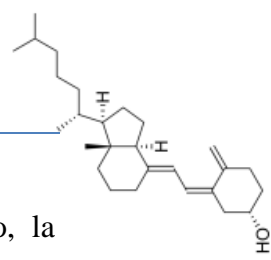
1.2 VITAMINA D

Antes de adentrarnos en la relación existente entre la vitamina D y su receptor (VDR) con el asma, comentaremos algunos aspectos generales sobre esta vitamina D.

1.2.1 Generalidades

El descubrimiento entre 1919-1924 de la vitamina D y su producción en la piel por irradiación UV y a través de la ingesta de los alimentos llevó a la eliminación del raquitismo como un problema médico importante. La identificación y preparación química de la vitamina D en la siguiente década proporcionó grandes cantidades de vitamina D para su uso clínico en el tratamiento de una variedad de enfermedades óseas (25).

La **vitamina D** ha pasado de ser sólo una vitamina a ser una importante prohormona con múltiples efectos en diferentes tipos de tejidos y en diversos procesos fisiológicos. Su acción no sólo está relacionada con el metabolismo mineral óseo y el equilibrio fosfocálcico, sino también con efectos importantes en diferentes tipos celulares y en diversos procesos (26) entre los que se encuentran la secreción y efecto de la insulina, función endotelial, regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, control del ciclo celular y apoptosis, autotolerancia inmunológica y



efectividad de la acción del sistema inmune ante las infecciones. Por lo tanto, la deficiencia de vitamina D se ha visto relacionada no sólo con raquitismo y osteomalacia, sino también con mayor riesgo de diabetes y de enfermedades cardiovasculares, oncológicas, infecciosas y autoinmunes (27). Un buen ejemplo de ello es el artículo de Codoñer-Franch et al, donde se detectan niveles insuficientes de vitamina D en niños obesos con un aumento de los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo, inflamación y activación endotelial (28).

La prevalencia de la deficiencia de vitamina D es más alta de lo que tradicionalmente se ha considerado, inclusive en regiones tropicales donde hay mayor exposición solar (Figura 4) (7). Esta deficiencia se está convirtiendo en una situación epidémica en aumento, aun no bien reconocida, con importantes implicaciones en la salud de la población, puesto que se asocia como factor de riesgo para múltiples enfermedades, como las anteriormente mencionadas, las cuales en su conjunto constituyen la mayor carga de morbilidad a nivel mundial (27). Por lo tanto, se deben tomar medidas efectivas para evitar y detectar oportunamente esta deficiencia y de esta manera disminuir el riesgo de las diversas enfermedades que de ella podrían derivarse.

Estudios realizados en Boston (MA, EE.UU., latitud 42°), han mostrado que el 42% de los niños afroamericanos e hispanos tenían niveles de vitamina D inferiores a 20 ng/ml, y que el 57% de los pacientes internados en una sala de medicina general eran deficientes en vitamina D (≤ 15 ng/ml) (7).

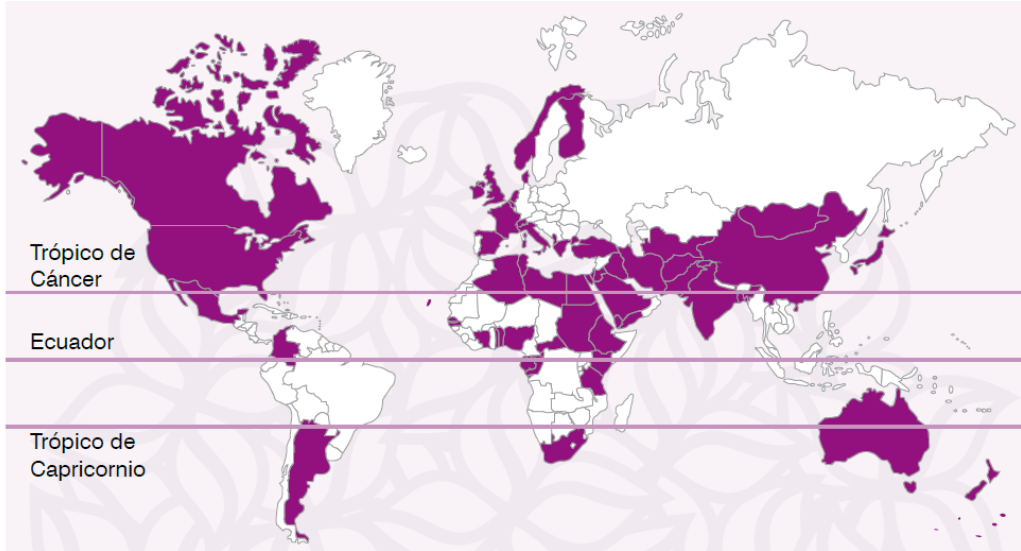
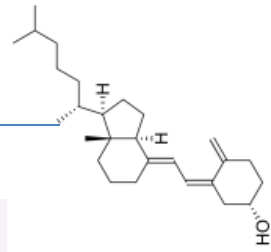
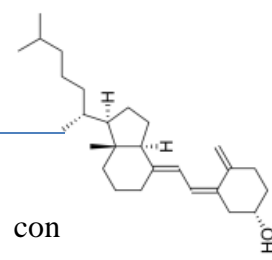


Figura 4: Países con raquitismo por deficiencia de vitamina D. A pesar de ser una publicación que tiene unos diez años nos da una idea global de la situación que tiene esta deficiencia en todo el mundo. Tomado de (27).

Son muchos los factores que pueden influir en los niveles de vitamina D (10) y, por lo tanto, son múltiples los aspectos que se deben tener en cuenta además del tiempo de exposición ya que cada vez se pasa más tiempo en el interior de los edificios. La estación del año es un factor importante; de hecho se estima que los niveles de vitamina D descienden un 20% desde finales de verano a pleno invierno. También es importante considerar la latitud ya que en áreas por encima de los 40° de latitud, generalmente no se alcanza este umbral en invierno y debe almacenarse suficiente vitamina D durante el resto del año. También es importante tener en cuenta factores climatológicos como la nubosidad y la contaminación. Otro dato muy importante a considerar es la superficie corporal expuesta y la protección solar, por lo que hay que tener en cuenta tanto el uso de cremas solares protectoras como la ropa; por ejemplo existen motivos culturales que hacen que ciertas personas lleven una mayor superficie corporal cubierta como es el uso de velo en inmigrantes. La pigmentación de la piel es otro de los factores importantes, ya que afecta al tiempo necesario para producir vitamina D; así, los individuos de piel más oscura necesitan entre 3-4 veces más de exposición solar para alcanzar los mismos niveles de vitamina D que los de piel clara (7, 29).

Las enfermedades que aparecen como consecuencia de una malabsorción de las grasas como la celiaquía, la enfermedad inflamatoria intestinal, la insuficiencia



pancreática, la fibrosis quística o la colestasis hepática se han visto asociadas con concentraciones séricas bajas de vitamina D. Las enfermedades hepáticas y renales pueden impedir la adecuada hidroxilación de la vitamina D a sus formas activas y por lo tanto causar déficit de esta.

La administración de determinados fármacos como los antiepilépticos (ej. fenobarbital, fenitoína), rifampicina, antirretrovirales o corticoides a largo plazo, también se han asociado a niveles bajos de vitamina D. Debido a que la vitamina D es liposoluble, el orlistat y la colestiramina pueden reducir su absorción, por ello se suele recomendar no administrarlos juntos.

Los niños alimentados exclusivamente con lactancia materna y los ancianos que viven en residencias, así como las personas con obesidad, son grupos poblacionales con mayor riesgo de déficit de vitamina D (10, 29).

La nueva atención se centra ahora en el papel de la vitamina D en una variedad de enfermedades y en pacientes más individualizados. Se están considerando esquemas de recomendación que toman en cuenta metas más realistas y alcanzables para lograr suficiente vitamina D a través de la dieta, los suplementos y el comportamiento frente al sol (30).

1.2.2 Metabolismo

La vitamina D, también conocida como calciferol, es en realidad un conjunto de secoesteroles liposolubles cuyas principales formas representativas son la Vitamina D₂ (ergocalciferol) y la Vitamina D₃ (colecalfiferol) (Figura 5), funcionando ambas como prohormonas, y por lo tanto inactivas (27, 31).

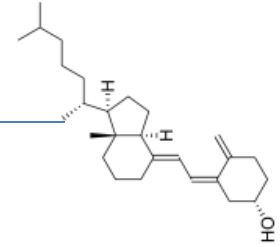
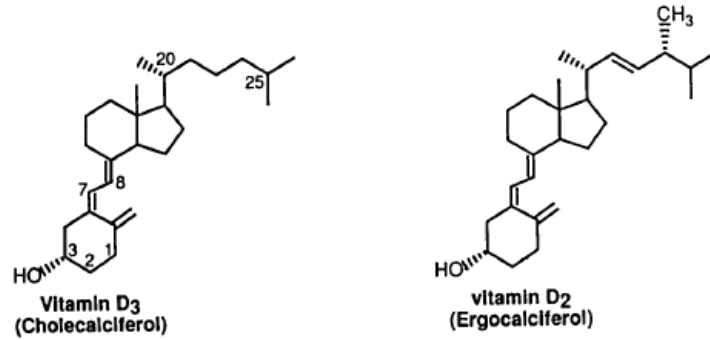


Figura 5. Principales formas representativas de la vitamina D. Tomado de (31).

Es de destacar (Figura 6) que la síntesis de la vitamina D₃ se produce a partir de 7-dehidrocolesterol en la piel bajo la acción de los rayos solares UVB (290-315 nm) (90%) (32), además de poder ser incorporada a través de la dieta (10%) (33). La forma natural de vitamina D en los animales y la forma que sintetizamos en la piel es el colecalciferol (vitamina D₃) (7, 27). Para ejercer los efectos fisiológicos, la vitamina D debe convertirse en su forma activa. Para ello el primer paso es ser transportada por la proteína de unión a vitamina D (VDBP), una proteína fijadora específica de vitamina D y sus metabolitos. Los metabolitos de la vitamina D son moléculas lipofílicas es decir que presentan baja solubilidad en agua y por lo tanto deben ser transportados en la circulación unidas a proteínas plasmáticas (27). La forma 25-hidroxivitamina D es la forma circulante mayoritaria, y aparece en el plasma a unas concentraciones de 10-40 ng/ml. La principal razón de la estabilidad de este metabolito es porque circula unido fuertemente a VDBP (31).

La activación de las vitaminas D₂ y D₃ se realiza mediante una serie de reacciones de hidroxilación. La primera de ellas tiene lugar en el hígado mediante el citocromo P450 2R1 dando lugar a 25-hidroxivitamina D y luego en el riñón mediante la 1 α -hidroxilasa (CYP27B1) dando lugar a la forma activa o calcitriol (1,25-dihidroxivitamina D) (7, 27, 31, 34). La 24-hidroxilación adicional de la 1,25-dihidroxivitamina D es un paso importante para su inactivación dentro de las células diana y para la eliminación de los excedentes de la vitamina (35).

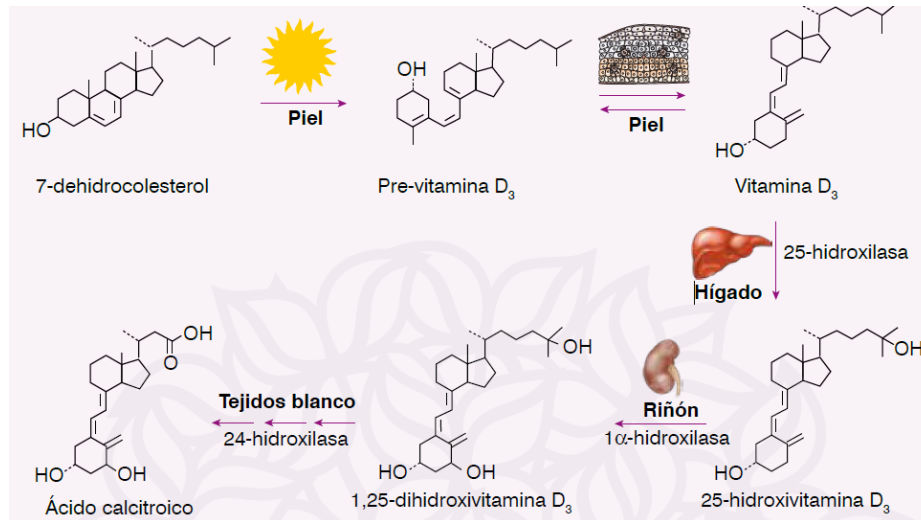
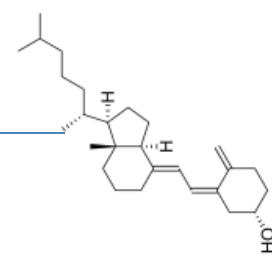


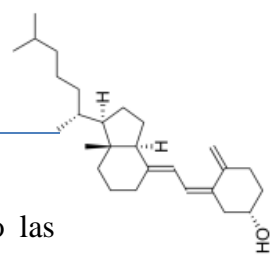
Figura 6: Síntesis y metabolismo de la vitamina D. Proceso que sufre esta hormona desde su precursor hasta su degradación. Tomado de (27).

La vitamina D no circula por el torrente sanguíneo durante mucho tiempo sino que es inmediatamente incorporada en el tejido adiposo como almacenamiento o en el hígado para futuras metabolizaciones (31).

El estado de vitamina D de un paciente se determina midiendo los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D, que es la forma circulante principal. Tiene una vida media de 2 semanas en la circulación, y los niveles se correlacionan con hiperparatiroidismo secundario, osteomalacia y raquitismo (7). La mayoría de los expertos definen la deficiencia de vitamina D como un nivel por debajo de 20 ng/ml (50 nmol/l), aunque no hay un consenso generalizado sobre este valor. Muchos expertos en vitamina D argumentan que se necesitan niveles de 30-40 ng/ml (75-100 nmol/l) o incluso mayores para observar beneficios sobre los procesos no esqueléticos; estos resultados deberán ser confirmados mediante nuevas investigaciones (7, 36).

1.2.3 Mecanismo de acción

Las enfermedades que tradicionalmente se han asociado con la deficiencia de vitamina D incluyen el raquitismo y la osteomalacia. Sin embargo, en estos últimos

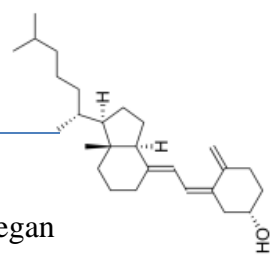


años se han asociado bajos niveles de vitamina D en otras enfermedades como las enfermedades autoinmunes, muchos cánceres y el asma (7, 37).

La principal función de la vitamina D es regular la homeostasis del calcio, tanto la sistémica, con acciones en el intestino, los riñones y el hueso, como la intracelular en los diferentes tejidos. La vitamina D mantiene las concentraciones plasmáticas de calcio a través de tres vías:

1. A nivel intestinal induce las proteínas que están involucradas en la absorción del calcio y, además, estimula la absorción intestinal del fosfato.
2. A nivel óseo es capaz de movilizar el calcio de los huesos, cuando éste es insuficiente en el aporte de la dieta, a través de mecanismos complejos, como son la estimulación de los osteoblastos para que éstos produzcan RANKL (ligando del receptor del activador nuclear κ), que a su vez activa los osteoclastos para la resorción ósea. En esta movilización cálcica desempeña un papel clave la hormona paratiroidea (PTH).
3. A nivel renal tanto la vitamina D como la PTH son responsables de la reabsorción del último 1% del calcio filtrado a través del túbulo renal distal. La vitamina D se considera una hormona muy importante que no sólo desempeña un papel en la movilización del calcio óseo cuando este es necesario, sino en la iniciación del modelado y el remodelado óseo y sus reparaciones correspondientes (38).
4. A nivel sistémico, la acción de la vitamina D contribuye a disminuir la inflamación crónica y a contrarrestar el estrés oxidativo.

La regulación endocrina del calcio es muy eficaz y sensible. Cuando aparecen en el organismo bajas concentraciones de calcio, las proteínas transmembrana acopladas a las proteínas G estimulan la secreción de PTH, la cual es capaz de actuar en los osteoblastos y en las células del túbulo contorneado proximal del riñón. En estas células se encuentran concentraciones elevadas de la enzima 1α -hidroxilasa y sirven de glándula endocrina de la vitamina D, que por sí misma estimula la absorción intestinal de calcio y, junto a la PTH, la movilización de calcio óseo y la resorción renal de calcio. Ante concentraciones elevadas de calcio se produce una detención en los procesos



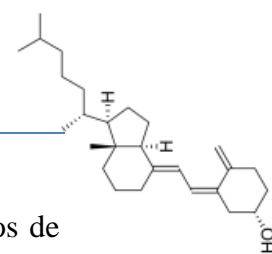
estimuladores de la glándula paratiroidea, y las células C del tiroides segregan calcitonina, que bloquea la movilización del calcio óseo.

Para ejercer su acción, la vitamina D necesita unirse a su receptor (VDR). Se ha demostrado la expresión del receptor intracelular para la 1,25 dihidroxivitamina D (receptor de la vitamina D (VDR)) en una gran variedad de tipos celulares no relacionados directamente con la función clásica de la vitamina D (26). Se ha descrito que este receptor se expresa también en las células inmunitarias de la vía aérea, regulando la transcripción de numerosos genes asociados con la inflamación y la inmunomodulación (10). De hecho, esta actividad en la regulación inmune por los agonistas de VDR es debida a su habilidad para interferir en los procesos de maduración, diferenciación y activación de la mayoría de células del sistema inmunitario, las cuales expresan VDR, como son monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos y células dendríticas (39).

El mecanismo de acción de la vitamina D puede resumirse de la siguiente forma. La vitamina D₃ puede provenir de la dieta aunque mayoritariamente se produce en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol. Posteriormente son necesarios dos pasos de activación enzimática para producir la forma biológicamente activa de la vitamina D. La última enzima que interviene en el metabolismo se encuentra en el riñón y está fuertemente regulada por las señales homeostáticas de calcio y también inducida por señales de tipo inmune. La forma activa, 1,25-dihidroxivitamina D es transportada a los lugares de acción de la vitamina D mediante su unión a la VDBP (codificada por locus GC), o es inactivada metabólicamente por 24-hidroxilasas. En las células donde actúa la vitamina D, esta se transloca al núcleo y se une a su receptor (VDR). El complejo ligando/receptor se une a los elementos de respuesta (VDRE) localizados en regiones promotoras de los genes diana, alterando la tasa de transcripción de estos genes (40).

1.2.4 Efecto de la vitamina D sobre el sistema inmunitario

Como se ha señalado anteriormente, múltiples estudios recientes han destacado los efectos de la vitamina D sobre el desarrollo inmunitario y ciertos tipos de cáncer (10,



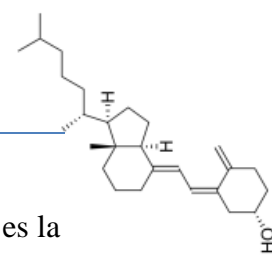
41). Los estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre niveles bajos de vitamina D y mayor riesgo y/o mayor mortalidad por cáncer de colon, mama y pulmón. Se le atribuye un efecto protector frente a cáncer de ovario, mama, colorectal, estómago, hígado, próstata y piel (42). También se ha observado que los bajos niveles de vitamina D están asociados con otras enfermedades inmunitarias, incluyendo la diabetes tipo 1, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. Estos son principalmente mediados por linfocitos Th1 (7).

Los desórdenes en los cuales la vitamina D podría tener un papel importante son, además del cáncer, las infecciones, enfermedades cardiovasculares, esquizofrenia y enfermedades inmunológicas como esclerosis múltiple, diabetes insulino dependiente y asma (43).

Recientemente, se ha observado que la vitamina D modula la respuesta de los macrófagos, impidiéndoles la liberación de citoquinas inflamatorias y quimioquinas. La deficiencia de vitamina D también afecta a la capacidad de los macrófagos para madurar, para producir antígenos de superficie específicos, para liberar enzimas como la fosfatasa ácida, y para secretar H_2O_2 , todas ellas funciones integrales de sus propiedades antimicrobianas (44).

La vitamina D aumenta la producción de catelicidina en los macrófagos, que mejora la actividad antimicrobiana (33), especialmente frente a *Mycobacterium tuberculosis*, pero también en otras infecciones (7, 26, 45). En un cribado del genoma humano para identificar potenciales puntos de unión para 1,25-dihidroxitamina D, se observó la presencia de elementos de respuesta (VDR elements) en el promotor del gen para catelicidina, la cual forma parte de una clase de péptidos antimicrobianos llamados defensinas. Se cree que la activación de catelicidina es la vía más probable por la que la vitamina D interactúa con el **sistema inmune innato**.

La presencia de VDR en linfocitos, concretamente en linfocitos T activados pero no en reposo y linfocitos B ha proporcionado evidencia de un papel funcional de la vitamina D como modulador del brazo (adaptativo) adquirido del sistema inmune. La



función mejor establecida de la vitamina D dentro del **sistema inmune adaptativo** es la capacidad de 1,25 dihidroxivitamina D para modular la proliferación de linfocitos T y su función. Entre los varios subgrupos de linfocitos T, el objetivo principal parecen ser los linfocitos Th (Figura 7).

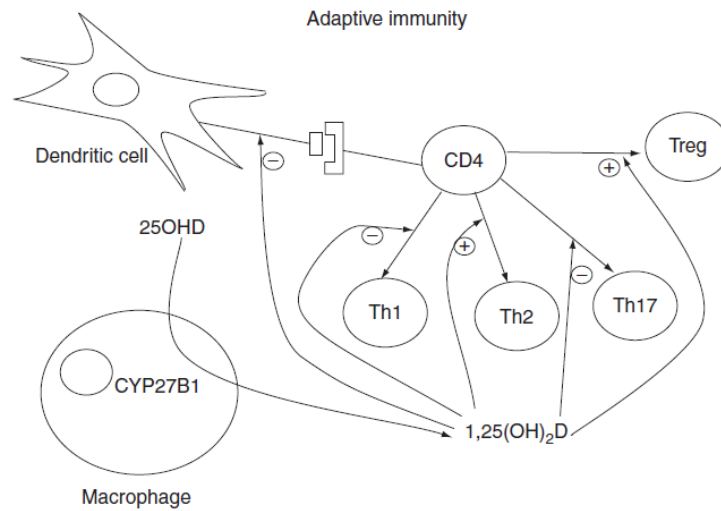
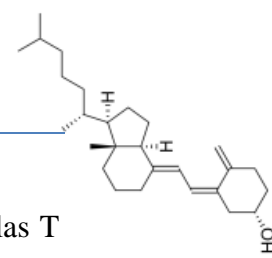


Figura 7: Regulación de la inmunidad adaptativa por la 1,25 dihidroxivitamina D. Ejerce un efecto inhibitorio de los linfocitos Th1 a favor de los Th2. Tomado de (34).

La relación entre la vitamina D y el sistema inmune es conocida desde hace más de 20 años, pero esta actividad no clásica de la vitamina D ha cobrado nueva importancia debido a que la deficiencia de vitamina D induce síntomas de tipo inmune en modelos animales con patologías autoinmunes y constituye un factor de riesgo para infecciones víricas. Como se ha comentado anteriormente, la identificación del receptor de la vitamina D (VDR) en células presentadoras de antígenos, como macrófagos o células dendríticas han relacionado la vitamina D con el sistema inmunitario (46). La vitamina D posee importantes acciones, aún no comprendidas en su totalidad, sobre la inmunidad innata y adaptativa y presenta un efecto inmunoregulador. Esta relación ha quedado manifiesta, como se ha comentado anteriormente, en base a la presencia de VDR en líneas celulares relevantes como macrófagos o células dendríticas mediante diversos estudios experimentales, así como estudios de asociación genética de VDR, o de expresión génica en ratones knock-out VDR.

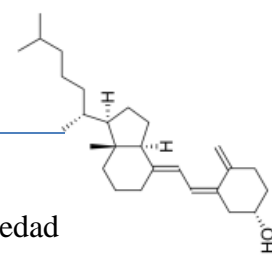


Múltiples tipos de células inmunitarias expresan VDR, incluyendo las células T y B activadas, macrófagos y las células dendríticas. La expresión de 1α -hidroxilasa, la enzima que cataliza la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D activa a partir de 25-hidroxitamina D, es expresada por células en sitios extra-renales, incluyendo células epiteliales, queratinocitos, macrófagos activados y células dendríticas. Esto no sólo pone de manifiesto la capacidad extra-renal de síntesis de la forma activa de la vitamina D, sino también la capacidad de modular la respuesta inmunológica innata y adaptativa en estas localizaciones (7). Se cree que la vitamina D estimula la inmunidad innata a través del aumento de catelicidina (péptido antimicrobiano), y suprime la inmunidad adaptativa, alterando la diferenciación de linfocitos T, inhibiendo esta diferenciación hacia Th1 y promoviéndola hacia Th2, como veremos más adelante (34, 37).

El importante papel de la vitamina D en la patogénesis del asma basado en la modulación de los linfocitos T ha sido ampliamente estudiado.

La vitamina D en general ejerce un efecto inhibitorio sobre el sistema inmune adaptativo. Por una parte disminuye la capacidad de presentar antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPAs) inhibiendo la expresión de moléculas coestimuladoras como HLA-DR, CD40, CD80 y CD86. Además, mediante la supresión de la producción de IL-12, importante para el desarrollo de Th1 (47) y la producción de IL-23 e IL-6, importante para el desarrollo de células Th17, inhibe el desarrollo de células Th1 capaces de producir IFN- γ e IL-2 y de las células Th17 que producen IL – 17 (4). Además, la supresión de IL-12 promueve el desarrollo de células Th2 que conduce al aumento de la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, lo cual suprime además el desarrollo de células Th1 decantando el equilibrio a un fenotipo de células Th2 (33, 34, 48).

La activación de linfocitos Th *naïve* da lugar a la generación de linfocitos Th0 pluripotentes que sintetizan un amplio espectro de citoquinas incluyendo IL-2, IL-4, IL-10 e Interferón γ (IFN- γ). Los linfocitos proliferantes Th0 son entonces capaces de diferenciarse en subgrupos Th que muestran un perfil de citoquinas más claro Th1 (IL-2, IFN- γ , factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)) y Th2 (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10), que



soportan respectivamente células mediadores de la inmunidad humoral. Una propiedad inmuno-moduladora clave de la vitamina D es su capacidad para inhibir la expresión de citoquinas Th1, mientras que aumentan las citoquinas Th2, ya sea directamente a través de los efectos sobre los linfocitos T o indirectamente a través de los efectos sobre CPAs (26, 43, 48, 49).

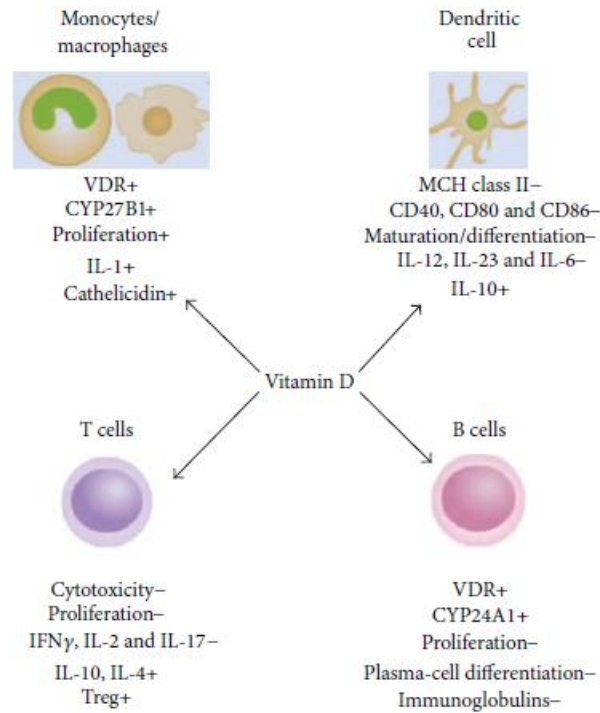
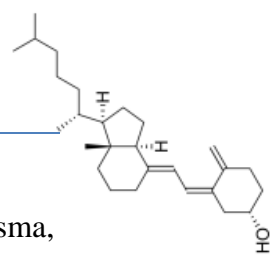


Figura 8: Efectos de la vitamina D en células del sistema inmunitario. Tomado de (39).

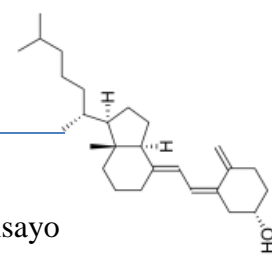
Como puede observarse en la Figura 8, la vitamina D regula las funciones de diferentes tipos de células inmunitarias. Estimula la proliferación de monocitos y su diferenciación a macrófagos aumentando la expresión de VDR, CYP27B1 e IL-1. Todo ello parece ser esencial para la posterior maduración del monocito a macrófago, lo cual no puede producirse en situaciones de deficiencia de vitamina D. A su vez se aumenta la expresión de los antígenos de superficie presentes en los macrófagos. Por otra parte, la vitamina D inhibe la proliferación, maduración y liberación de moléculas Th1. También se observa un efecto sobre los linfocitos inhibiendo su proliferación y maduración lo cual parece ser una consecuencia indirecta del efecto supresor atribuido a la vitamina D (39).



Por lo tanto, las células Th2 juegan un papel central en la patogénesis del asma, produciendo citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13, e induciendo la producción de IgE por células B, así como el crecimiento y diferenciación de células efectoras relevantes, es decir, mastocitos y eosinófilos. Existe un consenso general de que la vitamina D alivia la enfermedad autoinmune en modelos animales, y de que este efecto está asociado con la inhibición de la producción de IFN- γ (7). Este papel de la vitamina D sobre el sistema inmunológico puede ser todavía más complejo; se ha observado que puede ser la responsable de que los linfocitos T CD8 cambien de producir IFN- γ a producir IL-13 a través de la actividad de CYP11A1 (50). Se ha demostrado que cuando la vitamina D se administra al inicio de la estimulación antigénica regula negativamente la respuesta inflamatoria y aumenta la producción de IL-4 (51) responsable del efecto antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF-alfa, IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago.

De especial interés son las investigaciones que demuestran el efecto modulador de la vitamina D a través de la inducción o inhibición en la producción de diferentes citoquinas. Se han realizado diversos estudios en modelos animales (murinos) de asma. A pesar de existir divergencias entre resultados, la conclusión general es que la vitamina D hace decrecer, en sangre periférica, el perfil Th1 (inhibiendo la síntesis de IFN- γ e IL 2) (37, 51), mientras que incrementa el perfil Th2 (induciendo la producción de IL-4, IL-13 e IgE) (52). Apoyando estos resultados se encuentran los estudios que demuestran que ratones knock-out para el receptor VDR desarrollan asma alérgica (53, 54).

Estudios prospectivos han observado correlaciones inversas entre los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D y enfermedad cardiovascular, lípidos séricos, inflamación, trastornos del metabolismo de la glucosa, aumento de peso, trastornos del estado de ánimo y deterioro cognitivo. Que la vitamina D deba desempeñar un papel en COVID-19 no es inesperado, ya que se ha propuesto que existe un vínculo entre deficiencia de vitamina D y enfermedades respiratorias durante más de 100 años. Los estudios observacionales han informado de asociaciones entre la concentración sérica baja de 25-hidroxivitamina D y susceptibilidad de las vías respiratorias a infecciones agudas. El grupo más vulnerable frente al COVID-19, la población más envejecida, también tiene una alta proporción de individuos con niveles de vitamina D en el rango



de la deficiencia. Se han propuesto e iniciado estudios adicionales (al menos un ensayo clínico de los NIH está registrado) para dilucidar la relevancia de los niveles de vitamina D en la susceptibilidad y gravedad de la respuesta a COVID-19, así como el uso de suplementos de vitamina D como un posible agente terapéutico (30).

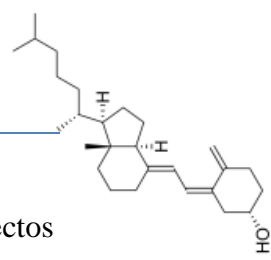
1.2.5 Relación entre la vitamina D y el asma

La deficiencia de vitamina D y su efecto en el asma han sido ampliamente revisados en la última década. Una simple búsqueda en PubMed usando el término "vitamina D y asma" muestra que se han publicado 112 artículos sobre este tema en el último año, incluyendo numerosas revisiones sistemáticas con metanálisis, hasta 2020. Sin embargo, a pesar de esta actividad, todavía hay numerosos aspectos que son objeto de discusión (55).

Ya que la vitamina D es un modulador importante de la respuesta del sistema inmunitario, y el gen de VDR se localiza en el cromosoma 12q, cerca de una región vinculada al asma, cabría esperar que variantes en genes de la vía de la vitamina D puedan afectar el asma y atopia (56). Además se ha comprobado una clara relación entre el aumento de enfermedades como asma y atopia y una tendencia a la disminución de los niveles circulantes de vitamina D en la población; y los estudios observacionales parecen confirmar que la deficiencia de vitamina D puede contribuir a un aumento de las alergias y el asma (57).

Los pacientes asmáticos son heterogéneos. A nivel molecular, aquellos con alta respuesta Th2 suelen presentar una mayor hiperreactividad de las vías respiratorias, mayor recuento de eosinófilos en sangre, niveles más elevados IgE sérica y otros biomarcadores y mayor remodelación de las vías respiratorias. Estos pacientes responden mejor a los diferentes tipos de tratamientos que los que presentan una baja respuesta Th2 y neutrofilia (52).

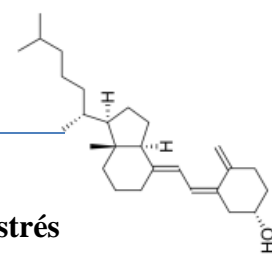
Se han observado asociaciones entre bajos niveles de vitamina D y elevadas tasas de asma (55). Basándonos en los resultados de estudios epidemiológicos la



vitamina D juega un papel importante en la patogénesis del asma a través de sus efectos en el sistema inmune innato y adaptativo (58). Incluso se ha demostrado que la remodelación de las vías aéreas se ve modulada por la vitamina D por medio de su inhibición de factores de crecimiento (59). El tratamiento de elección para controlar la inflamación en los pacientes asmáticos actualmente es el uso de corticosteroides, en cuyo mecanismo de acción la 1,25 dihidroxivitamina D podría tener un papel importante (36, 60). De hecho, se ha demostrado que la vitamina D aumenta la respuesta terapéutica a los corticosteroides (61). También hay estudios que muestran una relación dosis-respuesta entre los niveles de vitamina D y el volumen de aire expulsado durante el primer segundo de la espiración forzada (FEV_1), un parámetro analítico de la capacidad pulmonar (62). Todo lo expuesto explica la existencia de diferentes ensayos de suplementación con vitamina D para comprobar sus efectos en pacientes con asma. Así se ha observado que niños asmáticos con bajos niveles de vitamina D tienen mayor riesgo de sufrir ataques severos de asma (63).

También se ha descrito una asociación inversa entre los niveles circulantes de VDBP (vitamin D Binding Protein) y la función pulmonar. La mayor parte de la vitamina D en su forma activa circula unida a la proteína de unión a vitamina D (VDBP), una proteína cuya transcripción podría estar estimulada por citoquinas inflamatorias. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder establecer a la VDBP como potencial marcador en asma (64).

Se ha demostrado que los niveles de vitamina D están relacionados con características fenotípicas como la función pulmonar, la hiperreactividad de las vías aéreas, la respuesta al tratamiento y el riesgo de la aparición de exacerbaciones (65). También se ha observado que altos niveles de vitamina D están asociados con mayor función pulmonar, menor hiperreactividad bronquial y mejor respuesta a los glucocorticoides (48).

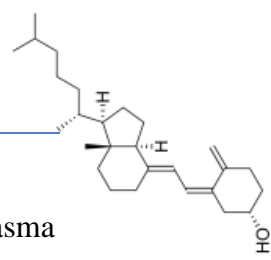


1.2.6 Relación entre la Vitamina D, asma y marcadores de inflamación y estrés oxidativo/nitrosativo y su influencia en enfermedades cardiovasculares y degenerativas

Numerosos estudios han observado correlaciones inversas entre los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D y, entre otros, enfermedad cardiovascular, lípidos séricos, inflamación y estrés oxidativo (27, 28, 43). Y está claramente establecido que tanto el estrés oxidativo (66) como la inflamación (67) crónica son eventos primarios de la disfunción endotelial que precede y acompaña a las enfermedades cardiovasculares. El papel protector de la vitamina D en estos eventos podría estar mediado, al menos en parte, por sus efectos constatados en prevenir la liberación de citoquinas proinflamatorias y mediadores de estrés oxidativo (44) por diferentes tipos celulares. Entre ellos las células del sistema inmune (46).

Por otra parte, también se ha observado que existe asociación entre asma y riesgo cardiovascular. Esta relación es debida a que en la fisiopatología del asma juega un papel importante la inflamación, esta misma inflamación es la implicada en los fenómenos aterotrombóticos que pueden causar un mayor riesgo cardiovascular (68). Tal asociación es plausible ya que se sabe que el asma está asociada con inflamación sistémica de bajo grado y deterioro de la función pulmonar lo que se ha relacionado con un mayor riesgo cardiovascular. Existen estudios que también han sugerido que los niveles de proteína C reactiva (PCR), como marcador de inflamación, están asociados con asma y riesgo cardiovascular (69). Uno de los estudios más extensos realizado en Taiwan sobre más de 400.000 pacientes mostró un aumento de riesgo cardiovascular en individuos que presentaban asma tanto de forma activa como no activa (69).

Varios estudios han demostrado que los procesos inflamatorios son una gran influencia en la fisiopatología del asma, la aterosclerosis y la disfunción endotelial (70). Un análisis más detallado indicó que el género podría influir. Combinados con otros hallazgos, los datos indican una asociación positiva entre el asma y la incidencia de enfermedades cardiovasculares que varía según varios factores, incluido el sexo, el tabaquismo, la gravedad y edad de inicio del asma (70). Existen pocos estudios al respecto en niños o adolescentes. En uno de ellos sí que se observa esta relación y de

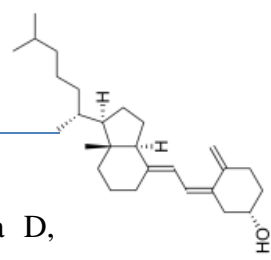


hecho se han asociado con asma de tipo alérgico y condiciones atópicas (71). El asma infantil a menudo se asocia con un equilibrio alterado en la polarización de las células T colaboradoras. La atopía muestra un patrón T2 sesgado de inflamación. El asma se acompaña de niveles elevados de IL-4, una citoquina proaterogénica que activa el endotelio vascular que conduce al reclutamiento y activación de células mononucleares, aumento de la expresión de la molécula de adhesión celular y estimulación de la producción de 15-lipooxigenasa, que puede oxidar las lipoproteínas de baja densidad. Además, los mastocitos juegan un papel central en el asma y las condiciones atópicas; estos mastocitos producen los cisteinil leucotrienos (C4, D4 y E4) e inducen inflamación crónica (72). Los estudios en animales han demostrado que las placas ateroscleróticas contienen niveles elevados de leucotrienos y esto reduce el reclutamiento de los monocitos y la progresión del ateroma.

Por tanto, puede haber varios mecanismos por los que la inflamación en el asma de inicio temprano y la atopía den como resultado una lesión arterial y un aumento del riesgo cardiovascular (71). De hecho, existen numerosos estudios al respecto donde se relaciona la presencia de asma con el riesgo cardiovascular a través de los procesos inflamatorios y por consiguiente de estrés oxidativo /nitrosativo que aparecen en este tipo de patologías (73).

1.2.7 Receptor de la Vitamina D (VDR)

La actividad del VDR afecta a la transcripción de al menos 913 genes, y presenta variantes genéticas relacionadas con su acción antimicrobiana (33). Por lo tanto, el papel que puede tener la vitamina D en el asma puede ser a través de su receptor (VDR) en células implicadas en la reacción inmunitaria tales como células presentadoras de antígeno y linfocitos T activados, en su efecto inmunomodulador y en el efecto directo sobre el músculo liso bronquial. Durante las dos últimas décadas, se han llevado a cabo numerosos estudios para identificar las variantes genéticas relacionadas con el riesgo de desarrollar asma como puede observarse en el artículo de Miriam F. Moffatt et al. (74). Se han aplicado diferentes tipos de análisis, incluyendo análisis de correlación, polimorfismos de nucleótidos en genes candidatos, y de asociación con genoma completo. La vitamina D puede ejercer un efecto directo en las vías respiratorias. El

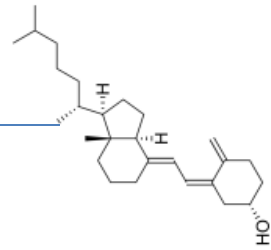


VDR está presente en los bronquios y las células musculares y la vitamina D, interactuando a través de él, pueden inhibir la proliferación muscular. Ha sido demostrado que la vitamina D puede influir en el crecimiento y la supervivencia de las células y, de esta manera, afectar las vías respiratorias y la remodelación, un aspecto importante de la patofisiología y el tratamiento del asma (57). Actualmente, se considera que diferentes regiones en 14-17 cromosomas pueden estar asociadas a asma y diferentes fenotipos. Entre ellos se encuentra el cromosoma 12, concretamente su región q13-23. Dado que el gen del receptor VDR se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 12 (75), diferentes estudios han tratado de asociar polimorfismos en el gen VDR con la susceptibilidad genética al asma (76).

La proteína que actúa como receptor de la vitamina D consta de 424 aminoácidos organizados en varios dominios con diferentes funciones:

- a) Aminoterminal, de unos 20 aminoácidos y de cuyas funciones se tiene poco conocimiento.
- b) C o de unión al ADN, de unos 70 aminoácidos.
- c) D o región puente, de unos 40 aminoácidos.
- d) E o carboxiterminal, de unión al ligando, de unos 293 aminoácidos. Este último dominio es de una alta complejidad y es el responsable de funciones muy especializadas, como la unión con alta afinidad al ligando, la unión a factores de transcripción y la dimerización con el receptor del ácido retinoico, que es un coactivador (38).

Por lo tanto, la actividad biológica del calcitriol incluye la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y se produce mediante su unión al receptor de la vitamina D (VDR, vitamina D receptor; GeneID: 7421) localizado en el núcleo de las células diana. Esta unión regula la transcripción de un amplio espectro de genes relacionados no solo con la homeóstasis de calcio y fósforo sino también con la división celular y con la diferenciación (35). Esta regulación genómica se realiza principalmente sobre los genes que poseen secuencias de unión para ello (VDRE o VDR elements). La proteína VDR pertenece a la clase II de receptores para hormonas esteroideas, estando muy relacionado con el receptor del ácido retinoico y el receptor de la hormona tiroidea.



Las funciones de la vitamina D se llevan a cabo a través de un mecanismo similar al de las hormonas esteroideas: entra en la célula atravesando la membrana plasmática en forma libre y uniéndose estrechamente al VDR dentro del núcleo donde se unirá a diferentes genes y regulará la síntesis de RNAm (49). El receptor VDR está presente en otros tejidos corporales que no están relacionados con la homeostasis del calcio y del fósforo, indicando que este receptor es capaz de tener otras actividades o al menos de unir otros ligandos. Dentro de estas actividades cabe destacar la regulación del ciclo celular, diferenciación celular y apoptosis.

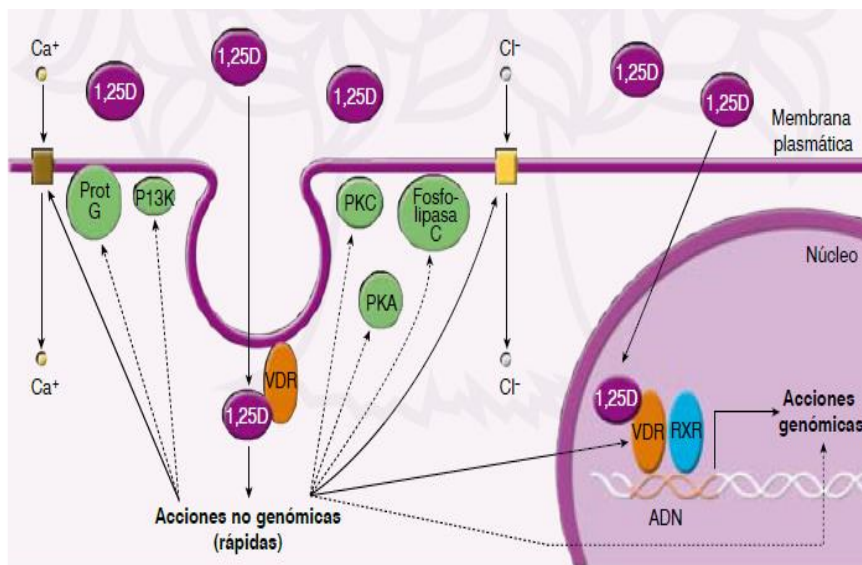
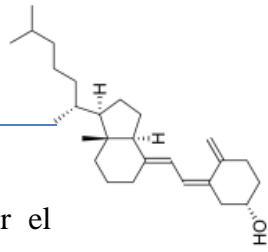


Figura 9: Principales mecanismos involucrados en las acciones genómicas y no genómicas de la 1,25 dihidroxivitamina D. Tomado de (27).

La Figura 9 muestra, en un modelo esquemático, como la 1,25 dihidroxivitamina D puede interactuar con el receptor VDR localizado en el núcleo. Esta interacción es capaz de generar respuestas genómicas a través de la regulación de la transcripción génica o puede también unirse a los VDR asociados a caveolas (invaginaciones en la membrana ricas en lípidos) de la membrana plasmática para de esta forma generar respuestas no genómicas, mediadas a través de segundos mensajeros que inducen respuestas rápidas o a través de la apertura de canales de calcio o cloro dependientes de voltaje. Estas acciones no genómicas pueden ser muy rápidas, capaces de desencadenarse en segundos, como en el caso de la apertura de canales iónicos, o en 10



a 60 minutos, como en el caso de la formación de segundos mensajeros. Por el contrario, las acciones genómicas pueden tardar horas o días en manifestarse completamente, debido al proceso que implica la regulación de la transcripción (27).

El VDR forma parte de la superfamilia de receptores nucleares esteroideos. En presencia de su ligando (Figura 10), la 1,25 dihidroxivitamina D, VDR y su pareja heterodimérica, el receptor retinoide X (RXR), actúan como un factor de transcripción uniéndose a los elementos de respuesta (VDR elements) presentes en regiones promotoras de los genes activando o reprimiendo su expresión (41, 51). En consonancia con otros factores de transcripción, este complejo induce la transcripción de genes respondedores a la unión de la vitamina D (39).

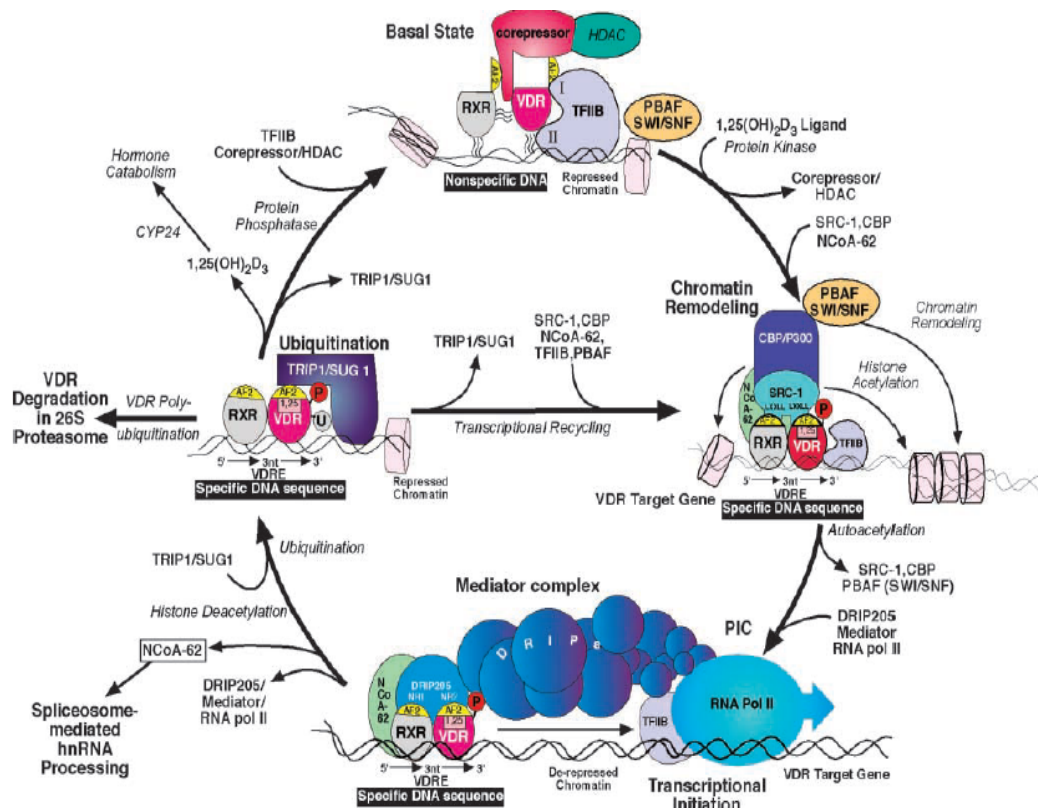
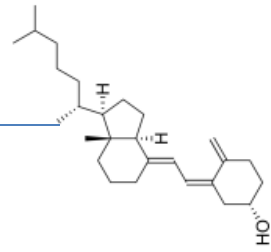


Figura 10: Modelo de los efectos transcripcionales de la 1,25 dihidroxivitamina D. En la imagen se observa como interactúa con su receptor VDR y su ligando RXR. Tomado de (35).



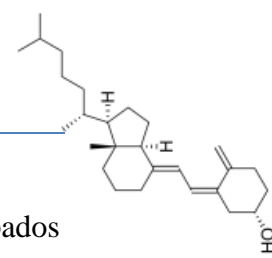
1.2.8 Polimorfismos en el receptor de la vitamina D (VDR)

Las disparidades en la prevalencia de asma entre sujetos provenientes de diferentes ubicaciones geográficas posiblemente estén asociadas con diferencias genéticas. Esta hipótesis se basa en la identificación del receptor de la vitamina D en células tales como las presentadoras de antígeno y linfocitos T activados. A nivel genético, se han identificado diversos polimorfismos en la vía de la vitamina D, incluyendo su receptor VDR, y se han asociado con riesgo de asma. El asma es una enfermedad compleja donde intervienen factores genéticos y ambientales. En nuestro estudio nos hemos centrado en la relación entre polimorfismos en el VDR y asma, pero también existen estudios que relacionan la aparición de asma con polimorfismos de los genes de IL-13, IL-10 e IL-1 (77).

La existencia en el genoma de un gen para el VDR con amplia actividad biológica ya fue demostrada en el año 1968 (78). A pesar de la existencia de numerosos estudios que demuestran que la vitamina D juega un papel en la patogénesis, severidad y respuesta al tratamiento del asma, la relación directa causa-efecto todavía no ha sido demostrada (61).

La forma activa de la vitamina D (1,25-dihidroxitamina D), también conocida como calcitriol, ejerce sus efectos al unirse al receptor nuclear de la vitamina D, denominado VDR. Tras la activación, el complejo de VDR ligando/receptor altera la transcripción de numerosos genes relacionados con la respuesta inmunitaria (40, 79). Por este motivo, cualquier alteración o polimorfismo que tenga lugar en la región codificante de este receptor puede tener importantes repercusiones.

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma. Los SNPs son abundantes en todo el genoma humano; se pueden encontrar en exones, intrones, promotores, potenciadores y regiones intergénicas, permitiendo su utilización como marcadores (80). Más de 300 genes tienen SNPs asociados con subtipos de asma y alergia según una búsqueda realizada en el sitio



web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Existen también 2.800 SNPs genotipados en 180 genes cuyas funciones están relacionadas con asma, y SNPs de 19 genes que están asociados con asma (80).

Seis SNPs localizados entre el intrón 2 y el exón 9 del gen VDR se han asociado con asma (40, 79). Entre ellos, según la bibliografía disponible, los más relacionados con el asma serían rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI) y rs731236 (TaqI) (Figuras 11 y 12) (76). Se ha descrito que los polimorfismos en el VDR podrían tener un papel crucial en la acción de la vitamina D (81).

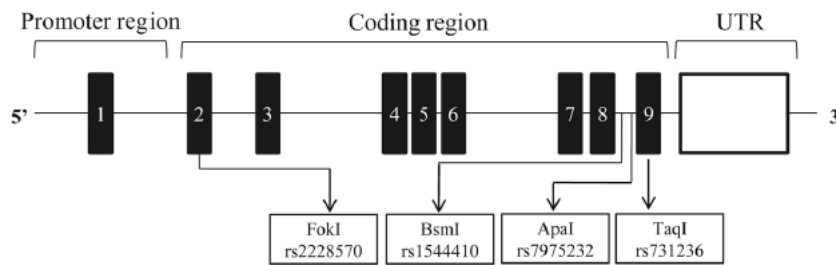
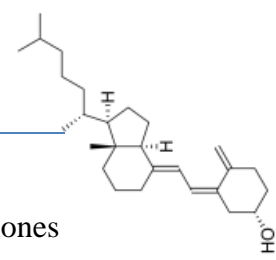


Figura 11: Organización genómica de VDR. Los exones están representados por cajas negras conectadas por una línea recta que representa a los intrones y regiones no codificantes. Los nombres de los SNPs analizados están representados por flechas debajo de la estructura genética. Tomado de (82).

SNP	Identificación	Localización	Cambio de nucleótido	Nomenclatura de los alelos
FokI	rs2228570	Exón 2	A>G	F>f
BsmI	rs1544410	Intrón 8	C>T	B>b
TaqI	rs731236	Exón 9	A>G	T>t
ApaI	rs7975232	Intrón 8	C>A	A>a

Figura 12. Polimorfismos del receptor VDR más relacionados con asma. Elaborada a partir de la información de (82) y su revisión en las bases de datos <https://www.gtexportal.org/home/snp/rs731236> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs731236>.

El SNP FokI (rs 2228570) conlleva una alteración de la estructura de la proteína VDR, que es tres aminoácidos más larga (427 aa) para los portadores del alelo G mutado que para los portadores del alelo A (424 aa) salvaje (“wild type”). Así, la variante alélica de este polimorfismo a nivel del exón codifica para un cambio

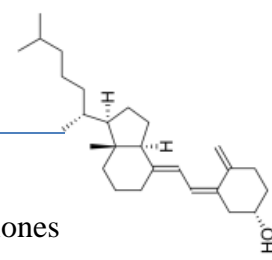


estructural que altera el receptor proteico VDR. Este cambio se asocia con alteraciones en la unión del factor de transcripción IIB (TFIIB) (83). Diversos estudios sugieren que esta variante podría modificar la actividad transcripcional de VDR sobre varios genes incluidos genes relacionados con el sistema inmunitario. Un VDR más largo (alelo G) conduce a una baja actividad transcripcional y a menores niveles de IL-12 y, por lo tanto, a una respuesta inmunitaria más pobre (42).

Apal (rs7975232) y TaqI (rs731236) son SNPs que están relacionados entre sí. No afectan a la estructura de la proteína VDR pero podrían afectar la estabilidad de su RNAm. Los polimorfismos en TaqI (rs731236) no resultan en cambios de la secuencia de aminoácidos, sin embargo, se ha visto que están asociados con muchas enfermedades metabólicas y del sistema inmunitario (84).

Son factores de riesgo comunes tanto para el asma como para la deficiencia de vitamina D, el estilo de vida, la raza / pigmentación de la piel y la obesidad (7, 29, 41, 85). Esta observación, junto con las evidencias crecientes de los efectos inmunomoduladores de la vitamina D, ha generado interés en explorar la relación existente entre estas dos condiciones. Ha tomado así fuerza la hipótesis que relaciona el aumento de la prevalencia del asma con niveles bajos de vitamina D (7, 86). Hasta el punto de que algunos autores consideran que la suplementación de vitamina D reduce la aparición de sibilancias (86).

Por otra parte, se ha visto una relación entre asma y riesgo cardiovascular (66, 67,68), que puede estar mediada a través de la inflamación y el estrés oxidativo/nitrosativo generado por la primera. Es bien conocido el efecto que tiene la vitamina D a nivel del sistema inmunológico y el asma, como hemos visto. También se ha observado que esta relación lleva asociado un aumento de estrés oxidativo que puede llegar a facilitar la aparición de eventos cardiovasculares aumentando el riesgo de estos. Se ha visto que el asma está relacionada con bajos niveles de vitamina D y a su vez está relacionada con mayor riesgo cardiovascular por lo que debemos de pensar que existe también relación entre este riesgo cardiovascular con los niveles de vitamina D y por lo tanto que polimorfismos en su receptor estén también asociados.



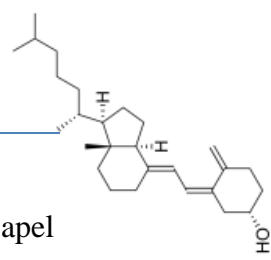
De todos estos estudios se discierne la necesidad de realizar más investigaciones para clarificar la asociación entre polimorfismos de genes implicados en las acciones de la vitamina D, asma y su relación con los parámetros de inflamación y de estrés oxidativo. Como hemos comentado, en los primeros años de vida, una alta proporción de niños, uno o dos de cada cinco, padecen síntomas respiratorios que pueden ser etiquetados, por sus pediatras, de asma. Sin embargo, se trata de síntomas que pueden confundirse con otro tipo de patologías respiratorias que pueden llevar al retraso en el diagnóstico y por lo tanto al tratamiento. La prevalencia del asma en nuestro medio y su progresivo aumento, el encontrarse en muchos casos insuficientemente diagnosticada, controlada y tratada y, por ser una enfermedad habitualmente manejada en Atención Primaria (AP), justifican sobradamente la realización de estudios que ayuden en su manejo.

Por lo tanto, ante estos hallazgos bibliográficos, nos planteamos confirmar si la presencia de asma alérgico a los ácaros del polvo tiene relación con el nivel de estrés oxidativo y de inflamación y, a su vez relacionar estos hallazgos con los niveles de vitamina D y los polimorfismos de su receptor (VDR).

1.3 JUSTIFICACION

A pesar de los numerosos estudios realizados, la relación entre vitamina D, asma y sus complicaciones siguen siendo objeto de discusión. Existen estudios que correlacionan bajos niveles de vitamina D con un aumento de ROS y mayor severidad de asma. A su vez, estos bajos niveles de vitamina D también se han relacionado con baja respuesta a los corticoesteroides, predisposición a la aparición de infecciones del tracto respiratorio (87), y perfiles metabolómicos con elevación de marcadores de estrés oxidativo (88, 89).

Se han descrito para la vitamina D y el asma efectos antagónicos sobre el estrés oxidativo y la inflamación que preceden a la disfunción endotelial y el deterioro vascular. Dado que los efectos de la vitamina D están mediados por la unión a su receptor VDR en las células diana, entre las que se encuentran diferentes tipos celulares



del sistema inmunitario, la posibilidad de que polimorfismos de VDR jueguen un papel en estos efectos ha sido evaluada. Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes debido, particularmente, a la heterogeneidad de las muestras poblacionales analizadas.

Es por todo lo expuesto por lo que nos hemos planteado este proyecto; para contribuir al mejor conocimiento de la relación entre ciertas variantes genéticas del receptor VDR, el nivel de vitamina D y la presencia de asma alérgico. Por otra parte, con la finalidad de analizar las interrelaciones metabólicas entre estos factores, también consideramos de gran importancia realizar un estudio más pormenorizado del efecto de estos polimorfismos en los marcadores de estrés oxidativo e inflamación, parámetros de riesgo cardiovascular y su relación con la vitamina D.

Todo esto justifica la necesidad de analizar el estado oxidativo/ nitrosativo y de marcadores de inflamación en los pacientes de nuestro estudio, y ver si éste se correlaciona con los niveles de vitamina D y determinados polimorfismos de su receptor.

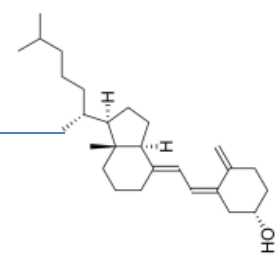
1.4 HIPOTESIS

Los polimorfismos en genes implicados en el ciclo de la vitamina D juegan un papel en enfermedades inmunológicas como el asma o atopia. Esto se puede relacionar con el nivel de vitamina D y puede influir en la presencia de marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo e inflamación que podría propiciar otros procesos como enfermedades cardiovasculares o degenerativas.

1.5 OBJETIVOS

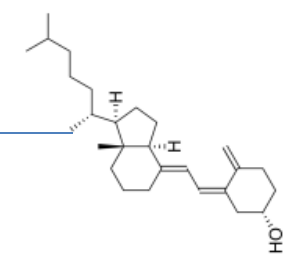
En base a lo expuesto, nos planteamos los siguientes **objetivos**:

1.5.1 Objetivo Principal: Valorar la relación de los polimorfismos del receptor de la vitamina D (FokI, ApaI y TaqI) con la presencia de asma alérgico a los ácaros del polvo



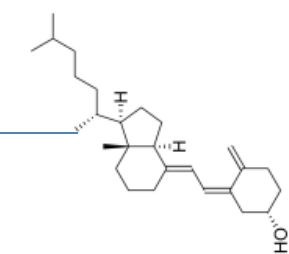
1.5.2 Objetivos Específicos:

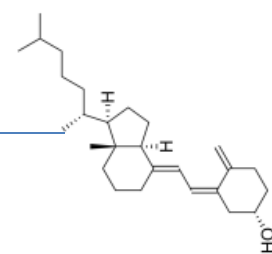
1. Evaluar los polimorfismos del receptor de la vitamina D en niños/as asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo, así como en niños/as sanos no alérgicos.
2. Valorar el estado inmunitario y alérgico en los grupos de estudio: niveles de citoquinas y factores de inflamación.
3. Valorar el estado oxidativo y nitrosativo: nitratos, isoprostanos.
4. Correlacionar los hallazgos genéticos con las características clínicas.
5. Correlacionar los hallazgos genéticos con los parámetros inmunitarios, de inflamación y de estrés oxidativo.



METODOLOGIA







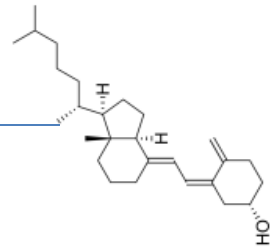
2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño

Estudio de casos y controles con muestreo consecutivo. Este tipo de estudio consiste en identificar a personas con una enfermedad (u otra variable de interés) y compararlas con un grupo control apropiado que no tenga la enfermedad. La relación entre los factores relacionados con la enfermedad se examina comparando la frecuencia de exposición a estos factores entre los casos y los controles. A este tipo de estudio, uno de los más utilizados en la investigación, se le podría describir como un procedimiento epidemiológico analítico, no experimental con un sentido retrospectivo, ya que partiendo del efecto, se estudian sus antecedentes, en el que se seleccionan dos grupos de sujetos llamados casos y controles según tengan o no la enfermedad.

2.2 Población de estudio

Ciento tres niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo (casos) y cincuenta y dos niños sanos (controles) los cuales hacen un total de un tamaño muestral de ciento cincuenta y cinco niños y adolescentes de ambos sexos (87 hombres y 68 mujeres). Se trata de niños/as con edades comprendidas entre 3 y 14 años de edad, de población española y raza caucásica. Se seleccionaron entre los remitidos por su pediatra de atención primaria a la Unidad de Alergia Pediátrica del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia, España) para estudio de posible asma alérgico o controles de salud y/o estudios familiares entre enero de 2016 y octubre de 2018. Ninguno de los niños padecía enfermedades infecciosas agudas, tomaba complementos vitamínicos o realizaba una actividad física intensa o frecuente. Los niños residían en la costa mediterránea española en una latitud de 39° 28' 48", en una región con una media de 2660 horas de sol al año. Se obtuvo el consentimiento por escrito para la inclusión en el estudio de los padres y/o tutores y/o niños > 12 años. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki (revisada en 2013), contando con la aprobación del comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario Dr. Peset (número de aprobación CEIC 27/12) (ver anexos incluidos en el epígrafe 7.2).



2.2.1 Niños asmáticos

2.2.1.1 Criterios de inclusión:

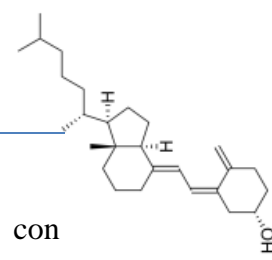
Pacientes de edades comprendidas entre los 3-14 años con asma alérgica episódica frecuente a ácaros del polvo considerada como:

- Episodios al menos una vez cada 5-6 semanas (máximo 6-8 crisis/año).
- Sibilancias a esfuerzos intensos.
- Intercrisis asintomáticas.
- Exploración funcional respiratoria en las intercrisis: FEV1 o VEMS (volumen espirado máximo en el primer segundo de la espiración forzada) >80%, variabilidad PEF (pico flujo espiratorio) <20%.
- Insuficientemente controlados con niveles bajos o medios de tratamiento (escalones terapéuticos 2-4 según la GEMA (Guía Española para el Manejo del ASMA)).
- Etiología alérgica mediada por IgE, monosensibilización a los ácaros del polvo, evaluada por prick test cutáneo y determinación de IgE específica en suero.
- Situación clínica-funcional estable.
- Ausencia de infecciones crónicas.
- Sin tratamiento con inmunoterapia específica, ni otro tratamiento de base inmunológica (Omalizumab).
- Población española y raza caucásica.
- Consentimiento firmado para su inclusión por los padres y/o tutores y/o niños >12 años.

A los pacientes seleccionados, una vez informados del estudio, y firmado el consentimiento para su inclusión, se les siguió clínica y analíticamente en Consultas Externas de Alergia Pediátrica del Hospital Universitario Dr. Peset.

2.2.1.2 Criterios de exclusión:

- Enfermo inestable.



- Asma grave no controlada mediante farmacoterapia y/o pacientes con obstrucción irreversible de las vías aéreas (VEMS por debajo del 70% del valor esperado tras tratamiento farmacológico adecuado).
- Enfermedades inmunopatológicas e inmunodeficiencias severas.
- Trastornos psiquiátricos o psicológicos graves.
- Imposibilidad de control clínico.
- Fiebre (temperatura rectal $\geq 38^{\circ}\text{C}$).
- No consentimiento firmado para su inclusión por los padres y/o tutores y/o niños >12 años.

2.2.2 Niños control

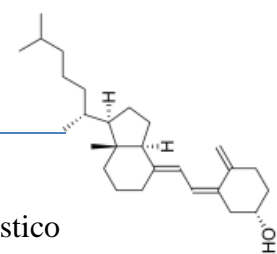
Niños/as sanos, que acuden a la consulta para controles de salud o por procesos menores no relacionados con asma o atopia, procedentes del Centro de Salud. Solo se reclutó a niños/as con un estado nutricional normal y que requerían extracción de sangre como parte de su protocolo clínico habitual.

2.2.2.1 Criterios de inclusión:

- Niños de ambos sexos, sanos, de edades comprendidas entre los 3-14 años, y que requiriesen seguimiento en consultas de pediatría general por motivos no relacionados con asma, infecciones, o alteración de la inmunidad.
- Población española y raza caucásica.
- Consentimiento firmado para su inclusión por los padres y/o tutores y/o niños >12 años.

2.2.2.2 Criterios de exclusión: Los mismos que los registrados en los casos

La selección de los pacientes pediátricos se realizó a través del **Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset** donde se efectúa el estudio clínico, diagnóstico y tratamiento. La selección de los pacientes se realizó entre los niños que acudían a la consulta para su seguimiento rutinario, que cumplieran los criterios de inclusión en el estudio y que, tras informar del mismo, aceptaron participar. El diagnóstico de asma se efectuó mediante espirometría basal y test de broncodilatación



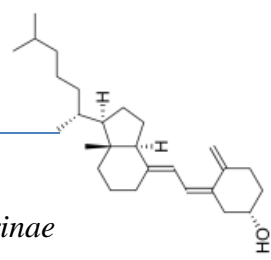
en los niños mayores de 5 años. En los preescolares menores de esta edad el diagnóstico se realizó basándose en criterios clínicos. A todos los padres se les informó por escrito, mediante una Hoja de Información al Paciente (ver anexo), del objetivo del estudio, e indicando que en ningún momento se les trataría de manera diferente a la práctica clínica habitual o a como se haría si no fuera a recogerse esa información. En una primera visita, se confirmó el cumplimiento de los criterios de inclusión y no exclusión, y se procedió también a la realización de la anamnesis.

Posteriormente, y en el mismo centro, se realizaron la extracción de sangre y las pruebas analíticas rutinarias. Las muestras de sangre venosa (10 ml) se obtuvieron tras un ayuno nocturno de 12 horas en 2 tubos de 5 ml; uno con EDTA, para la obtención de sangre total y plasma, y otro en tubo seco con gelosa para la obtención del suero. Las extracciones de sangre se realizan siguiendo el protocolo habitual del centro y por personal especializado del mismo. Inmediatamente fueron procesadas para la obtención de las muestras a utilizar en ulteriores determinaciones (plasma/suero/sangre total). Las muestras fueron derivadas a los laboratorios de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset para realizar las valoraciones de los parámetros bioquímicos de rutina, y a los de la Unidad de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia para la valoración de parámetros de inflamación y otras determinaciones experimentales.

2.3 Variables del estudio

2.3.1 Parámetros Clínicos

Junto a la recopilación de la incidencia de síntomas alérgicos (sibilancias, tos, disnea), se realizó a todos los niños asmáticos incluidos en el estudio, según las directrices de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (90), una valoración alergológica del asma mediante: 1) una prueba de punción cutánea (prick) positiva a los alérgenos de los ácaros del polvo doméstico utilizando un extracto estandarizado de *D. pteronysinnus* y *D. farinae* (Laboratorios Leti, SL, Madrid, España); la prueba se consideró positiva si se obtuvo una respuesta inmediata con un



tamaño de la roncha $\geq 3 \text{ mm}^2$, y 2) IgE específica positiva ($> 0,35 \text{ KU/l}$) para *D. farinae* y *D. pteronysinnus*, determinada por CAP SYSTEM-FEIA (Phadia, Uppsala, Suecia). Se utilizó como control positivo del prick test la histamina y como control negativo suero salino.

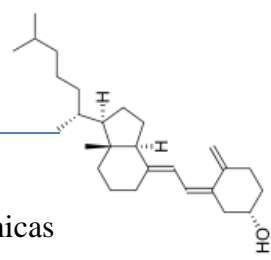
Con la finalidad de recopilar la máxima información relevante para el estudio, todas las Historias Clínicas de los casos y controles se revisaron con el programa informático Orion Clinic, el sistema de información clínico-asistencial para los centros hospitalarios de la Comunitat Valenciana utilizado en este caso en el Hospital Universitario Dr. Peset.

2.3.1.1. Analítica clínica

En este estudio se han evaluado parámetros hematológicos (hemograma, incluyendo eosinófilos absolutos); de bioquímica convencional (glucosa, urea, creatinina, colesterol total y sus fracciones HDL, LDL y VLDL, triglicéridos, GOT, GPT, GGT y PCR ultrasensible); y relacionados específicamente con la temática del trabajo como los niveles de inmunoglobulinas totales (IgG, IgA, IgM e IgE) e IgE específica frente a los ácaros del polvo (*D pteronysimus* y *D farinae*). También se han analizado para todos los pacientes los niveles de vitamina D (25-OH vitamina D). Estas determinaciones se han llevado a cabo en el **Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset**. En el anexo se muestra el escrito de conformidad de la Jefa del Servicio de Análisis Clínicos.

Hematología: La obtención de los parámetros hematológicos se realizó en sangre venosa obtenida en tubos con anticoagulante EDTA, mediante el autoanalizador Coulter LH750 Analyzer de Beckman Coulter. El hemograma se determinó para poder conocer el nivel de eosinófilos de los pacientes.

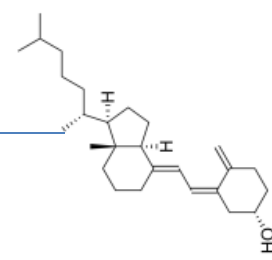
Bioquímica: Las determinaciones bioquímicas de rutina se realizaron en suero. Para su obtención, la sangre venosa extraída en tubos con gelosa se mantuvo 15-20 min a temperatura ambiente (TA) (tiempo requerido para la retracción del coágulo), y se centrifugó a 3250 rpm 5 min. Los niveles de glucosa, urea, creatinina, colesterol total y



HDL, triglicéridos, GOT, GPT, y GGT se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas automatizadas en el autoanalizador Abbot Architect c16000 (Abbott Clinical Chemistry Abbott Park, IL, USA). Los niveles de colesterol LDL y VLDL se calcularon mediante la fórmula de Friedewald (91) y el cociente triglicéridos/5, respectivamente. La proteína C reactiva se determinó mediante un procedimiento ultrasensible (hs-PCR) en el autoanalizador Beckman Coulter Image 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Los niveles séricos de vitamina D (forma 25-hidroxivitamina D) se cuantificaron mediante inmunoensayo electroquimioluminiscente en el autoanalizador COBAS 6000 de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) utilizando los reactivos suministrados por la misma casa comercial.

Los niveles de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM se determinaron por nefelometría cinética mediante el autoanalizador Image 800 de Beckman Coulter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). La nefelometría mide la luz dispersada por la muestra mediante un detector dispuesto en un ángulo entre 15 y 90° respecto a la luz incidente que, en este equipo, es un rayo láser de 670 nm.

Las determinaciones de IgE e IgE específica para los ácaros del polvo *D pteronissimus* y *D farinae* se realizaron por enzimoimmunoensayo fluorescente automatizado con el sistema Immuno-CAP 250 de Phadia (CAP SYSTEM-FEIA; Phadia, Uppsala, Suecia). El Immuno-CAP FEIA es un sistema *in vitro* para la cuantificación de anticuerpos IgE. La prueba está diseñada como un inmunoanálisis tipo sándwich en el que el antígeno (antígenos) específico está unido de forma covalente a una fase sólida en el interior de una cápsula tridimensional. En contacto con la muestra de suero del paciente, se produce el reconocimiento antígeno-IgE específica y, con ello, la retención de la IgE de interés en la cápsula. Tras retirar el suero mediante lavado, la cantidad de IgE retenida se cuantifica añadiendo un anticuerpo Anti-IgE unido a un enzima capaz de generar, en presencia de una mezcla de reacción que contiene el sustrato adecuado, un compuesto fluorescente que es eluido de la cápsula y cuantificado. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de IgE específica en la muestra de suero, cuantificándose por comparación con un estándar procesado en paralelo. El rango de medida se encuentra en el intervalo 0.35–100 kUA/l, con un valor de corte para positividad de 0.35 kUA/l.



2.3.2 Análisis Experimentales

Las determinaciones experimentales se realizaron en la **Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia**, en colaboración entre los departamentos de **Pediatría, Obstetricia y Ginecología** y de **Bioquímica y Biología Molecular**

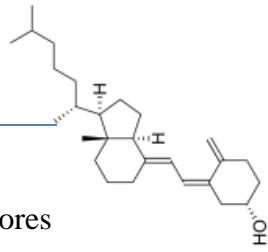
- **Determinación de marcadores inflamatorios: IL-6, TNF- α e Interferón- γ**

La determinación en suero de las citoquinas IL-6, TNF- α e IFN- γ se llevó a cabo mediante un método multiplexado con el sistema LabScan 100 de Luminex Map Technology (Luminex, Austin, TX, USA) y el kit de microesferas de alta sensibilidad para citoquinas Milliplex MAP human adipokine Magnetic Beads MAP HSTCMAG-28 SK de Merck (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). Los coeficientes de variación (CV) inter e intraensayo para TNF- α fueron <20% y 10%, respectivamente; <15% y <10% para IL-6; y <20% y <5% para IFN- γ . La sensibilidad estuvo entre 0,11 y 8,17 pg/ml y la precisión entre el 98 y el 107%.

La tecnología Luminex es una técnica multiparamétrica que posibilita el análisis simultáneo de hasta 100 analitos distintos de una misma muestra en un solo pocillo. En ella, las citoquinas presentes en la muestra de suero se unirán a microesferas fluorescentes de poliestireno que actuarán tanto en su identificación como en su ulterior cuantificación al hacerlas pasar por un citómetro de flujo. En nuestro caso, los resultados se analizaron y cuantificaron utilizando el sistema LabScan 100 de Luminex equipado con el software 3.1.

- **Indicadores de estrés oxidativo/nitrosativo**

En el presente trabajo se han determinado los niveles de 8-isoprostaglandina F 2α (8-iso-PGF 2α) y nitratos como indicadores de estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente.



Los niveles de isoprostanos se han valorado en nuestro estudio como indicadores del daño oxidativo a lípidos. Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación aleatoria del ácido araquidónico de los fosfolípidos por ROS (Figura 13). Son fácilmente cuantificables en plasma y orina y sus niveles se elevan en condiciones de estrés oxidativo. Uno de los isoprostanos, el 8-isoprostano (8-iso-prostaglandina F2 α ; 8-iso-PGF2 α), ha mostrado tener actividad biológica, siendo un potente vasoconstrictor pulmonar y renal, y sus niveles se han propuesto como un marcador de deficiencia antioxidante y estrés oxidativo (92).

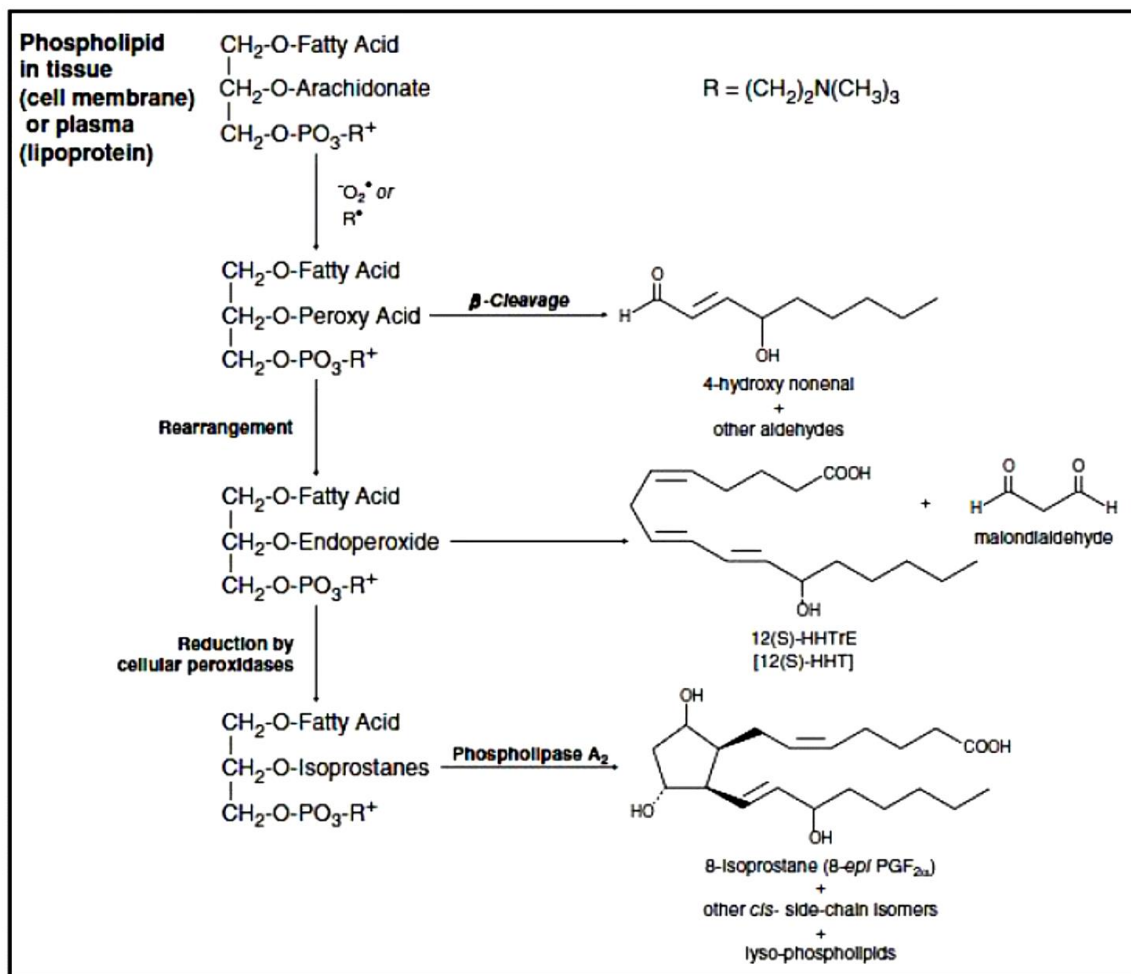
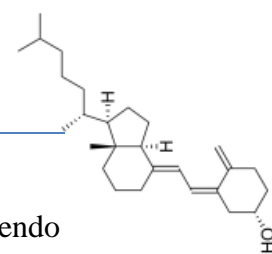


Figura 13. Generación de 8-isoprostano y malondialdehído (MDA) durante la oxidación aleatoria del ácido araquidónico de los fosfolípidos tisulares por ROS. (Tomado de 8-isoprostane EIA, Cayman).

Los niveles séricos de 8-iso-PGF2 α se cuantificaron mediante enzimoimmunoensayo colorimétrico competitivo (8-isoprostane EIA Kit N° 516351;

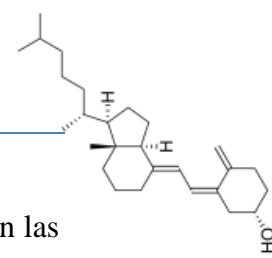


Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) en placas de 96 pocillos siguiendo exactamente las condiciones descritas por el fabricante. Este ensayo se basa en la competencia entre el 8-isoprostano de la muestra y un conjugado de 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (AChE; Tracer) por un número limitado de sitios de unión para 8-isoprostano (antisuero de conejo para 8-isoprostano).

Para las determinaciones, las muestras de suero se diluyeron previamente (1/30) en tampón de ensayo, y 50 μL se distribuyeron en la placa junto con estándares (0,8-500 pg/mL) que se procesaron en paralelo. La sensibilidad del ensayo fue del 80%, con CV inter- e intraensayo de $<20\%$ y $<9.5\%$, respectivamente, y un límite de detección de 3 pg/mL. Las lecturas de la absorbancia se realizaron a 412 nm en el lector de placas Perkin Elmer VICTOR X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

La cuantificación de la producción de óxido nítrico se valoró en nuestro estudio por los niveles séricos de nitrato + nitrito (NO_x ; los productos finales estables del metabolismo del NO), de acuerdo con el procedimiento descrito por Moshage et al (93). Se trata de un método colorimétrico basado en la reacción del nitrito con el reactivo de Griess, y que requiere de la transformación previa del nitrato en nitrito. En el procedimiento seguido hemos utilizado para dicha conversión nitrato reductasa (cristalina de *Aspergillus spp*; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), un enzima que requiere para su funcionamiento de NADPH que, en exceso, interfiere con el desarrollo ulterior del color. Para eliminar esta interferencia, tras la conversión del nitrato en nitrito, se añadieron al medio de reacción lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato que permiten la conversión del piruvato a lactato en presencia de NADPH. Finalmente, el nitrito reacciona con los componentes del reactivo de Griess (ácido sulfanílico y naftiletildiamina en medio ácido) generando un cromóforo diazoico (p-sulfobenceno-azo- α -naftil-amina) que absorbe fuertemente a 540 nm (Figura 14).

Las determinaciones se realizaron utilizando 50 μL de suero y, para evitar interferencias, en todo el procedimiento se utilizó material de plástico lavado cuidadosamente con agua Milli-Q de grado reactivo. La lectura final de la absorbancia se realizó a 540 nm en placas de 96 pocillos utilizando el lector Multiskan EX (Thermo



Lab Systems, Helsinki, Finland). Para el cálculo de las concentraciones de nitrato en las muestras procesadas, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en curvas patrón construidas paralelamente con cantidades conocidas de nitrato (1-200 μM). El límite de detección del ensayo fue del orden de 1,5 μM .

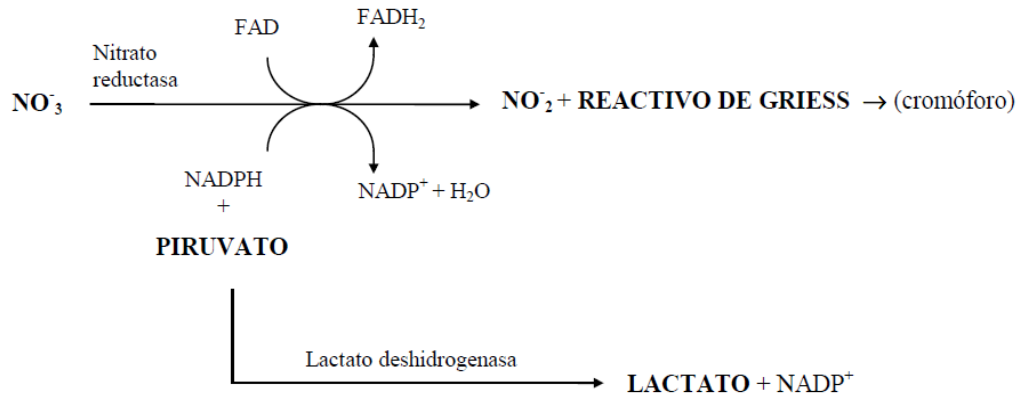
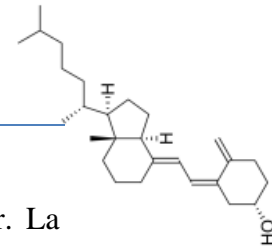


Figura 14: Esquema del procedimiento seguido para la cuantificación de Nitrato + Nitrito (NO_x) como indicadores de la producción de NO.

- **Genotipado de SNPs del VDR**

En el presente trabajo se han genotipado las variantes alélicas rs2228570 A>G (FokI), rs7975232 C>A (ApaI) y rs731236 A>G (TaqI) del VDR. Para ello se utilizó ADN genómico aislado de muestras de sangre periférica utilizando el kit QIAamp DNA mini blood kit de Qiagen Hilden Germany (suministrado por Izasa, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El rendimiento a partir de 200 μl de sangre anticoagulada con EDTA fue de 20-35 μg de ADN de gran pureza. La concentración y pureza del ADN aislado se determinaron mediante espectrofotometría UV midiendo, respectivamente, la absorbancia a 260 y el cociente $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ nm, utilizando para ello el equipo Biocell Plus Lambda Bio XLS de Perkin Elmer (Houston Texas, EEUU).

Una vez obtenido el ADN, se procedió a su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando el sistema QuantStudio 3 and 5 Real Time PCR (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) en placas de 384 pocillos y 0.1 mL por pocillo qPCR Thermal Cyclers. Se usaron 2.5 μL totales de ADN



molde a una concentración de 5 µg/mL utilizando condiciones de ciclo estándar. La lectura de la placa se realizó con el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se analizó con el “TaqMan Genotyper Software” 2.4 de la misma casa comercial.

Tras la amplificación, se procedió a realizar la discriminación alélica y el genotipado a partir de alícuotas de ADN con una concentración mínima de 15 ng/µL. Se realizó utilizando sondas Taqman SNPs prediseñadas por la empresa Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en placas de 96 pocillos con una proporción mínima de 10% de muestra de ADN. Finalmente, los resultados obtenidos para cada muestra (curvas de amplificación para cada alelo; discriminación alélica homocigoto / heterocigoto) fueron analizados mediante el Software QuantStudio Real Time PCR System (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Figura 15).

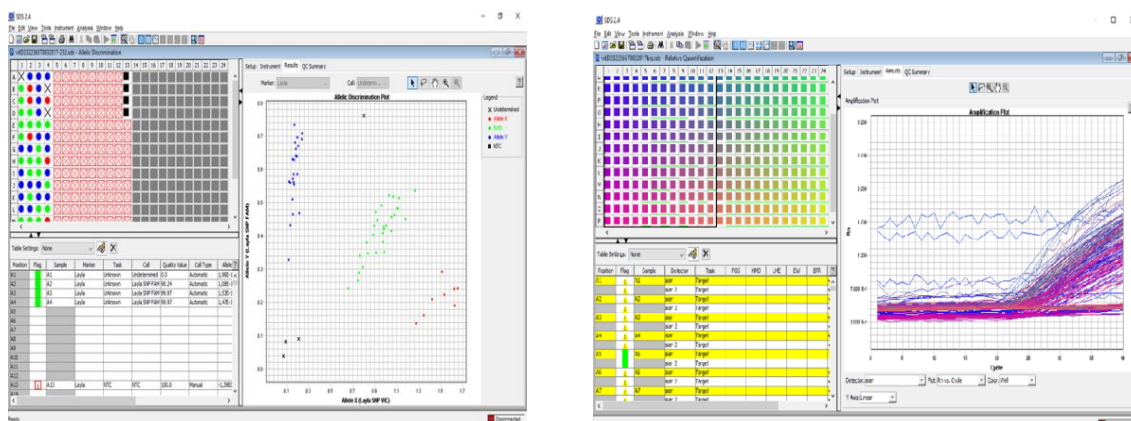
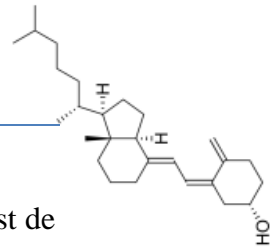


Figura 15: Imagen ilustrativa de la obtención de los datos de discriminación alélica (derecha) y genotipado (izquierda).

2.4 Análisis estadístico

El análisis de las variables tanto analíticas como experimentales incluidas en el estudio se ha realizado con los programas informáticos Excel de Microsoft Corp (Redmon, Washington, USA) e IBM SPSS (IBM SPSS Statistics v 25). Las variables se expresan como media ± error estándar de la media (SEM). La distribución de las variables se analizó mediante la prueba de Kolmogorov Smirnof. Tras comprobar que todas ellas se ajustaban a una distribución no normal o asimétrica, para estimar la

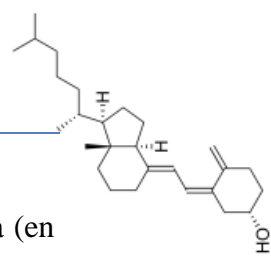


existencia de diferencias significativas entre los casos y los controles se utilizó el test de Kruskal Wallis. En todos los casos la significación estadística se estableció a partir de un valor de $P \leq 0,05$.

El análisis de asociación entre los SNPs de VDR y las variables clínicas y analíticas se efectuó con el programa estadístico SNPStats (Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, España) disponible en <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/>. Se trata de una aplicación Web desarrollada desde un punto de vista genético-epidemiológico para analizar estudios de asociación. Como principales habilidades incluye: análisis descriptivo, test del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y unión de desequilibrio. Permite llevar a cabo análisis de un único SNP (modelos de herencia y análisis de interacciones) y de múltiples SNPs (frecuencia de haplotipos, análisis de asociaciones de haplotipos con la respuesta, incluyendo análisis de interacciones) (94).

La distribución de frecuencias alélicas y el patrón de haplotipos se analizaron para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento como poblaciones únicas. Las asociaciones que vinculan parámetros bioquímicos, marcadores de inflamación y estrés oxidativo/nitrosativo con los genotipos SNP se determinaron mediante modelos de regresión lineal que consideraron cinco modos de herencia (codominante, dominante, recesivo, aditivo y sobredominante). Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo; se aplicó la evaluación de criterio de información más baja de Akaike y Bayesiano. Se realizó una prueba de comparación múltiple (test de Dunnett) para evitar la tasa de falsos positivos (error tipo I).

Como se ha comentado anteriormente el programa SNPStats divide el análisis de asociación en modelos de herencia, que se diferencian entre ellos en el número de copias del alelo recesivo necesarias para producir un efecto beneficioso (factor protector) o perjudicial (factor de riesgo). En el modelo codominante cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo asume que puede haber un riesgo distinto de los individuos heterocigotos y homocigotos variantes respecto a los homocigotos normales. En el



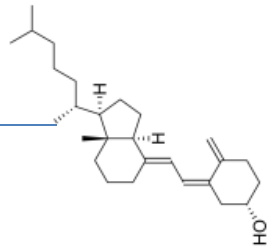
modelo aditivo se asume que cada copia modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto los homocigotos tienen el doble de riesgo que los heterocigotos.

Este modelo también se conoce como multiplicativo ya que modela los efectos en la escala de odds. Una ventaja importante de este modelo es que no necesita que se cumpla el HWE. En el modelo dominante una única copia es suficiente para modificar el riesgo y ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos y homocigotos tienen el mismo riesgo. En este modelo se asume que basta con tener un alelo variante para conferir riesgo. Y finalmente para el modelo recesivo se asume que son necesarias dos copias para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente tienen el mismo riesgo. Es necesario tener las dos copias del alelo variante para presentar el riesgo o la enfermedad. Existe también un modelo de herencia “log aditivo” (log additive), un modelo de herencia aditivo en el cual tener los dos alelos mutados multiplica el valor porque es en escala logarítmica (95, 96).

Para determinar qué modelo de herencia se ajusta mejor a cada SNP se utilizó el criterio de la Información Akaike (AIC). El menor AIC correspondería al mejor modelo de herencia. Este suele corresponderse, en la mayoría de los casos, con un valor de p menor.

Para las pruebas de asociación de las variables cuantitativas el programa SNPStats se basa en modelos de regresión lineal. Los resultados se presentan como medias, el error estándar de la media, las diferencias medias de la variable con respecto a una categoría de referencia (el genotipo más frecuente o haplotipo) y el intervalo de confianza (IC) del 95% de las diferencias. Sin embargo, para las pruebas de asociación de las variables binarias, el programa SNPStats utiliza modelos de regresión logística. La descripción se hace para cada grupo y los resultados se presentan como frecuencias genotípicas, proporciones, odds ratios (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95%.

En la Figura 16 se muestran imágenes del programa informático con las diferentes ventanas a las que se puede acceder para introducir los datos y obtener los resultados.



Step 1: Data uploading

Upload a file from your computer with a suitable format: Examinar...

You can also paste your SNP data here (with the same format):

You can try with these [sample data](#)

Choose your column delimiter: Choose your delimiter -->

First row contains column names: Choose one -->

Missing code (specify only if different than "NA" or empty values):

Clear form Step 2: Data preprocessing >>>

© 2005 Institut Català d'Oncologia. [Terms of use](#)

Step 2: Data preprocessing

In this step you can see some information obtained for each one of the columns of your data matrix. Please check that the type we assume for every one of them is correct. If there is a SNP column which is considered by the software as a covariate please check your data, as there may be a mistake in your data file. The default reference category for each SNP is the most frequent homozygote, and for the covariates the first in alphabetical order. All SNPs and covariates not explicitly discarded will be included in the analysis. Only one variable of type "Status" is allowed.

File name:

Number of processed rows: 706
 Number of processed columns: 10
 Column headers: Yes

Column	Name	Type	Number of different values	Number of missings	Category order	Include SNP/covariate
1	ID	Quantitative covariate	706	0		<input type="checkbox"/>
2	SNP1	SNP	3	21	C/C (287) C/G (302)	<input checked="" type="checkbox"/>
3	SNP2	SNP	3	71	T/T (255) T/C (254)	<input checked="" type="checkbox"/>
4	SNP3	SNP	3	24	C/C (523) C/A (147)	<input checked="" type="checkbox"/>
5	SNP4	SNP	3	64	C/C (538) C/G (97)	<input checked="" type="checkbox"/>
6	SNP5	SNP	3	57	G/G (395) G/T (207)	<input checked="" type="checkbox"/>
7	STATUS	Status	2	0	0-Control (329) 1-Case (377)	<input checked="" type="checkbox"/>

Step 3: Analysis customization

In this section you can decide what kind of analysis you want to perform with your data. Please choose among the following:

- Descriptive statistics**
- Single-SNP analysis**
 - Allele frequencies
 - Genotype frequencies
 - Hardy-Weinberg equilibrium
 - SNP association with response
 - Check for interactions between SNPs and covariates: All SNPs | SEX
- Multiple-SNP analysis**
 - Linkage disequilibrium (statistics: D D' r P-values)
 - Haplotype frequencies estimation -> Frequency threshold for rare haplotypes: 0.01
 - Haplotype association with response

For descriptive statistics and SNP analysis, perform analysis on subpopulations? (only applies if status is categorical) Yes No

<<< Step 2: Data preprocessing Get my results! >>>

Single-SNP analysis

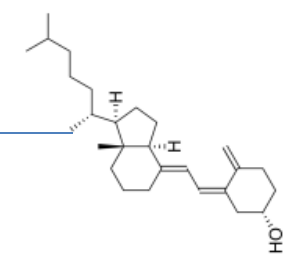
SNP: **snp1.232**

Percentage of typed samples: 61/73 (83.56%)

snp1.232 association with response Colesterol.total (n=61, crude analysis)

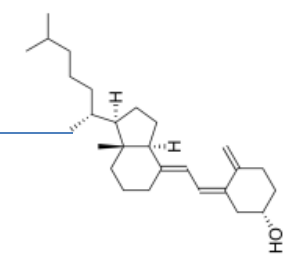
Model	Genotype	n	Response mean (s.e.)	Difference (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	23	155.48 (4.19)	0.00			
	A/C	30	171.37 (6.14)	15.89 (0.35 - 31.43)	0.074	587.2595.6	
	A/A	8	151.5 (10.21)	-3.98 (-26.99 - 19.04)			
Dominant	C/C	23	155.48 (4.19)	0.00			
	A/C-A/A	38	167.18 (5.41)	11.71 (-3.36 - 26.77)	0.13	588.3594.6	
Recessive	C/C-A/C	53	164.47 (4.04)	0.00			
	A/A	8	151.5 (10.21)	-12.97 (-34.78 - 8.83)	0.25	589.3595.6	
Overdominant	C/C-A/A	31	154.45 (3.99)	0.00			
	A/C	30	171.37 (6.14)	16.92 (2.66 - 31.17)	0.024	585.3591.6	
Log-additive	---	---	---	2.84 (-8.26 - 13.94)	0.62	590.4596.7	

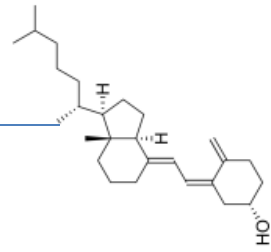
Figura 16: Programa estadístico SNPStats.



RESULTADOS







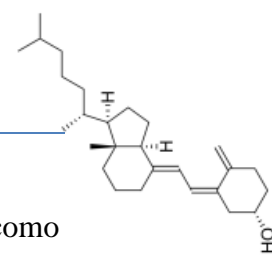
3. RESULTADOS

3.1 Análisis comparativo entre niños asmáticos y controles de los parámetros incluidos en el estudio

Tabla 1: Características antropométricas y analíticas de las poblaciones de estudio

	CASOS (N = 103)	CONTROLES (N = 52)	P-VALOR
Niños/niñas (N/N)	60/43	32/20	0,779
Edad (años)	9,64 ± 0,33	9,69 ± 0,45	0,744
GLUCOSA (mg/dL)	89,87 ± 1,18	88,73 ± 1,19	0,599
CREATININA (mg/dL)	0,639 ± 0,01	0,633 ± 0,01	0,124
UREA (mg/dL)	29,14 ± 0,69	31,06 ± 0,94	0,832
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	157,4 ± 2,89	162,6 ± 4,64	0,318
HDL-COLESTEROL (mg/dL)	52,96 ± 1,13	53,13 ± 1,74	0,670
LDL-COLESTEROL (mg/dL)	90,56 ± 2,77	94,42 ± 3,98	0,197
VLDL-COLESTEROL (mg/dL)	13,73 ± 0,78	12,63 ± 0,74	0,254
AST (U/L)	25,01 ± 1,26	26,29 ± 1,33	0,136
ALT (U/L)	18,88 ± 1,15	19,27 ± 1,49	0,713
GGT (U/L)	14,42 ± 1,07	13,30 ± 0,45	0,796
PCR ULTRASENSIBLE (mg/L)	5,99 ± 2,53	1,96 ± 0,44	0,195
IgG (mg/dL)	1059 ± 26,16	1011 ± 41,47	0,135
IgA (mg/dL)	144,6 ± 7,58	122,8 ± 10,02	0,090
IgM (mg/dL)	116,0 ± 5,21	113,1 ± 7,59	0,843
IgE TOTAL (kU/L)	859,9 ± 94,03	119,1 ± 37,76	<0,001
IgE <i>D. Pteronysimus</i> (kUA/L)	65,6 ± 4,35	4,3 ± 2,63	<0,001
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	63,7 ± 4,41	39,79 ± 2,19	<0,001
VITAMINA D (ng/mL)	27,32 ± 0,95	32,14 ± 1,36	0,008
EOSINOFILOS (%)	0,596 ± 0,04	0,406 ± 0,08	<0,001
IL-6 (pg/mL)	4,19 ± 0,67	3,4 ± 0,41	0,360
IFN-γ (pg/mL)	12,83 ± 0,17	12,70 ± 0,16	0,965
TNF-α (pg/mL)	8,30 ± 0,72	9,26 ± 1,08	0,766
ISOPROSTANOS (pg/mL)	58,28 ± 7,38	73,94 ± 14,24	0,587
NITRATOS (μM)	35,55 ± 3,68	36,22 ± 3,87	0,932

Niveles expresados como media ± error estándar de la media (SEM). Valores de p obtenidos directamente en el test Kruskallis-Wallis. AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma-glutamyl transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN-γ: Interferon gamma; TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral alfa.



Los niveles séricos de los parámetros bioquímicos, tanto analíticos como experimentales, inflamatorios y de estrés oxidativo evaluados en nuestro estudio con un tamaño muestral de 103 niños asmáticos y 52 controles se resumen en la Tabla 1. Destacar la homogeneidad de ambos grupos respecto a la edad ($9,64 \pm 0,33$ vs $9,69 \pm 0,45$ años) y relación niños/niñas (58% vs 61%) para los grupos alérgico y control, respectivamente.

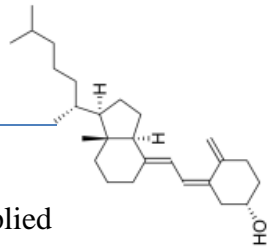
Como puede observarse, y cabría esperar, existen diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de carácter alérgico entre los niños con asma alérgica a los ácaros del polvo y los niños sin ninguna patología alérgica. Así, el grupo de pacientes asmáticos presenta niveles significativamente elevados de IgE total ($p < 0,001$), IgE específicas para *D Pteronysimus* ($p < 0,001$) y *D Farinae* ($p < 0,001$), y porcentaje de eosinófilos ($p < 0,001$).

Respecto al resto de parámetros analizados, sus valores se encontraban dentro del rango normal en ambos grupos, incluidos los niveles séricos de vitamina D. No se observaron diferencias significativas entre los grupos asmático y control excepto para los niveles de vitamina D que fueron ligera pero significativamente inferiores ($p = 0,008$) en los niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo.

3.2 Análisis comparativo entre niños asmáticos y controles de las frecuencias de los SNPs de VDR evaluados en el estudio

Los SNP de VDR FokI, ApaI y TaqI se genotiparon con éxito en más del 99% de las muestras de ADN y los resultados se ajustan a la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). El análisis de ligamiento reveló equilibrio entre FokI y ApaI ($D' = 0,29$, $r^2 = 0,040$) y TaqI ($D' = 0,37$, $r^2 = 0,036$) SNPs y desequilibrio entre ApaI y TaqI ($D' = 0,91$, $r^2 = 0,452$).

El análisis de los SNP se realizó a partir de muestras de ADN con una concentración media de $30,45 \pm 12,2$ ng/ μ l y una pureza media de $1,78 \pm 0,17$. Tras amplificación mediante la técnica de PCR de las secuencias de ADN de interés, se procedió a la identificación de los SNPs mediante el genotipado y discriminación alélica



de cada uno de los polimorfismos de estudio con el programa SDS 2.4 de Applied biosystems. La discriminación alélica es el proceso por el cual se detectan en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido. Para ello se emplean sondas específicas de alelos o variantes génicas, que están diseñadas para unirse con la secuencia diana (hibridar) sólo cuando se aparean perfectamente. En las figuras 19, 20, 21 y 22 se muestran imágenes ilustrativas del proceso de genotipado y discriminación alélica para los tres polimorfismos de estudio con el programa SDS 2.4 de Applied biosystems.

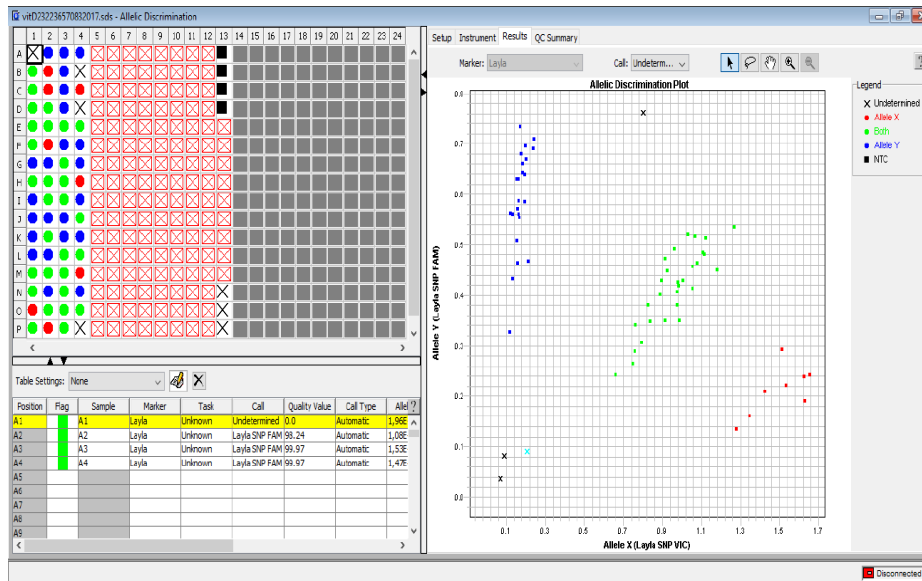


Figura 17: Genotipado SNP Apai

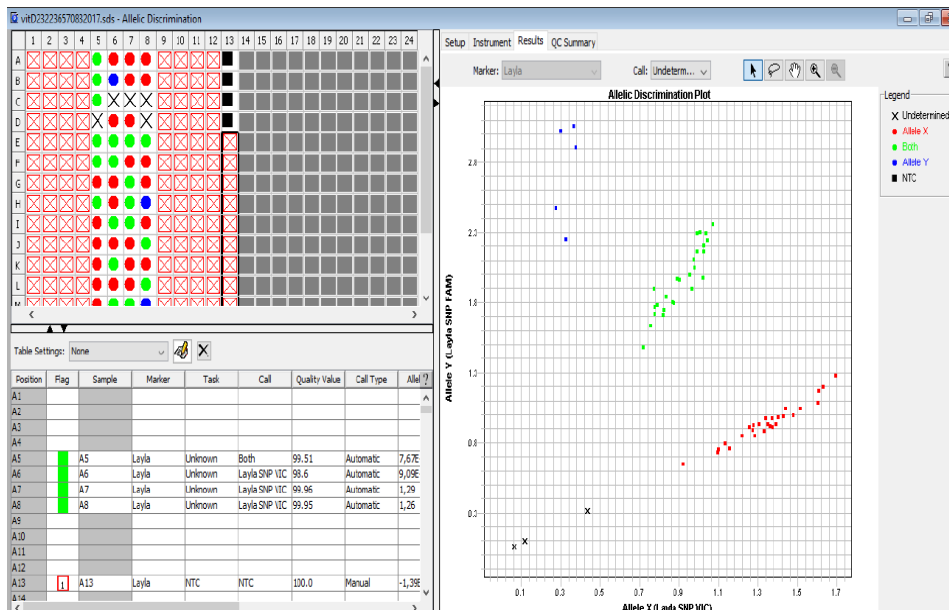


Figura 18: Genotipado SNP TaqI

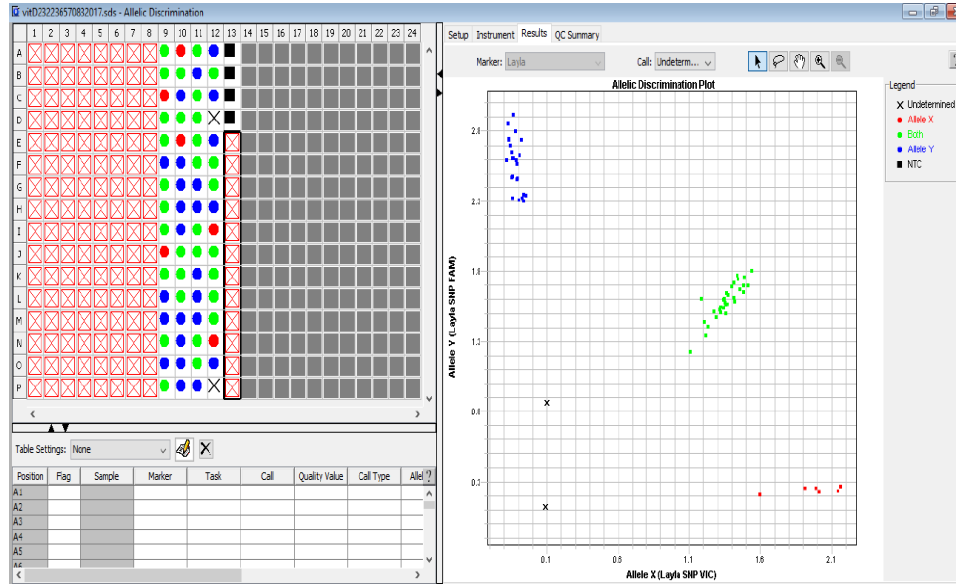
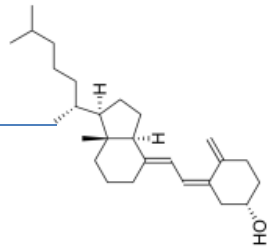


Figura 19: Genotipado SNP FokI

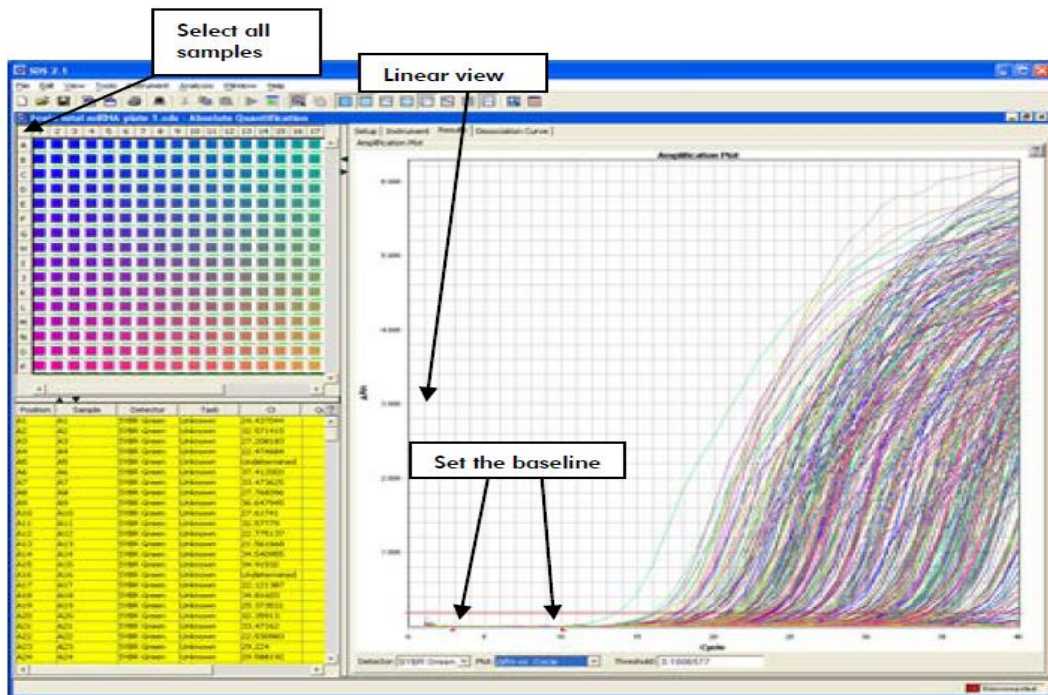
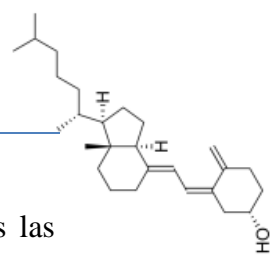


Figura 20: Discriminación alélica

Las frecuencias de los genotipos de cada uno de los SNPs en las poblaciones alérgica y control se resumen en la tabla 2. Como puede observarse, su análisis comparativo no muestra diferencias significativas en la distribución de genotipos de los SNPs entre niños asmáticos y controles. En ambas poblaciones, el genotipo más



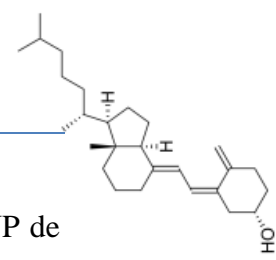
prevalente para *ApaI* (C>A) fue A/C (frecuencia 47,5 vs 50 %), siendo similares las frecuencias de los genotipos G/G (49 vs 43,1 %) y G/A (40 vs 45,1 %) de *TaqI* (A>G) y G/G (37,6 vs 46,1 %) y A/G (49,5 vs 44,2 %) de *FokI* (A>G) en las poblaciones alérgica y control respectivamente. En base a estos resultados, y para aumentar la potencia del estudio, los ulteriores análisis cualitativos y cuantitativos para establecer posibles relaciones de cada uno de estos polimorfismos con las variables del estudio, se realizaron conjuntamente sobre las dos poblaciones; es decir, considerando niños asmáticos y controles como una única muestra poblacional (N=155).

Tabla 2: Frecuencia de genotipos de *ApaI*, *TaqI* y *FokI* en las poblaciones alérgica y control

SNP	GENOTIPO	CASOS (N = 103)	CONTROLES (N = 52)	Valor de p
rs7975232 <i>ApaI</i> C>A	C/C	29 (28,7%)	16(30,8%)	0,81
	A/C	48(47,5%)	26(50%)	
	A/A	24(23,8%)	10(19,2%)	
rs731236 <i>TaqI</i> A>G	G/G	49(49%)	22(43,1%)	0,79
	G/A	40(40%)	23(45,1%)	
	A/A	11(11%)	6(11,8%)	
rs2228570 <i>FokI</i> A>G	G/G	38(37,6%)	24(46,1%)	0,57
	A/G	50(49,5%)	23(44,2%)	
	A/A	13(12,9)	5(9,6%)	

3.3 Estudio de asociación cuantitativo

El análisis de polimorfismos genéticos permite la identificación de variantes génicas que confieren susceptibilidad a enfermedades. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la asociación cuantitativa entre los SNPs de VDR *FokI*, *ApaI* y *TaqI* y cada una de las variables analíticas evaluadas en nuestro estudio. Las asociaciones se realizaron con el programa informático SNPStats. En las tablas se incluye además, para cada SNP y variable analítica, el modelo de herencia que proporciona un mejor ajuste (menores valores de p y AIC) utilizando el criterio de la



Información Akaike (AIC). En términos generales, las comparaciones entre los SNP de VDR y los parámetros clínicos y experimentales muestran relaciones significativas con variables asociadas con el metabolismo lipídico, la inflamación, el estrés oxidativo y el estado inmunológico.

La tabla 3 muestra los resultados de este análisis para el SNP rs7975232 ApaI (C>A). Como puede observarse, el alelo minoritario A de este SNP se asocia significativamente ($p=0,02$) a una disminución de los niveles de TNF- α de 1,97 pg/ml por alelo en un modelo de herencia aditivo. En este mismo modelo de herencia, el alelo A de ApaI se asocia significativamente a una reducción de los niveles de isoprostanos de 22,40 pg/ml por alelo ($p=0,02$). En un modelo de herencia sobredominante el genotipo A/C se asoció a una elevación de ALT de 3,70 U/L (0,10-7,31; $p=0,046$).

Los resultados del análisis para el SNP rs731236 TaqI (A>G) se muestran en la tabla 4 en la que se observan asociaciones de este polimorfismo con los niveles de inmunoglobulinas no específicas. Así el genotipo A/A, con un modelo de herencia recesivo, se asocia significativamente ($p=0,012$) a una disminución de los niveles de IgA de 50,69 mg/dl. En un modelo de herencia sobredominante, se observa asociación ($p=0,012$) del genotipo G/A con una elevación de 21,98 mg/dl de los niveles de IgM. Para IgE total, la presencia del alelo A de TaqI se asocia significativamente ($p=0,018$) a una disminución de sus niveles en 282,53 kU/L por alelo en un modelo de herencia aditivo.

Finalmente, la tabla 5 muestra los resultados para el SNP rs2228570 FokI (A>G). Para este polimorfismo, la homocigosis del alelo AA, con el modelo de herencia recesivo, se asocia a un incremento en el nivel de HDL colesterol de 6,38 mg/dl ($p=0,037$), y a un ligero pero significativo incremento en el porcentaje de eosinófilos (0,27%; $p=0,025$). Para IgA, con un modelo de herencia aditivo, la presencia del alelo A de FokI se asocia significativamente ($p=0,011$) a un incremento de sus niveles en 23,76 mg/dL por alelo.

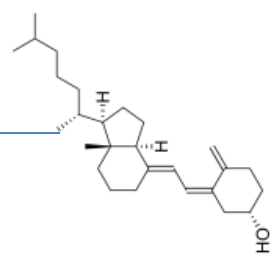


Tabla 3. Asociación cuantitativa del SNP rs7975232 ApaI (C>A) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	Media (SEM)	Diferencia (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	C/C	90,51 (1,28)	-1,18 (-3,53-1,18)	0,33	A
	A/C	89,61 (1,47)			
	A/A	88,1 (1,66)			
CREATININA (mg/dL)	CC/AC	0,63 (0,01)	0,03 (-0,00-0,007)	0,086	R
	A/A	0,67 (0,02)			
UREA (mg/dL)	CC/AC	30,19 (0,64)	-1,29 (-4,02-1,43)	0,35	R
	A/A	28,9 (1,23)			
COLESTEROL (mg/dL)	C/C	157,61 (3,48)	2,91 (-7,83-13,66)	0,6	D
	AC/AA	160,52 (3,43)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	CC/AC	52,14 (1,14)	3,67 (-0,97-8,30)	0,12	R
	A/A	55,81 (1,55)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	CC/AA	91,81 (2,8)	2,93 (-6,24-12,10)	0,53	SD
	A/C	94,74 (3,87)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	C/C	12,76 (0,66)	0,82 (-1,52-3,15)	0,49	D
	AC/AA	13,57 (0,77)			
AST (U/L)	CC/AA	23,88 (0,81)	3,52 (-0,17-7,20)	0,064	SD
	A/C	27,4 (1,79)			
ALT (U/L)	CC/AA	17,4 (0,95)	3,70 (0,10-7,31)	0,046	SD
	A/C	21,1 (1,63)			
GGT (U/L)	CC/AA	12,91 (0,38)	2,41 (-0,16-4,97)	0,068	SD
	A/C	15,32 (1,38)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	C/C	1,64 (0,42)	4,01 (-2,07-10,09)	0,2	D
	AC/AA	5,65 (2,21)			
IgG (mg/dL)	CC/AA	1027,98 (28,05)	40,9 (-45,5-127,3)	0,35	SD
	A/C	1068,92 (33,82)			
IgA (mg/dL)	C/C	153,74 (13,55)	-16,95 (-33,92-0,02)	0,052	A
	A/C	138,47 (8,11)			
	A/A	119,63 (11,77)			
IgM (mg/dL)	CC/AA	109,39 (5,38)	12,04 (-4,78-28,86)	0,16	SD
	A/C	121,43 (6,67)			
IgE TOTAL (kU/L)	C/C	834,19 (188,01)	-254 (-579-70,1)	0,13	D
	AC/AA	579,89 (73)			
IgE <i>D. Pteronyssimus</i> (kUA/L)	CC/AC	48,46 (4,75)	-8,37 (-29,57-12,82)	0,44	R
	A/A	40,08 (8,5)			
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	CC/AC	46,15 (4,71)	-6,63 (-27,52-14,26)	0,54	R
	A/A	39,52 (8,6)			
EOSINOFILOS (%)	CC/AA	0,48 (0,04)	0,08 (-0,07-0,23)	0,3	SD
	A/C	0,56 (0,07)			
VITAMINA D (ng/mL)	CC/AA	29,03 (0,99)	-0,23 (-3,36-2,89)	0,88	SD
	A/C	28,79 (1,26)			
IL-6 (pg/mL)	CC/AC	3,97 (0,43)	-1,46 (-3,13-0,22)	0,09	R
	A/A	2,51 (0,5)			
IFN- γ (pg/mL)	CC/AC	1,37 (0,16)	-0,41 (-1,00-0,18)	0,17	R
	A/A	0,95 (0,14)			
TNF- α (pg/mL)	C/C	10,17 (1,16)	-1,97 (-3,62- -0,33)	0,02	A
	A/C	8,89 (0,88)			
	A/A	6,12 (1,13)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	C/C	85,85 (17,34)	-22,40 (-41,08- -3,72)	0,02	A
	A/C	60,97 (8,95)			
	A/A	41,38 (7,13)			
NITRATOS (μ M)	CC/AC	38,08 (3,5)	-10,44 (-23,47-2,59)	0,12	R
	A/A	27,64 (1,31)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; D: Dominante; R: Recesivo; SD: Sobredominante

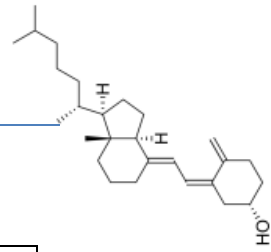


Tabla 4. Asociación cuantitativa del SNP rs731236 TaqI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	Media (SEM)	Diferencia (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	GG/AA	89,3 (1,11)	0,71 (-2,80-4,23)	0,69	SD
	G/A	90,02 (1,44)			
CREATININA (mg/dL)	G/G	0,62 (0,01)	0,03 (-0,01-0,06)	0,13	D
	GA/AA	0,65 (0,01)			
UREA (mg/dL)	GG/GA	30,12 (0,62)	-2,06 (-5,54-1,42)	0,25	R
	A/A	28,06 (1,54)			
COLESTEROL (mg/dL)	GG/AA	159,34 (3,02)	1,28 (-9,09-11,64)	0,81	SD
	G/A	160,62 (4,63)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	52,49 (1,4)	1,03 (-1,72-3,78)	0,46	A
	G/A	53,12 (1,67)			
	A/A	54,38 (2,02)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	GG/GA	93,69 (2,54)	-2,31 (-15,99-11,36)	0,74	R
	A/A	91,38 (6,25)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	13,7 (0,81)	-0,73 (-2,30-0,84)	0,36	A
	G/A	12,96 (0,97)			
	A/A	12,25 (0,99)			
AST (U/L)	GG/GA	26,03 (1,06)	-4,23 (-9,96-1,51)	0,15	R
	A/A	21,8 (1,85)			
ALT (U/L)	GG/GA	19,59 (1,03)	-4,32 (-10,01-1,37)	0,14	R
	A/A	15,27 (1,85)			
GGT (U/L)	GG/GA	14,14 (0,76)	-1,54 (-5,48-2,41)	0,45	R
	A/A	12,6 (0,61)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	GG/AA	5,52 (2,5)	-2,92 (-8,90-3,06)	0,34	SD
	G/A	2,6 (0,47)			
IgG (mg/dL)	GG/AA	1022,35 (28,05)	59,89 (-27,87-147,66)	0,18	SD
	G/A	1082,25 (35,58)			
IgA (mg/dL)	GG/GA	144,33 (6,66)	-50,7 (-89,9 - -11,5)	0,012	R
	A/A	93,64 (12,89)			
IgM (mg/dL)	GG/AA	105,88 (4,9)	21,98 (5,16-38,80)	0,012	SD
	G/A	127,86 (7,44)			
IgE (kU/L)	G/G	822,47 (124,79)	-282 (-513 - -52)	0,018	A
	G/A	563,14 (101,11)			
	A/A	222,79 (51,86)			
IgE D. Pteronysimus (kUA/L)	G/G	52,02 (6,21)	-7,25 (-19,71 - 5,20)	0,26	A
	G/A	44,63 (6,71)			
	A/A	37,66 (10,85)			
IgE D. Farinae (kUA/L)	G/G	50,16 (6,14)	-8,94 (-25,37-7,50)	0,29	D
	GA/AA	41,22 (5,72)			
EOSINOFILOS (%)	G/G	0,54 (0,04)	-0,04 (-0,15 - 0,07)	0,47	A
	G/A	0,51 (0,08)			
	A/A	0,45 (0,08)			
VITAMINA D (ng/mL)	G/G	28,59 (1,09)	0,38 (-2,00 - 2,76)	0,75	A
	G/A	29,01 (1,3)			
	A/A	29,31 (2,59)			
IL-6 (pg/mL)	GG/GA	3,67 (0,39)	-0,28 (-2,53 - 1,97)	0,81	R
	A/A	3,39 (0,89)			
IFN- γ (pg/mL)	GG/AA	1,22 (0,11)	0,10 (-0,40 - 0,60)	0,69	SD
	G/A	1,32 (0,26)			
TNF- α (pg/mL)	G/G	9,01 (0,9)	-0,68 (-2,47 - 1,11)	0,46	A
	G/A	8,54 (0,94)			
	A/A	7,44 (1,93)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	G/G	68,62 (11,44)	-7,37 (-27,65 - 12,91)	0,48	A
	G/A	61,31 (10,06)			
	A/A	53,83 (14,12)			
NITRATOS (μ M)	G/G	38,98 (5,14)	-5,80 (-13,94 - 2,35)	0,17	A
	G/A	34,34 (3,19)			
	A/A	26,17 (1,98)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; D: Dominante; R: Recesivo; SD: Sobredominante

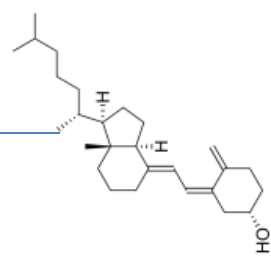
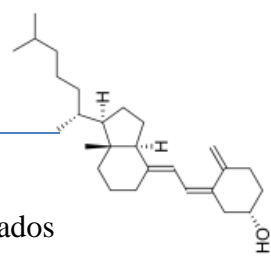


Tabla 5. Asociación cuantitativa del SNP rs2228570 FokI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	Media (SEM)	Diferencia (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	GG/AG	89,98 (0,92)	-2,98 (-8,40 – 2,43)	0,28	R
	A/A	87 (2,47)			
CREATININA (mg/dL)	GG/AA	0,64 (0,01)	-0,01 (-0,04 – 0,03)	0,7	SD
	A/G	0,63 (0,01)			
UREA (mg/dL)	GG/AA	29,32 (0,8)	1,13 (-1,12 – 3,38)	0,33	SD
	A/G	30,45 (0,82)			
COLESTEROL (mg/dL)	GG/AG	158,57 (2,79)	7,65 (- 8,34 -23,63)	0,35	R
	A/A	166,21 (6,12)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	GG/AG	52,41 (0,99)	6,38 (0,45 – 12,31)	0,037	R
	A/A	58,79 (3,29)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	GG/AA	91,83 (3,44)	2,19 (-6,97 – 11,35)	0,64	SD
	A/G	94,02 (3,14)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	GG/AA	14,06 (0,95)	-1,75 (-3,88 – 0,38)	0,11	SD
	A/G	12,31 (0,49)			
AST (U/L)	GG/AA	25,45 (1,05)	0,69 (-5,21 – 6,60)	0,82	R
	A/G	26,14 (1,51)			
ALT (U/L)	G/G	20,5 (1,81)	-2,53 (-6,20 – 1,15)	0,18	D
	AG/AA	17,97 (0,92)			
GGT (U/L)	G/G	14,63 (1,41)	-0,99 (-2,92 – 0,94)	0,32	A
	A/G	13,57 (0,58)			
	A/A	12,71 (0,63)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	GG/AA	2,12 (0,61)	4,51 (-1,24 – 10,25)	0,13	SD
	A/G	6,62 (2,99)			
IgG (mg/dL)	G/G	1011,59 (30,96)	59,2 (-29,10 – 147,43)	0,19	D
	AG/AA	1070,76 (31,13)			
IgA (mg/dL)	G/G	122,78 (8,2)	23,76 (5,78 – 41,74)	0,011	A
	A/G	142,55 (9,62)			
	A/A	173,88 (19,91)			
IgM (mg/dL)	G/G	110,82 (6,11)	7,99 (-9,15 – 25,13)	0,36	D
	AG/AA	118,81 (5,95)			
IgE (kU/L)	GG/AA	584,17 (101,77)	144 (-152,69 – 441,48)	0,34	SD
	A/G	728,57 (112,72)			
IgE <i>D. Pteronysimus</i> (kUA/L)	G/G	41,52 (5,89)	8,53 (-3,43 – 20,49)	0,16	A
	A/G	48,68 (6,62)			
	A/A	59,67 (12,11)			
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	G/G	39,74 (5,95)	8,68 (-3,14 – 20,50)	0,15	A
	A/G	46,87 (6,45)			
	A/A	58,28 (12,17)			
EOSINOFILOS (%)	GG/AG	0,49 (0,03)	0,27 (0,04 – 0,50)	0,025	R
	A/A	0,76 (0,22)			
VITAMINA D (ng/mL)	G/G	29,95 (1,23)	-1,38 (-3,73 – 0,96)	0,25	AD
	A/G	28,29 (1,13)			
	A/A	27,44 (2,4)			
IL-6 (pg/mL)	GG/AA	3,69 (0,79)	0,61 (-1,26 – 2,47)	0,52	SD
	A/G	4,3 (0,5)			
IFN- γ (pg/mL)	G/G	1,35 (0,27)	-0,13 (-0,50 – 0,25)	0,51	A
	A/G	1,27 (0,13)			
	A/A	1,05 (0,17)			
TNF- α (pg/mL)	GG/AG	8,72 (0,64)	-0,34 (-4,05 – 3,36)	0,86	R
	A/A	8,38 (1,98)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	GG/AG	62,25 (6,88)	14,66 (-28,33 – 57,65)	0,5	R
	A/A	76,9 (29,64)			
NITRATOS (μ M)	G/G	40,59 (6,43)	-7,92 (-18,96 – 3,11)	0,16	D
	AG/AA	32,66 (1,67)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; D: Dominante; R: Recesivo; SD: Sobredominante



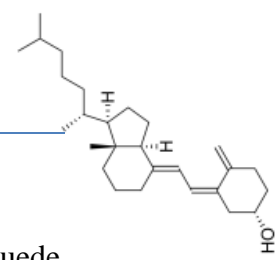
Los análisis “post hoc” con el test de Dunnet confirmaron los resultados significativos de los genotipos mutados respecto a la elevación de los niveles de HDL colesterol ($p=0,025$) para FokI y para el descenso de isoprostanos ($p=0,02$) y TNF- α ($p=0,016$) para ApaI. No se observaron diferencias por género tras el análisis separado de los datos en niños y niñas. Tampoco efectos aislados del polimorfismo de TaqI sobre los parámetros de metabolismo lipídico, inflamación o estrés oxidativo/nitrosativo.

3.4 Estudio de asociación cualitativo

El análisis de los resultados mediante tablas de contingencia (rasgos cualitativos), permite evaluar el riesgo de padecer un estado patológico. Para ello se establecen valores umbrales para cada una de las variables por encima de los cuales (valor 1) se consideraría como patológico el resultado experimental obtenido; los niveles experimentales por debajo del valor umbral (valor 0) no supondrían un riesgo para la salud de los pacientes. Los valores utilizados como umbrales para cada una de las variables de nuestro estudio se muestran en la tabla 6. A partir de estos datos se llevaron a cabo los estudios de asociación con el programa estadístico SNPStats.

Tabla 6: Valores umbrales establecidos para cada una de las variables de estudio. X corresponde al valor experimental de cada análisis.

	0	1
GLUCOSA (mg/dL)	$X < 100$	$X \geq 100$
CREATININA (mg/dL)	$X < 0,7$	$X \geq 0,7$
UREA (mg/dL)	$X < 25$	$X \geq 25$
COLESTEROL (mg/dL)	$X < 200$	$X \geq 200$
COLESTEROL HDL (mg/dL)	$X > 40$	$X \leq 40$
COLESTEROL LDL (mg/dL)	$X < 130$	$X \geq 130$
COLESTEROL VLDL (mg/dL)	$X < 15$	$X \geq 15$
AST (GOT) (U/L)	$X < 34$	$X \geq 34$
ALT(GPT) (U/L)	$X < 55$	$X \geq 55$
GGT (U/L)	$X < 64$	$X \geq 64$
PCR ULTRASENSIBLE (mg/L)	$X < 3$	$X \geq 3$
IgG (mg/dL)	$X > 1400$	$X \leq 1400$
IgA (mg/dL)	$X > 200$	$X \leq 200$
IgM (mg/dL)	$X > 200$	$X \leq 200$
IgE total (kU/L)	$X > 200$	$X \leq 200$
IgE <i>D. Pteronysimus</i> (kUA/L)	$X < 0,35$	$X > 0,35$
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	$X < 0,35$	$X > 0,35$
VITAMINA D (ng/mL)	$X > 50$	$X \leq 50$
Eosinofilos (%)	$X < 0,7$	$X \geq 0,7$
IL6 (pg/mL)	$X < 4,2$	$X > 4,2$
IFN γ (pg/mL)	$X < 0,7$	$X > 0,7$
TNF α (pg/mL)	$X < 30$	$X > 30$
Isoprostanos suero (pg/mL)	$X < 129$	$X > 129$
Nitratos suero (μ M)	$X < 60,3$	$X > 60,3$



Los resultados de estos análisis se resumen en las tablas 7-9. Como puede observarse, para el SNP rs7975232 ApaI (C>A) los efectos se centran en el metabolismo lipídico (Tabla 7). Así, el tener una copia del alelo menor eleva 7,62 veces el riesgo de tener niveles patológicos de colesterol total ($p=0.026$), y reduce en 0.23 veces el riesgo de presentar niveles bajos de HDL colesterol ($p=0.018$).

En el caso del SNP rs731236 TaqI (A>G) la única observación significativa (Tabla 8) es la reducción de 0,46 veces en el riesgo de tener niveles patológicos de IgE total por la presencia del alelo A en un modelo de herencia dominante ($P=0,042$).

Finalmente, para el SNP rs2228570 FokI (A>G), bajo el modelo de herencia dominante, la presencia del alelo A eleva en casi tres veces (2,97) el riesgo de presentar niveles patológicamente elevados de uPCR ($p=0.017$). Con carácter recesivo, este polimorfismo se asocia a un incremento del riesgo de niveles elevados de IgA de 3,86 veces ($p=0,027$) y, con carácter aditivo, a una elevación del riesgo de casi dos veces de elevación en el % de eosinófilos ($p=0,019$) (Tabla 9).

Resaltar que, ni en el análisis cuantitativo ni en el cualitativo, se ha observado relación significativa entre los SNPs evaluados y los niveles de vitamina D. Indicar igualmente que la información aportada por el análisis cualitativo debe valorarse con cautela puesto que, como ya se ha indicado (Tabla 1) los niveles de todos los parámetros (a excepción de los niveles de IgE total y específica en la población alérgica) se encontraban dentro del rango de la normalidad. Ello limita sensiblemente el número de pacientes con valores catalogados como “patológicos” para las diferentes variables analizadas.

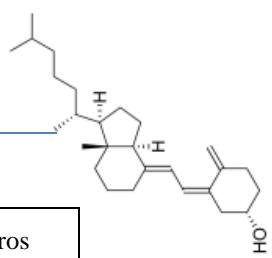


Tabla 7. Asociación cualitativa del SNP rs7975232 ApaI (C>A) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	0	1	OR (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	CC/AA	68 (54, 4%)	7 (46,7%)	1,36 (0,47 – 3,99)	0,57	SD
	A/C	57 (45, 6%)	8 (53,3%)			
CREATININA (mg/dL)	CC/AC	83 (82,2%)	22 (66,7%)	2,31 (0,95 – 5,59)	0,069	R
	A/A	18 (17,8%)	11 (33,3%)			
UREA (mg/dL)	C/C	6 (24%)	36 (32,7%)	0,72 (0,39 – 1,33)	0,29	A
	A/C	12 (48%)	52 (47,3%)			
	A/A	7 (28%)	22 (20%)			
COLESTEROL (mg/dL)	CC/AA	66 (55,9%)	1 (14,3%)	7,62 (0,89 – 65,25)	0,026	SD
	A/C	52 (44,1%)	6 (85,7%)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	CC/AA	3 (23,1%)	64 (57,1%)	0,23 (0,06 – 0,86)	0,018	SD
	A/C	10 (76,9%)	48 (42,9%)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	CC/AA	64 (55,2%)	3 (37,5%)	2,05 (0,47 – 8,99)	0,33	SD
	A/C	52 (44,8)	5 (62,5%)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	CC/AC	70 (79,5%)	29 (78,4%)	1,07 (0,42 – 2,74)	0,88	R
	A/A	18 (20,4%)	8 (21,6%)			
AST (U/L)	CC/AC	84 (76,4%)	14 (93,3)	0,23 (0,03-1,84)	0,095	R
	A/A	26 (23,6%)	1 (6,7%)			
ALT (U/L)	C/C	40 (31,5%)	0 (0%)	1,22 (0,08 – 18,74)	0,89	A
	A/C	60 (47,2%)	1 (100%)			
	A/A	27 (21,3%)	0 (0%)			
GGT (U/L)	C/C	41 (34,2%)	0 (0%)	1,26 (0,09 – 18,00)	0,87	A
	A/C	53 (44,2%)	1 (100%)			
	A/A	26 (21,7%)	0 (0%)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	C/C	32 (38,5%)	7 (21,9%)	2,24 (0,87 – 5,78)	0,083	D
	AC/AA	51 (61,5%)	25 (78,1%)			
IgG (mg/dL)	CC/AA	60 (50,9%)	3 (33,3%)	2,07 (0,49 – 8,66)	0,31	SD
	A/C	58 (49,1%)	6 (66,7%)			
IgA (mg/dL)	CC/AC	87 (76,3%)	19 (86,4%)	0,51 (0,14 – 1,85)	0,28	R
	A/A	27 (23,7%)	3 (13,6%)			
IgM (mg/dL)	C/C	36 (29,3%)	1 (10%)	3,72 (0,46 – 30,48)	0,15	D
	AC/AA	87 (70,7%)	9 (90%)			
IgE (kU/L)	C/C	14 (31,1%)	22 (28,2%)	1,15 (0,52 – 2,56)	0,73	D
	AC/AA	31 (68,9%)	56 (71,8%)			
IgE <i>D. Pteronyssimus</i> (kUA/L)	CC/AA	13 (41,9%)	41 (52,6%)	0,65 (0,28 – 1,51)	0,32	SD
	A/C	18 (58,1%)	37 (47,4%)			
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	CC/AA	12 (38,7%)	42 (55,3%)	0,51 (0,22 – 1,20)	0,12	SD
	A/C	19 (61,3%)	4 (44,7%)			
EOSINOFILOS (%)	C/C	34 (32,4%)	10 (24,2%)	1,37 (0,82 – 2,28)	0,23	A
	A/C	51 (48,6%)	20 (48,8%)			
	A/A	20 (19,1%)	11 (26,8%)			
VITAMINA D (ng/mL)	C/C	41 (30,1%)	2 (66,7%)	0,24 (0,03 – 2,12)	0,14	A
	A/C	67 (49,3%)	1 (33,3%)			
	A/A	28 (20,6%)	0 (0%)			
IL-6 (pg/mL)	CC/AC	78 (76,5%)	41 (80,4%)	0,79 (0,35 – 1,82)	0,58	R
	A/A	24 (23,5%)	10 (19,6%)			
IFN- γ (pg/mL)	CC/AC	95 (76%)	24 (85,7%)	0,53 (0,17 – 1,64)	0,24	R
	A/A	30 (24%)	4 (14,3%)			
TNF- α (pg/mL)	C/C	43 (28,9%)	2 (50%)	0,38 (0,08 – 1,92)	0,21	A
	A/C	72 (48,3%)	2 (50%)			
	A/A	34 (22,8%)	0 (0%)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	C/C	37 (27,2%)	7 (46,7%)	0,46 (0,20 – 1,04)	0,052	A
	A/C	66 (48,5%)	7 (46,7%)			
	A/A	33 (24,3%)	1 (6,7%)			
NITRATOS (μ M)	C/C	41 (28,9%)	3 (37,5%)	1,00 (0,23 – 4,43)	0,13	CD
	A/C	68 (47,9%)	5 (62,5%)			
	A/A	33 (23,2%)	0 (0%)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; CD: Codominante; D: Dominante; R: Recessivo; SD: Sobredominante

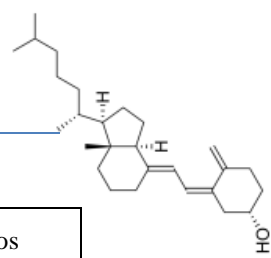


Tabla 8. Asociación cualitativa del SNP rs731236 TaqI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	0	1	OR (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	G/G	59 (48%)	5 (33,3%)	1,60 (0,75 – 3,39)	0,22	A
	G/A	50 (40,6%)	7 (46,7%)			
	A/A	14 (11,4%)	3 (20%)			
CREATININA (mg/dL)	GG	50 (50,5%)	11 (33,3%)	2,04 (0,90 – 4,65)	0,084	D
	GA/AA	49 (49,5%)	22 (66,7%)			
UREA (mg/dL)	GG/GA	21 (84%)	96 (88,9%)	0,66 (0,19 2,24)	0,51	R
	A/A	4 (16%)	12 (11,1%)			
COLESTEROL (mg/dL)	GG	54 (46,5%)	3 (42,9%)	1,16 (0,25 – 5,42)	0,85	D
	GA/AA	62 (53,5%)	4 (57,1%)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	6 (50%)	51 (46%)	0,86 (0,26 – 2,87)	0,17	CD
	G/A	6 (50%)	44 (39,6%)			
	A/A	0 (%)	16 (14,4%)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	52 (45,6%)	5 (62,5%)	0,47 (0,13 – 1,64)	0,2	A
	G/A	46 (40,4%)	3 (37,5%)			
	A/A	16 (14%)	0 (%)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	GG/GA	74 (85,1%)	33 (91,7%)	0,52 (0,14 – 1,94)	0,3	R
	A/A	13 (14,9%)	3 (8,3%)			
AST (U/L)	G/G	49 (45,4%)	8 (53,3%)	0,73 (0,31 – 1,67)	0,44	A
	G/A	45 (41,7%)	6 (40%)			
	A/A	14 (13%)	1 (6,7%)			
ALT (U/L)	GG/AA	72 (59,5%)	1 (20%)	5,88 (0,64 – 54,18)	0,076	SD
	G/A	49 (40,5%)	4 (80%)			
GGT (U/L)	G/G	52 (44,8%)	2 (66,7%)	0,40 (0,05-3,40)	0,36	A
	G/A	49 (42,2%)	1 (33,3%)			
	A/A	15 (12,9%)	0 (0%)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	GG/GA	71 (86,6%)	30 (96,8%)	0,22 (0,03 – 1,74)	0,082	R
	A/A	11 (13,4%)	1 (3,2%)			
IgG (mg/dL)	G/G	56 (47,9%)	4 (44,4%)	1,46 (0,37 – 5,74)	0,31	CD
	G/A	48 (41%)	5 (55,6%)			
	A/A	13 (11,1%)	0 (%)			
IgA (mg/dL)	G/G	50 (44,6%)	13 (59,1%)	0,72 (0,28 – 1,84)	0,055	CD
	G/A	48 (42,9)	9 (40,9%)			
	A/A	14 (12,5%)	0 (0%)			
IgM (mg/dL)	G/G	60 (49,2%)	2 (20%)	3,87 (0,79 – 18,98)	0,065	D
	GA/AA	62 (50,8%)	8 (80%)			
IgE (kU/L)	G/G	16 (37,2%)	44 (56,4%)	0,46 (0,21 – 0,98)	0,042	D
	GA/AA	27 (62,8%)	34 (43,6%)			
IgE <i>D. Pteronyssimus</i> (kUA/L)	GG/AA	15 (50%)	48 (62,3%)	0,60 (0,26 – 1,42)	0,25	SD
	G/A	15 (50%)	29 (37,7%)			
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	GG/AA	15 (50%)	47 (62,7%)	0,60 (0,25 – 1,40)	0,24	SD
	G/A	15 (50%)	28 (37,3%)			
EOSINOFILOS (%)	GG/AA	60 (57,7%)	27 (67,5%)	0,60 (0,30 – 1,41)	0,28	SD
	G/A	44 (42,3%)	13 (32,5%)			
VITAMINA D (ng/mL)	G/G	67 (50%)	2 (66,7%)	0,48 (0,06 – 4,08)	0,47	A
	G/A	54 (40,3%)	1 (33,3%)			
	A/A	13 (9,7%)	0 (0%)			
IL-6 (pg/mL)	G/G	49 (48,5%)	22 (44%)	1,20 (0,61 – 2,37)	0,6	D
	GA/AA	52 (51,5%)	28 (56%)			
IFN- γ (pg/mL)	GG/AA	72 (58,5%)	16 (57,1%)	1,06 (0,46 – 2,43)	0,89	SD
	GA	51 (41,5%)	2 (42,9%)			
TNF- α (pg/mL)	G/G	69 (46,9%)	2 (50%)	0,71 (0,14 – 3,47)	0,66	A
	G/A	61 (41,5%)	2 (50%)			
	A/A	17 (11,6%)	0 (0%)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	GG/AA	77 (57%)	10 (66,7%)	0,66 (0,22 – 2,05)	0,47	SD
	GA	58 (43%)	5 (33,3%)			
NITRATOS (μ M)	G/G	65 (46,1%)	5 (62,5%)	0,48 (0,14 – 1,73)	0,23	A
	G/A	60 (42,5%)	3 (37,5%)			
	A/A	16 (11,3%)	0 (0%)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; CD: Codominante; D: Dominante; R: Recesivo; SD: Sobredominante

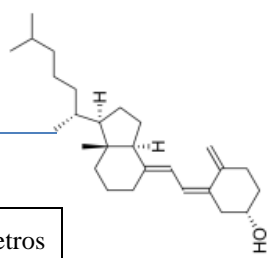
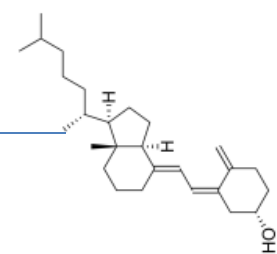


Tabla 9. Asociación cualitativa del SNP rs2228570 FokI (A>G) del receptor de VDR con los parámetros bioquímicos, inflamatorios y de estrés oxidativo en el total de la población (N=155).

Parámetro	Genotipo	0	1	OR (95% CI)	P	Modelo herencia
GLUCOSA (mg/dL)	G/G	51 (40,8%)	8 (53,3%)	0,77 (0,26 – 2,27)	0,13	CD
	A/G	58 (46,4%)	7 (46,7%)			
	A/A	16 (12,8%)	0 (0%)			
CREATININA (mg/dL)	GG/AG	89 (88,1%)	30 (90,9%)	0,74 (0,20 – 2,81)	0,65	R
	A/A	12 (11,9%)	3 (9,1%)			
UREA (mg/dL)	GG/AA	16 (61,5%)	55 (50,5%)	1,57 (0,65 – 3,77)	0,32	SD
	A/G	10 (38,5%)	54 (49,5%)			
COLESTEROL (mg/dL)	G/G	46 (39%)	4 (57,1%)	0,45 (0,12 – 1,74)	0,22	A
	A/G	58 (49,1%)	3 (42,9%)			
	A/A	14 (11,9%)	0 (0%)			
HDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	7 (58,3%)	43 (38%)	2,38 (0,83 – 6,86)	0,088	A
	A/G	5 (41,7%)	56 (49,6%)			
	A/A	0 (0%)	14 (12,4%)			
LDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	46 (39,7%)	4 (50%)	0,57 (0,17 – 1,88)	0,34	A
	A/G	56 (48,3%)	4 (50%)			
	A/A	14 (12,1%)	0 (0%)			
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	G/G	34 (38,2%)	16 (44,4%)	0,77 (0,35 – 1,69)	0,52	D
	AG/AA	55 (61,8%)	20 (55,6%)			
AST (U/L)	GG/AG	99 (90%)	12 (80%)	2,25 (0,55 – 9,22)	0,29	R
	A/A	11 (10%)	3 (20%)			
ALT (U/L)	G/G	49 (39,8%)	4 (80%)	0,19 (0,02 – 1,54)	0,059	A
	A/G	60 (48,8%)	1 (20%)			
	A/A	14 (11,4%)	0 (0%)			
GGT (U/L)	G/G	49 (41,5%)	2 (66,7%)	0,36 (0,04 – 3,21)	0,31	A
	A/G	55 (46,6%)	1 (33,3%)			
	A/A	14 (11,9%)	0 (0%)			
PCR Ultrasensible (mg/L)	G/G	39 (46,4%)	7 (22,6%)	2,97 (1,16 – 7,64)	0,017	D
	AG/AA	45 (53,6%)	24 (77,4%)			
IgG (mg/dL)	G/G	52 (44,1%)	2 (22,2%)	2,76 (0,55 – 13,84)	0,19	D
	AG/AA	66 (55,9%)	7 (77,8%)			
IgA (mg/dL)	GG/AG	103 (91,2%)	16 (72,7%)	3,86 (1,23 – 12,09)	0,027	R
	A/A	10 (8,8%)	6 (27,3%)			
IgM (mg/dL)	GG/AA	67 (54,5%)	4 (40%)	1,79 (0,48 – 6,68)	0,38	SD
	A/G	56 (45,5%)	6 (60%)			
IgE (kU/L)	GG/AG	40 (88,8%)	67 (85,9%)	1,31 (0,43 – 4,06)	0,63	R
	A/A	5 (11,1%)	11 (14,1%)			
IgE <i>D. Pteronyssimus</i> (kUA/L)	G/G	10 (32,2%)	36 (46,1%)	0,56 (0,23 – 1,33)	0,18	D
	A/G	21 (67,7%)	42 (53,9%)			
IgE <i>D. Farinae</i> (kUA/L)	GG/AA	15 (48,4%)	44 (57,9%)	0,68 (0,29 – 1,58)	0,37	SD
	A/G	16 (51,6%)	32 (42,1%)			
EOSINOFILOS (%)	G/G	46 (43,4%)	10 (25%)	1,94 (1,11 – 3,39)	0,019	A
	A/G	50 (47,2%)	22 (55%)			
	A/A	10 (9,4%)	8 (20%)			
VITAMINA D (ng/mL)	GG/AG	121 (89%)	2 (66,7%)	4,03 (0,34 – 47,20)	0,31	R
	A/A	15 (11%)	1 (33,3%)			
IL-6 (pg/mL)	G/G	46 (45,5%)	16 (30,8%)	1,88 (0,93 – 3,82)	0,075	D
	AG/AA	55 (54,5%)	36 (69,2%)			
IFN- γ (pg/mL)	GG/AA	64 (51,2%)	16 (57,1%)	0,79 (0,34 – 1,80)	0,57	SD
	A/G	61 (48,8%)	12 (42,9%)			
TNF- α (pg/mL)	G/G	61 (40,9%)	1 (25%)	1,89 (0,45 – 8,03)	0,39	A
	A/G	71 (47,6%)	2 (50%)			
	A/A	17 (11,4%)	1 (25%)			
ISOPROSTANOS (pg/mL)	GG/AA	69 (50,7%)	9 (60%)	0,69 (0,23 – 2,03)	0,49	SD
	A/G	67 (49,3%)	6 (40%)			
NITRATOS (μ M)	G/G	56 (39,4%)	4 (50%)	0,57 (0,17 – 1,87)	0,33	A
	A/G	69 (48,6%)	4 (50%)			
	A/A	17 (12%)	0 (0%)			

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; GGT: Gamma glutamil transferasa; IL-6: Interleuquina 6; IFN- γ : Interferon gamma; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa; A: Aditivo; CD: Codominante; D: Dominante; R: Recesivo; SD: Sobredominante

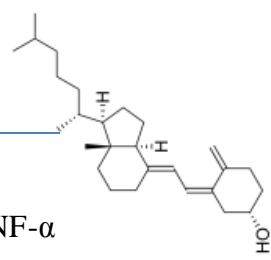


3.5 Análisis de haplotipos

Se entiende por haplotipo a la combinación de alelos en un cromosoma, región cromosómica o gen concreto. Con este análisis se pretende identificar un conjunto de segmentos de ADN que están estrechamente relacionados en su modo de herencia y, en nuestro caso, evaluar su efecto sobre los parámetros determinados en nuestro estudio. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium). Por ello, para realizar este tipo de análisis, debe comprobarse primero que se cumpla el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg que 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. Los resultados de nuestro estudio se ajustan a la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) y, como ya hemos indicado, el análisis de ligamiento reveló equilibrio entre FokI y ApaI ($D' = 0.29$, $r^2 = 0.040$) y TaqI ($D' = 0.37$, $r^2 = 0.036$) SNPs y desequilibrio entre ApaI y TaqI ($D' = 0.91$, $r^2 = 0.452$).

A partir de estos datos, se realizó el análisis de haplotipos para los tres SNP evaluados en nuestro estudio. La Tabla 10 muestra los resultados para aquellos parámetros que se vieron significativamente relacionados con la presencia de determinados haplotipos. Las diferencias en los parámetros experimentales se establecieron respecto al haplotipo GCA para FokI, ApaI y TaqI respectivamente, el más prevalente en nuestra población con una frecuencia del 32,3%. Como puede observarse en la tabla, ciertas combinaciones específicas de alelos (haplotipos) de FokI, ApaI y TaqI se asociaron con cambios en los niveles de parámetros relacionados con el perfil lipídico, mediadores inflamatorios y estrés oxidativo. Así, el haplotipo ACA (frecuencia 24,8%) se asoció significativamente con niveles más altos de HDL colesterol (un aumento de 4,31 mg/dL (0,16-8,46), $p = 0,043$). El haplotipo AAA

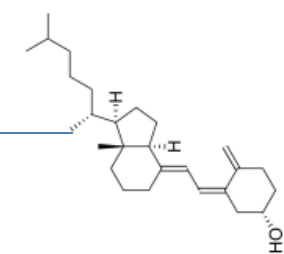


(frecuencia 4,16%) se asoció significativamente a descenso en los niveles de TNF- α (descenso de 6 pg/mL; $p=0,014$). Y el haplotipo GAA con parámetros relacionados con el estrés oxidativo. Este haplotipo se detectó en el 11,6% de los niños de nuestro estudio y se asoció con disminución de los niveles de isoprostanos del orden de 35 pg/mL ($p=0,035$). Este mismo haplotipo se relacionó con una elevación de PCR ultrasensible de 14,35 mg/L ($p=0,0049$).

Tabla 10: Análisis de haplotipos

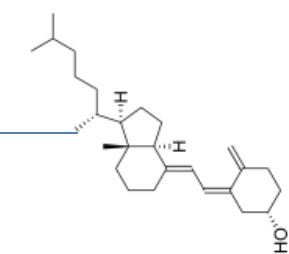
	rs2228570 (FokI) A>G	rs7975232 (ApaI) C>A	rs731236 (TaqI) A>G	Frecuencia (%)	Diferencia (95% CI)	P
HDL COLESTEROL (mg/dL)	A	C	A	24,83	4,31 (0,16 - 8,46)	0,043
VLDL COLESTEROL (mg/dL)	A	A	A	0,43	18,44 (5,66 - 31,22)	0,0051
PCR ULTRASENSIBLE (mg/L)	G	A	A	6,68	14,35 (4,44 - 24,26)	0,0049
VITAMINA D (ng/mL)	A	C	A	24,48	-3,82 (-7,04 - -0,6)	0,021
	A	A	A	5,6	-7,1 (-12,82 - -1,37)	0,016
IgG (mg/dL)	A	C	A	25,19	62,27 (8,37 - 116,17)	0,025
	G	A	G	23,3	63,95 (8,33 - 119,56)	0,025
	A	A	G	6,88	-41,71 (-45,68 - 37,75)	<0,0001
	A	A	A	3,04	176 (170 - 182)	<0,0001
IgE (kU/L)	A	C	A	24,74	-248 (-248 - -248)	<0,0001
	G	A	G	20,19	-513 (-513 - -513)	<0,0001
	G	A	A	12,02	-235 (-235 - -235)	<0,0001
	A	A	G	8,29	-93,1 (-93,13 - -93,1)	<0,0001
	G	C	G	1,04	-491 (-491 - -491)	<0,0001
	A	A	A	4,33	312 (312 - 312)	<0,0001
TNF α (pg/mL)	G	A	A	11,65	-3,02 (-5,92 - -0,12)	0,042
	A	A	A	4,16	-6,01 (-10,79 - -1,23)	0,014
ISOPROSTANOS (pg/mL)	G	A	A	11,61	-35,1 (-67,44 - -2,69)	0,035

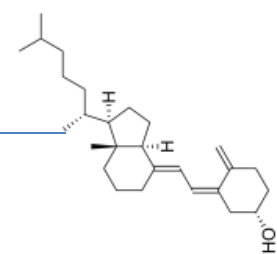
Los haplotipos ACA y AAA para FokI, ApaI y TaqI se asociaron significativamente con descensos en los niveles de vitamina D en nuestra muestra poblacional. De ellos, el ACA presenta una elevada frecuencia (24,48%) y se asocia a una disminución de los valores de vitamina D en 3,82 ng/mL ($p=0,021$). A nivel de las inmunoglobulinas, tanto para IgG como IgE, varios haplotipos se relacionan con cambios significativos en los valores finales aumentándolos o disminuyéndolos.



DISCUSIÓN





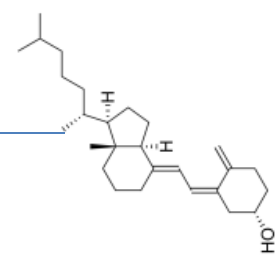


4. DISCUSIÓN

Como hemos comentado anteriormente, actualmente se plantea la hipótesis de que la vitamina D juega un papel en enfermedades inmunológicas como el asma. Esta hipótesis se basa en la identificación del receptor de la vitamina D en células tales como las presentadoras de antígeno y linfocitos T activados. A nivel genético, se han identificado diversos polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de la vitamina D, incluyendo el VDR, y algunos de ellos se han asociado con riesgo de asma (97). Muchos niños con asma presentan además bajos niveles de vitamina D en sangre, y la insuficiencia de vitamina D parece aumentar el riesgo de presentar mayor gravedad de la enfermedad, disminuir la función pulmonar, mostrar mayor reactividad al ejercicio, menor control del asma y mayores niveles de IgE y más incidencia de atopia (98). Nuestros resultados corroboran estas premisas ya que, si bien los niveles séricos de vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo se encuentran dentro del rango de la normalidad, sus niveles son significativamente inferiores a los de la población control (27,32 vs 32,14 ng/mL; $p=0,008$). Estos resultados justificarían la realización de estudios más pormenorizados en los que se hiciera un aporte de vitamina D en la dieta de estos niños y analizar su repercusión sobre la clínica del asma.

Por otra parte nuestros hallazgos han revelado relaciones directas entre los SNP FokI y ApaI del gen de VDR y parámetros asociados con el metabolismo de los lípidos, la inflamación y estrés oxidativo en niños y adolescentes con suficiencia de vitamina D. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que, no sólo los propios niveles de vitamina D sino factores condicionantes de su metabolismo y actuación, como las características de su VDR, pueden ser relevantes en el establecimiento de condiciones subclínicas protectoras o deletéreas para el funcionamiento orgánico, aunque no estrictamente relacionadas con el proceso asmático que nos ocupa.

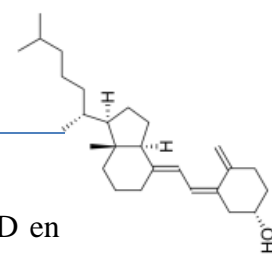
Se están llevando a cabo estudios multicéntricos que prueban el impacto de la suplementación con altas dosis de vitamina D en comparación con placebo en niños en edad preescolar, y se ha observado que dicha suplementación reduce la tasa de exacerbaciones del asma (99).



En este sentido se ha descrito que la suplementación de vitamina D durante el embarazo se asocia con un menor riesgo de sibilancias en los niños (100), aunque otros trabajos no confirman esta asociación (101), y se ha observado que niveles adecuados de 25-hidroxivitamina D se asocian con buena función pulmonar en pacientes con asma. Dado el papel de la vitamina D en la inflamación e inmunomodulación muchos estudios se han centrado en la exposición en el útero de vitamina D y la aparición de asma (10). La concentración de vitamina D en la mujer durante el embarazo es muy predictiva de los niveles de ésta en el hijo al nacimiento (101, 102). En el feto, la vitamina D parece desempeñar un papel en el desarrollo del sistema inmunológico y del pulmón. A comienzos de la gestación, es sintetizada por células deciduales, y puede ejercer un efecto autocrino o paracrino sobre el desarrollo del feto. Además, en las células sanguíneas del cordón umbilical, la vitamina D se ha demostrado que disminuye los niveles de IFN- γ , así como de IL-4 e IL-13 (7). En este sentido la suplementación de vitamina D durante el embarazo se ha asociado con un menor riesgo de sibilancias en los niños (98, 100, 102, 103, 104, 105). Por lo tanto, el nivel bajo de vitamina D durante el embarazo puede influir en la función pulmonar de la descendencia y contribuir al desarrollo del asma infantil. En un estudio en el que se examinó la relación entre los niveles neonatales de vitamina D y la aparición de asma en niños de 3 a 9 años en una gran muestra de población se observó que la elevación de los niveles de vitamina D reducía el riesgo de desarrollar asma. El estudio sugiere, además, que el estado de vitamina D neonatal sería un indicador del estado de vitamina D durante el período prenatal y su importancia para el desarrollo normal, inmunológico y pulmonar (106).

Por otro lado, también se ha demostrado un papel de la vitamina D como potencial modulador de la respuesta inmunitaria durante el embarazo. Es capaz de promover la respuesta inmune adaptativa antibacteriana a infecciones protegiendo de esta forma tanto a la madre como al feto, suprimiendo a su vez el efecto adverso inflamatorio de la respuesta inmune adaptativa. Lo cual permite este equilibrio en el sistema inmune entre lo propio y lo ajeno que se da durante el embarazo (107).

Se ha observado también que la vitamina D regula tanto directa como indirectamente la diferenciación y activación de los linfocitos Th2 y puede prevenir el

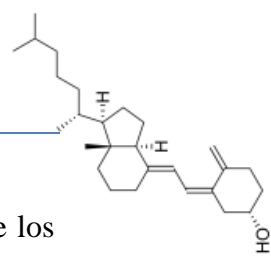


desarrollo de procesos autoinmunes (108), así como que los niveles de vitamina D en suero se correlacionan inversamente con el uso de corticoesteroides o medicamentos anti-inflamatorios en niños ya que es capaz de favorecer el efecto antiinflamatorio de estos (109). Sí se ha observado que niveles adecuados se asocian con buena función pulmonar en pacientes con asma (105). De hecho, existen estudios que muestran asociaciones significativas entre la dosis de corticoides inhalados con bajos niveles de vitamina D (109). Además, bajos niveles están asociados con un aumento en las tasas de hospitalización por asma, falta de respuesta a broncodilatadores y aumento en el recuento de eosinofilia y niveles de IgE (102).

A pesar de estos datos, la falta de información sobre la dosis óptima de vitamina D que asegura el adecuado funcionamiento del sistema inmunitario, la variabilidad de esta como biomarcador, y la elevada prevalencia de insuficiencia de vitamina D en la población occidental industrializada, justifican la necesidad de realizar nuevos estudios para establecer recomendaciones definitivas tanto para la prevención del asma como para el uso de la vitamina D con corticosteroides inhalados para prevenir la resistencia. (110, 111).

En la actualidad existen numerosos estudios en los que se han analizado los efectos de la vitamina D sobre el asma. Los estudios difieren tanto en el diseño como en el tamaño muestral, y arrojan resultados dispares (10, 41, 112). En la mayoría de ellos se describe una relación inversa entre niveles de vitamina D y severidad del asma, exacerbaciones y requerimiento de glucocorticoides inhalados. A su vez se han encontrado relaciones positivas entre vitamina D tanto con la función pulmonar como con el control del asma (61, 113). Un estudio realizado sobre más de 14.000 pacientes adultos mostró una asociación positiva entre elevados niveles de vitamina D y mayores valores en pruebas espirométricas (114). Sin embargo, también existen estudios donde no se encuentran diferencias en los niveles de vitamina D entre niños asmáticos y niños sanos.

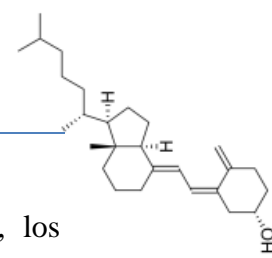
En nuestro estudio se observa una clara relación entre bajos niveles de vitamina D y asma con alergia a los ácaros del polvo. Existe amplia evidencia científica que demuestra que bajos niveles de vitamina D están asociados con mayor riesgo de sufrir



enfermedades como el asma dado el efecto que ejerce en el sistema inmunitario de los pacientes como hemos desarrollado anteriormente. También se ha observado que aquellos pacientes suplementados con vitamina D, como es el estudio realizado en mujeres embarazadas, tienen mejor pronóstico de no padecer asma a lo largo de la infancia, y que mayores niveles séricos mejoran el tratamiento con corticosteroides en estos pacientes. Quedando de esta forma clara y corroborada la relación existente entre la vitamina D y el asma.

Hasta la fecha, los estudios que han investigado el vínculo entre la vitamina D y el asma han tenido resultados contradictorios. La mayoría de las investigaciones relacionadas con este tema muestran efectos positivos de la vitamina D sobre el asma (115). En un estudio reciente realizado sobre 520 niños en la ciudad de Isfahan (Irán) se observó que los niveles de vitamina D en pacientes asmáticos y no asmáticos fueron 25,57 y 31,40 ng/mL, respectivamente, y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (116). También se ha observado que la alta expresión de marcadores inflamatorios e inmunoglobulina E y los bajos niveles de vitamina D eran factores de riesgo de asma infantil con raquitismo (117). Sin embargo existen estudios que muestran lo contrario (58, 102, 118, 119). Concretamente, en un estudio de casos-control sobre los niveles de vitamina D y asma en adultos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de vitamina D entre los casos y los controles (120). Y en otro estudio planteado para estudiar la correlación entre los niveles de vitamina D con el asma y los marcadores de alergia en un grupo de 71 niños sin ningún factor de confusión no se observó ninguna correlación entre los niveles de vitamina D y el grado de reactividad e inflamación de las vías respiratorias y la presencia de alergia (121). Autores como Vollmert et al. Tampoco encontraron esta asociación entre gen VDR y asma (122).

El papel de la vitamina D en el asma puede ser directo o a través de su receptor (VDR) en células implicadas en la reacción inmunitaria tales como células presentadoras de antígeno y linfocitos T activados, en su efecto inmunomodulador y en el efecto directo sobre el musculo liso bronquial (80). Las variantes epigenéticas y las variaciones del número de copias son el punto de partida para obtener datos de muestras clínicas y serán otra herramienta poderosa para la investigación de la heredabilidad

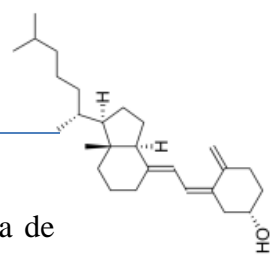


genética del asma y en el que hemos basado nuestro estudio. Por todo ello, los polimorfismos comunes en el receptor de la vitamina D y otros genes en la vía de la vitamina D merecen ser caracterizados (98).

Durante las dos últimas décadas, se han realizado un gran número de estudios para identificar las variantes genéticas relacionadas con el riesgo de desarrollar asma (74). Se han aplicado diferentes tipos de análisis, incluyendo análisis de correlación, polimorfismos de nucleótidos en genes candidatos, y de asociación con genoma completo. En conjunto estos datos sugieren que variantes del gen VDR pueden contribuir al riesgo de padecer asma, aunque existen diferencias entre poblaciones.

Esta creencia está impulsada por el reconocimiento de la expresión celular del receptor de vitamina D (VDR), el hallazgo de múltiples genes diana primarios de 1,25 (OH) 2D en las células inmunes y el descubrimiento de que muchas células inmunitarias (macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B) pueden convertir 25 (OH) vitamina D en 1,25 (OH) 2D a través de la actividad de CYP27B1 y, por lo tanto, podrían proporcionar niveles locales significativos para resultados funcionales (37). En nuestro estudio no hemos observado ninguna correlación estadísticamente significativa entre los polimorfismos del receptor de la vitamina D que hemos estudiado y asma, teniendo en cuenta nuestro grupo de población. Un estudio reciente en el que se analizaron otras variantes de genes relacionados con la vía de la vitamina D, no solo del receptor, sí se observaron resultados significativos. Así, el alelo C de rs9279 en VDR se asoció negativamente con el riesgo de asma (OR=0,66; IC del 95%: 0,45 a 0,97), insuficiencia de vitamina D (OR=0,78; IC del 95%: 0,70 a 0,96) y mayor expresión de VDR. Dos variantes en VDR se asociaron con la gravedad del asma, el alelo A de rs2189480 (OR=0,34; IC del 95%: 0,13 a 0,89) y el alelo G de rs4328262 (OR=3,18; IC del 95%: 1,09–9,28). La combinación de variantes en CYP2R1 y CYP24A1 (GAC, de rs10500804, rs12794714 y rs3886163, respectivamente) se asoció negativamente con la producción de vitamina D ($\beta = - 1,24$; IC del 95% - 2,42 a - 0,06) (56).

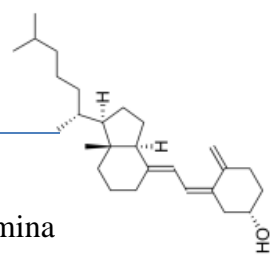
El asma es una enfermedad inflamatoria compleja de origen multifactorial y está influenciada por factores tanto ambientales como genéticos. También se ha postulado que polimorfismos en otros genes implicados en el ciclo de la vitamina D



pueden estar asociados con asma o atopia (79). Las disparidades en la prevalencia de asma entre sujetos provenientes de diferentes ubicaciones geográficas del mundo tienen más probabilidades de estar asociados con diferencias genéticas. Por ello se deberían analizar otras variantes genéticas o realizar estudios en grupos poblacionales más amplios para poder tener más información sobre este punto. Los polimorfismos que hemos evaluado en este estudio no muestran relación con menores niveles de vitamina D.

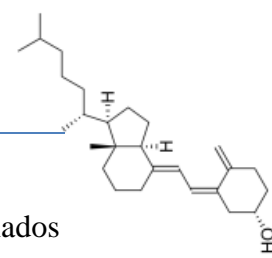
Los estudios sobre los efectos de las variaciones genéticas en el VDR también arrojan resultados contradictorios (115). En el estudio realizado en 2014 sobre población griega se evaluó por primera vez la potencial asociación entre los polimorfismos FokI, BsmI, ApaI y TaqI de VDR y el control del asma. Según sus resultados, los niños asmáticos con el genotipo ApaI-aa tenían significativamente mayor sintomatología de asma que los niños asmáticos portadores de los genotipos AA/Aa. Sin embargo, la frecuencia del genotipo ApaI-aa de VDR fue significativamente mayor en los asmáticos controlados que en los no controlados. Por lo tanto VDR ApaI-aa se asoció negativamente con la limitación en las actividades diarias debidas al asma, pero positivamente asociado con asma bien controlada (123).

En el estudio realizado sobre población de Costa Rica se observaron asociaciones significativas entre los niveles de Vitamina D y el riesgo de padecer asma y hospitalización. Los niños con bajos niveles de vitamina D presentaban mayor severidad del asma, mayores exacerbaciones y necesidad de hacer un escalado terapéutico (45). Sin embargo, en un estudio realizado en población china no se encontraron diferencias significativas en los genotipos rs2228570 (FokI) de VDR entre casos asmáticos y controles (75). Contrariamente, en otro estudio realizado también en china sí que se observó una asociación de este polimorfismo del gen VDR con rinitis alérgica, relacionándose el genotipo AA de rs2228570 (FokI) con un mayor riesgo. Varios estudios clínicos han confirmado que la vitamina D tiene influencia en el asma bronquial mediante la regulación del sistema inmunológico, y tanto la rinitis alérgica como el asma bronquial tienen una etiología y patogénesis similar y pertenecen a la misma categoría de enfermedades (124).



Se han realizado diversos estudios epidemiológicos sobre los niveles de vitamina D y asma en niños. La deficiencia de vitamina D se ha asociado con el desarrollo de asma y su frecuencia. Como ya hemos comentado previamente, esta deficiencia puede debilitar las defensas pulmonares contra las infecciones por su efecto antimicrobiano. Ello contribuiría al desencadenamiento de las exacerbaciones de asma (52). Numerosos estudios han encontrado una asociación entre la vitamina D y el asma. Sin embargo otros estudios no confirman estos resultados. Bossé et al. han propuesto que el efecto de la vitamina D podría estar relacionado con genes vinculados con la síntesis de la vitamina D (40), pero sí que existen estudios que han observado que la deficiencia de VDR induce alteraciones en la respuesta de las células Th2 y en la hiperreactividad bronquial (75). En 2004, Poon et al en un estudio sobre familias franco-canadienses mostraron que seis polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen VDR estaban asociados con asma (84). En un estudio posterior, Raby et al. observaron asociaciones significativas entre variantes del gen VDR y asma en dos estudios diferentes: el Childhood Asthma Management Program (CAMP) y en el Nurses' Health Study (NHS), aunque con resultados en algunos casos diferentes (125). En conjunto estos datos sugieren que variantes del gen VDR pueden contribuir al riesgo de padecer asma, aunque existen diferencias entre poblaciones.

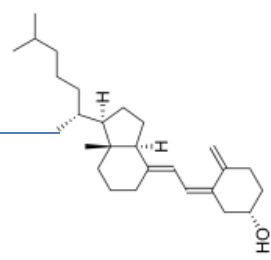
VDR regula las principales funciones biológicas de la vitamina D; como tal, planteamos la hipótesis de que los SNP funcionales pueden tener un impacto directo en la expresión y funcionalidad de VDR y la susceptibilidad a condiciones relacionadas con el metabolismo de la vitamina D. La evidencia inicial de un vínculo entre VDR y asma se encontró en los estudios que indicaban una asociación genética del VDR con el cromosoma 12, una región del genoma previamente relacionada con el asma. Dos estudios familiares diferentes en sujetos norteamericanos informaron de una asociación entre los polimorfismos de VDR y asma (7). El VDR está presente en las células del músculo liso bronquial donde su interacción con la vitamina D permitiría regular la expresión de más de 400 genes, muchos de los cuales han sido implicados en la patogénesis del asma (7). Sin embargo, ya en este mismo artículo se incide en la enorme controversia que existe entre los niveles de vitamina D y la presencia de asma, si bien los casos en los que la vitamina D parece perjudicial son los menos y se relacionan con trabajos en los que los datos son obtenidos por encuestas o existe pérdida de datos (57).



Por lo tanto, persiste la necesidad de realizar estudios más pormenorizados y detallados para conocer los verdaderos efectos de la vitamina D en niños asmáticos.

Durante el presente estudio también se ha evaluado la relación de estos polimorfismos con el metabolismo lipídico. VDR regula las principales funciones biológicas de la vitamina D; como tal, planteamos la hipótesis de que los SNP funcionales puedan tener, además de un impacto directo en la expresión y susceptibilidad de VDR a condiciones relacionadas con el metabolismo de la vitamina D, otros efectos derivados de la modulación por esta vitamina de ciertas condiciones metabólicas. Entre ellas, el metabolismo lipídico, la inflamación y el estrés oxidativo. Muchos estudios preclínicos en animales con deficiencia de vitamina D o con expresión genéticamente silenciada de VDR han demostrado que las alteraciones en las interacciones entre la vitamina D y su receptor pueden resultar en trastornos y eventos cardiovasculares. En este estudio hemos observado que la presencia de ciertos polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D puede tener efectos beneficiosos aumentando los valores de HDL en caso del SNP FokI o con alteraciones a nivel cualitativo (presencia o ausencia de enfermedad) en los niveles de colesterol y HDL en el caso del SNP ApaI.

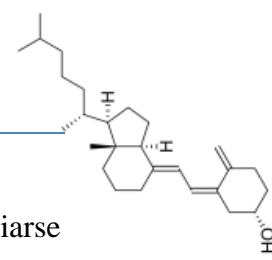
Nuestro estudio no muestra efectos significativos de ninguno de los polimorfismos individuales sobre los niveles de vitamina D, pero sí que aquellos pacientes con el genotipo AA de FokI presentan niveles significativamente más altos de HDL-C en suero. El hallazgo fue más evidente en los niños. Como tal, hipotetizamos que este genotipo puede estar asociado con un menor riesgo de enfermedad cardiovascular. El HDL-C tiene un papel destacado en el transporte inverso de colesterol. Las partículas de HDL-C han sido asociadas con numerosas acciones protectoras relacionadas con la aterosclerosis, incluidas funciones antioxidantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, metabólicas y vasodilatadoras. Nuestros datos están de acuerdo con el estudio de Filus et al. realizado sobre una población de individuos de Polonia diagnosticados de síndrome metabólico; los individuos con esta misma variante de FokI tenían niveles más altos de HDL-C sérico y un menor riesgo cardiovascular (126). De hecho se ha descrito que la suplementación con vitamina D puede mejorar los niveles de HDL y potencialmente disminuir el riesgo cardiovascular (127).



Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que los efectos funcionales del SNP de FokI podrían ser gen y/o tipo celular específicos, y también dependientes de edad y género. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la modulación de los niveles séricos de HDL-C por SNP de VDR no están completamente establecidos.

La relación existente entre déficit de vitamina D y riesgo cardiovascular está avalada por la bibliografía. Se han hallado receptores de vitamina D en el musculo liso, musculo cardíaco y vasos sanguíneos, y se ha demostrado que la deficiencia de vitamina D se asocia con una marcada incidencia de cardiopatías (128). De hecho se ha demostrado en un estudio que niveles óptimos de vitamina D, al menos de 30 ng/ml, se asocian a bajos niveles de infarto de miocardio. Debido a que los niveles de vitamina D están influenciados en gran medida por la exposición al sol, es plausible que otra consecuencia de la exposición al sol que no sea la producción de vitamina D sea la responsable de la asociación observada con este riesgo. No obstante, numerosas evidencias apoyan que las alteraciones en las interacciones entre la vitamina D y su receptor pueden afectar el riesgo cardiovascular y, por lo tanto, en la incidencia de trastornos crónicos y eventos cardiovasculares (129). Entre los mecanismos potencialmente relevantes la vitamina D influye en la proliferación de células lisas vasculares, la inflamación y la calcificación vascular, y la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina (128, 129).

Según muestran las evidencias epidemiológicas, el déficit de vitamina D se puede asociar más fuertemente con la salud cardíaca que el colesterol. Giovanucci en el estudio Health Professionals Follow Up, mostró en 10 años de forma prospectiva en 454 hombres que desarrollaron enfermedad cardiovascular e infartos de miocardio que los niveles más bajos de Vitamina D se relacionan con un 250% más de probabilidad de tener una cardiopatía comparado con niveles mayores de 30 ng/ml ajustando sobrepeso, tabaco, alcohol, nivel de actividad física, historial previo familiar, diabetes, triglicéridos y niveles de colesterol entre otros (130). Las características de nuestro estudio no nos permiten evaluar el efecto a nivel cardiovascular de los niveles de vitamina D, pero sí constatar que polimorfismos en su receptor tienen un efecto a nivel del metabolismo

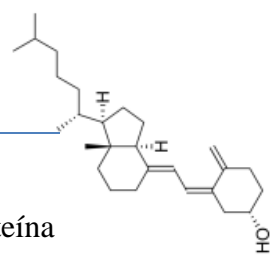


lipídico y por consiguiente en el riesgo cardiovascular. Nuestro estudio podría ampliarse en esta dirección en posteriores análisis.

Es de destacar también el efecto que tiene la presencia del SNP de TaqI en los niveles de inmunoglobulinas de nuestros pacientes de estudio. Aumenta los niveles de IgA e IgM y disminuye en una cifra considerable los niveles de IgE. Se ha descrito la presencia del receptor de la vitamina D en casi todas las células inmunes y que sus polimorfismos se asocian con un aumento o incidencia de enfermedades autoinmunes. Pacientes afectados por diversas enfermedades autoinmunes han mostrado niveles bajos de vitamina D. La unión de esta vitamina con su receptor regula más de 900 genes involucrados en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la inmunidad innata y la adaptativa (131). El efecto que la vitamina D tiene sobre las enfermedades autoinmunes afecta a las inmunoglobulinas y se ha observado que polimorfismos en su receptor modifican los niveles séricos de estas.

Además, el alelo A del SNP ApaI se asoció en nuestro estudio con niveles séricos disminuidos de TNF- α e isoprostanos, marcadores de inflamación y estrés oxidativo respectivamente, en un modo de herencia aditivo. Los niveles séricos de isoprostanos representan un índice de estrés oxidativo endógeno y proporcionan evidencia del impacto químico directo de las especies reactivas de oxígeno en los sistemas biológicos. La inflamación juega un papel central en una amplia variedad de problemas de salud física y mental y también puede ser un factor de riesgo en la aparición y desarrollo de numerosos tipos de cáncer. En la literatura se han descrito interacciones complejas entre el estrés oxidativo y las vías inflamatorias. Las especies reactivas de oxígeno pueden activar factores de transcripción, incluido el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y, por lo tanto, aumentar la expresión de citoquinas proinflamatorias, incluido el TNF- α (132). La vitamina D puede inhibir esta vía de señalización y, por lo tanto, limitar la inflamación.

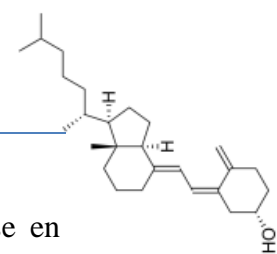
En este estudio, hemos observado que los niveles disminuidos de TNF- α e isoprostanos estaban relacionados con el SNP de ApaI en niños con suficiencia de vitamina D. Por tanto, este genotipo podría contribuir a la protección de procesos inflamatorios. El SNP ApaI se encuentra en el intrón 8 en la región 3' no traducible del



gen VDR y no tiene impacto en la secuencia o estructura de aminoácidos de la proteína VDR; sin embargo, podría alterar la estabilidad del ARNm de VDR y/o interferir con su traducción ya que las regiones no traducibles del gen pueden modular la expresión génica regulando estos procesos a nivel postranscripcional y traduccional. Niveles reducidos de ARNm o con menor estabilidad pueden limitar la síntesis de la proteína VDR y, en consecuencia, reducir la respuesta a la vitamina D. En este sentido, el polimorfismo en ApaI podría funcionar como un potenciador intrónico, mediando en el empalme alternativo del ARNm de VDR y / o ser relevante como potenciador de la transcripción génica.

Según indica el análisis de haplotipos en nuestra población, determinadas combinaciones de alelos de los SNP FokI, ApaI y TaqI se asocian con cambios en el perfil lipídico y niveles de mediadores inflamatorios y oxidativos. Entre ellos, identificamos una asociación significativa entre el haplotipo ACA y niveles elevados de HDL-C, observación que confirma su papel con respecto a la modulación del metabolismo lipídico. Por el contrario, el haplotipo AAA se asoció con niveles disminuidos de TNF- α en suero; y el haplotipo GAA con disminución de los niveles de isoprostanos, aún en mayor medida que la asociación observada individualmente con ApaI. Por lo tanto, estos haplotipos contribuyen a una menor inflamación y estrés oxidativo.

Estudios anteriores han examinado los haplotipos en los SNP de VDR, indicando que los haplotipos asociados con los SNPs FokI, BmsI, TaqI y ApaI podrían contribuir significativamente como grupo por encima de los observados de forma individual (133, 134). Nuestros hallazgos contribuyen a este grupo y también sugieren asociaciones entre los haplotipos de VDR con efectos inflamatorios y marcadores de estrés oxidativo. Además, es cierto que la aparición de un desequilibrio de ligamiento con uno o más SNP funcionales en otras partes del gen VDR también podría servir para explicar algunos de las asociaciones observadas. Estos resultados destacan el hecho de que los polimorfismos del gen para VDR pueden desempeñar un papel importante en la susceptibilidad general o en la protección a enfermedades degenerativas.

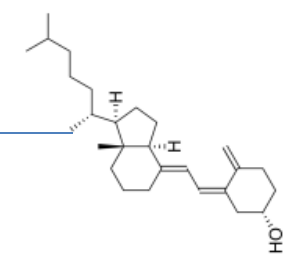


Existen varias limitaciones con respecto a este estudio que deben tenerse en cuenta al interpretar nuestros resultados. Una limitación es el tamaño de la muestra. Sin embargo, es una consecuencia de la homogeneidad de la población estudiada que fue diseñado con el fin de limitar el sesgo y aumentar la validez de los resultados. Una de las razones de la divergencia entre nuestros resultados y los de otros estudios podría estar relacionada con diferencias en homogeneidad versus heterogeneidad de otras poblaciones estudiadas.

Finalmente, este estudio se centró exclusivamente en niños españoles caucásicos con suficiencia de vitamina D. Está bien establecido que muchos factores como la edad, el origen étnico y el medio ambiente pueden condicionar no solo los efectos de la vitamina, sino también la expresión de ARNm de VDR (135). Se plantearán nuevos estudios para dilucidar la importancia de las diferencias genéticas observadas en otras poblaciones o condiciones.

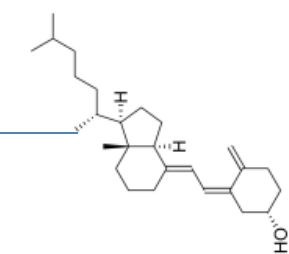
De todos estos estudios se discierne la necesidad de realizar más investigaciones para clarificar la asociación entre polimorfismos de genes implicados en las acciones de la vitamina D, asma y su relación con los parámetros de inflamación y de estrés oxidativo. Es por todo lo expuesto por lo que nos hemos planteado este proyecto para contribuir al mejor conocimiento de la relación entre las variantes genéticas y los polimorfismos del VDR en el asma infantil. Puesto que los análisis a nivel celular tienen importancia pronóstica en relación a la enfermedad, establecer con exactitud cuáles son los polimorfismos implicados en esta respuesta ayudaría en el seguimiento de estos pacientes con la consiguiente reducción en las complicaciones que pudieran aparecer a largo plazo.

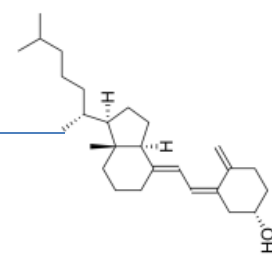
A fines prácticos, los beneficios esperables de nuestros resultados han de considerarse desde diferentes aspectos. Desde el punto de vista sanitario, la población asmática es cuantitativamente muy importante (tendente al aumento en las últimas décadas) y, a largo plazo, esta predispuesta a sufrir complicaciones que convierten su tratamiento en un gasto importante para nuestro sistema sanitario. En su visión científica hay que resaltar la novedad del estudio.



CONCLUSIONES

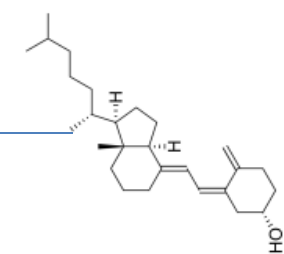






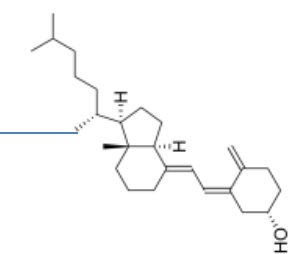
5. CONCLUSIONES

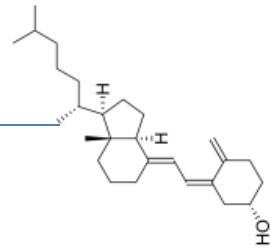
1. La frecuencia de los SNP de VDR FokI, ApaI y TaqI no difiere significativamente entre niños asmáticos y controles,
2. En ambos grupos poblacionales los niveles de vitamina D se encontraron en el rango de suficiencia, pero fueron significativamente inferiores en los niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo.
3. Exceptuando los indicadores relacionados con la propia patología alérgica (IgE total y específica), el resto de parámetros analizados presentaron valores dentro del rango normal, sin diferencias significativas entre los grupos asmático y control. Ello incluye los parámetros indicativos de estrés oxidativo/nitrosativo, estado inflamatorio y metabolismo lipídico.
4. Según nuestros resultados, el genotipo mutado de VDR FokI se asocia significativamente con elevación de los niveles de HDL colesterol. ApaI con disminución de los niveles de isoprostanos y TNF- α . El genotipo TaqI no se ha asociado con efectos sobre los parámetros de metabolismo lipídico, inflamación o estrés oxidativo/nitrosativo.
5. Combinaciones específicas de alelos (haplotipos) de FokI, ApaI y TaqI se asociaron significativamente con cambios en los niveles de parámetros relacionados con el perfil lipídico, mediadores inflamatorios y estrés oxidativo. ACA con niveles más altos de HDL colesterol; AAA con descenso en los niveles de TNF- α ; y GAA con disminución de 8-iso-PGF 2α .
6. Los haplotipos ACA y AAA para FokI, ApaI y TaqI se asociaron significativamente con descensos en los niveles de vitamina D en nuestra muestra poblacional.
7. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que, no sólo los propios niveles de vitamina D sino factores condicionantes de su metabolismo y actuación, como las características de su VDR, pueden ser relevantes en el establecimiento de condiciones subclínicas protectoras o deletéreas para el funcionamiento orgánico, aunque no estrictamente relacionadas con el proceso asmático.



BIBLIOGRAFIA

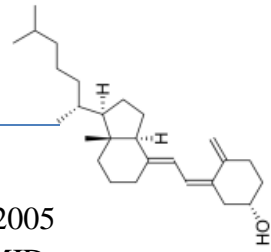




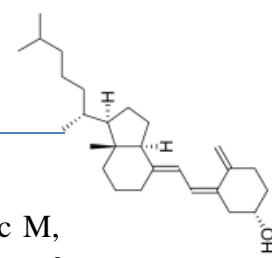


6. BIBLIOGRAFIA

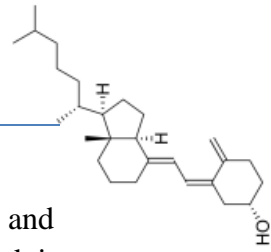
1. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma (Full Report 2007). National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program.
2. Adamko DJ, Sykes BD, Rowe BH. The metabolomics of asthma: novel diagnostic potential. *Chest*. 2012 May;141(5):1295-1302. doi: 10.1378/chest.11-2028. PMID: 22553262.
3. Leung TF, Ko FW, Wong GW. Recent advances in asthma biomarker research. *Thorax*. 2013 Oct;72(10):1177-1183. doi: 10.1177/1753465813496863. Epub 2013 Aug 1. PMID: 23907809.
4. Aguinaga Ontoso I, Arnedo Pena A, Bellido J, Guillén Grima F, Suárez Varela MM. Prevalencia de síntomas relacionados con el asma en niños de 13-14 años de 9 poblaciones españolas. Grupo Español del Estudio ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) [The prevalence of asthma-related symptoms in 13-14-year-old children from 9 Spanish populations. The Spanish Group of the ISAAC Study (International Study of Asthma and Allergies in Childhood)]. *Med Clin (Barc)*. 1999 Feb 13;112(5):171-5. Spanish. Erratum in: *Med Clin (Barc)* 1999 Apr 17;112(13):494. PMID: 10091210.
5. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J*. 1995 Mar;8(3):483-91. doi: 10.1183/09031936.95.08030483. PMID: 7789502.
6. Akinbami LJ, Schoendorf KC. Trends in childhood asthma: prevalence, health care utilization, and mortality. *Pediatrics*. 2002 Aug;110(2 Pt 1):315-22. doi: 10.1542/peds.110.2.315. PMID: 12165584.
7. Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009 Nov;5(6):693-702. doi: 10.1586/eci.09.53. PMID: 20161622; PMCID: PMC2812815.
8. Franken C, Lambrechts N, Govarts E, Koppen G, Den Hond E, Ooms D, Voorspoels S, Bruckers L, Loots I, Nelen V, Sioen I, Nawrot TS, Baeyens W, Van Larebeke N, Schoeters G. Phthalate-induced oxidative stress and association with asthma-related airway inflammation in adolescents. *Int J Hyg Environ Health*. 2017 Apr;220(2 Pt B):468-477. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.01.006. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28174042.
9. Carvajal-Urueña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suárez-Varela M, García de Andoin N, Batlles-Garrido J, Blanco-Quirós A, López-Silvarrey A, García-Hernández G, Guillén-Grimaj F, González-Díaz C, Bellido-Blasco J. Variaciones geográficas en la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) fase III España [Geographic variation in the prevalence of asthma symptoms in Spanish children and adolescents. International Study of Asthma and



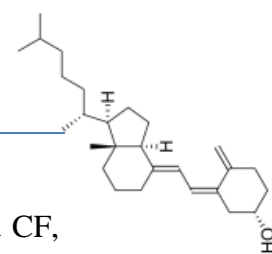
- Allergies in Childhood (ISAAC) Phase 3, Spain]. *Arch Bronconeumol*. 2005 Dec;41(12):659-66. Spanish. doi: 10.1016/s1579-2129(06)60333-9. PMID: 16373042.
10. Brown SD, Calvert HH, Fitzpatrick AM. Vitamin D and asthma. *Dermatoendocrinol*. 2012 Apr 1;4(2):137-45. doi: 10.4161/derm.20434. PMID: 22928069; PMCID: PMC3427192.
 11. Janson C, Anto J, Burney P, Chinn S, de Marco R, Heinrich J, Jarvis D, Kuenzli N, Leynaert B, Luczynska C, Neukirch F, Svanes C, Sunyer J, Wjst M; European Community Respiratory Health Survey II. The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? *European Community Respiratory Health Survey II. Eur Respir J*. 2001 Sep;18(3):598-611. doi: 10.1183/09031936.01.00205801. PMID: 11589359.
 12. Brotons Muntó F, Aguar Benito MC, Blanes Arnauda N, Garcia Prieto M, Jorro Llagaria A. *Guia de Actuacion Clínica en A.P. Asma Bronquial*.
 13. Rebolledo-Cobos RC, Teixeira B, Correa C. Asma, estrés oxidativo y ejercicio físico: revisión de la literatura. *Fisioterapia*.2014;36(1):40-48.
 14. GEMA^{4,4}. *Guía Española para el Manejo del Asma*, 2019. https://semg.es/images/documentos/GEMA_4_4
 15. Navarrete-Rodriguez E, Sierra-Monge JLL, Pozo-Beltran CF. Asma en pediatría. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. Vol. 59, n.o 4, Julio-Agosto 2016 5.
 16. Erzurum SC. New Insights in Oxidant Biology in Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Mar;13 Suppl 1(Suppl 1):S35-9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201506-385MG. PMID: 27027950; PMCID: PMC5015728.
 17. Ramírez-Prieto MT, García-Río F, Villamor J. Papel del estrés oxidativo en las enfermedades respiratorias y su monitorización [Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring]. *Med Clin (Barc)*. 2006 Sep 16;127(10):386-96. Spanish. doi: 10.1157/13092440. PMID: 16987485.
 18. Cantú-Gonzalez G, Fernandez.Figueroa F, Gochicoa.Rangel L, Miguel-Reyes JL, Vargas-Dominguez C, Mejia-Alfaro R and Torre-Bouscoulet L. Fracción exhalada de óxido nítrico. Recomendaciones clínicas y procedimiento. *Neumol Cir Torax*. 2013; 72. 1:43-51.
 19. Abe MK, Chao TS, Solway J, Rosner MR, Hershenson MB. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Nov;11(5):577-85. doi: 10.1165/ajrcmb.11.5.7946386. PMID: 7946386.
 20. Antus B. Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2930434. doi: 10.1155/2016/2930434. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26885248; PMCID: PMC4738959.



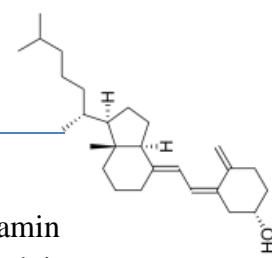
21. Topic A, Francuski D, Nikolic A, Milosevic K, Jovicic S, Markovic B, Djukic M, Radojkovic D. The Role of Oxidative Stress in the Clinical Manifestations of Childhood Asthma. *Fetal Pediatr Pathol.* 2017 Aug;36(4):294-303. doi: 10.1080/15513815.2017.1315199. Epub 2017 May 8. PMID: 28481134.
22. Xu M, Xu J, Yang X. Asthma and risk of cardiovascular disease or all-cause mortality: a meta-analysis. *Ann Saudi Med.* 2017 Mar-Apr;37(2):99-105. doi: 10.5144/0256-4947.2017.99. PMID: 28377538; PMCID: PMC6150547.
23. Hollingsworth HM, O'Connor GT. Asthma-Here Today, Gone Tomorrow? *JAMA.* 2017 Jan 17;317(3):262-263. doi: 10.1001/jama.2016.19676. PMID: 28114530
24. Lim TK. Improving Asthma Outcomes: Strategies for the Future. *Ann Acad Med Singap.* 2016 Dec;45(12):532-533. PMID: 28062880.
25. DeLuca HF. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 1988 Mar 1;2(3):224-36. PMID: 3280376.
26. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Feb;4(2):80-90. doi: 10.1038/ncpendmet0716. PMID: 18212810; PMCID: PMC2678245.
27. Zuluaga Espinosa NA, Alfaro Velásquez JM, Balthazar González V, Jiménez Blanco KE, Campuzano Maya G. Vitamina D: nuevos paradigmas. *Medicina & Laboratorio.* 2011;17:5-6.
28. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R, Laporta-Martín P, Carratalá-Calvo A, Alonso-Iglesias E. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr.* 2012 Nov;161(5):848-54. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.04.046. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22677566.
29. Vitamina D: Evidencias y Controversias. *Infac (Información Farmacoterapeutica de la Comarca).* 2012; 20.
30. Matsui MS. Vitamin D Update. *Curr Dermatol Rep.* 2020 Oct 14:1-8. doi: 10.1007/s13671-020-00315-0. Epub ahead of print. PMID: 33078087; PMCID: PMC7556559.
31. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998 Oct;78(4):1193-231. doi: 10.1152/physrev.1998.78.4.1193. PMID: 9790574.
32. Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Sep;3(5):1548-54. doi: 10.2215/CJN.01350308. Epub 2008 Jun 11. PMID: 18550652; PMCID: PMC4571149.



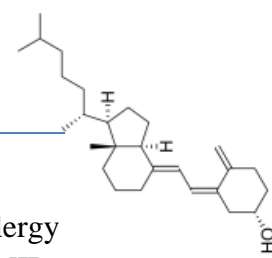
33. Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E. Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy*. 2012 Jan;67(1):10-7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02711.x. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21933195.
34. Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function. *Vitam Horm*. 2011;86:1-21. doi: 10.1016/B978-0-12-386960-9.00001-0. PMID: 21419265.
35. Masuda S, Jones G. Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Mol Cancer Ther*. 2006 Apr;5(4):797-808. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0539. PMID: 16648549.
36. Zhang Y, Leung DY, Goleva E. Anti-inflammatory and corticosteroid-enhancing actions of vitamin D in monocytes of patients with steroid-resistant and those with steroid-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jun;133(6):1744-52.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.004. Epub 2014 Jan 11. PMID: 24418482; PMCID: PMC4040328.
37. Lucas RM, Gorman S, Geldenhuys S, Hart PH. Vitamin D and immunity. *F1000Prime Rep*. 2014 Dec 1;6:118. doi: 10.12703/P6-118. PMID: 25580272; PMCID: PMC4251419.
38. Navarro- Moreno MA and Alía-Ramos P. Metabolismo óseo. Vitamina D y PTH. *Endocrinol Nutr*. 2006;53(3):199-208.
39. Scolletta S, Colletti M, Di Luigi L, Crescioli C. Vitamin D receptor agonists target CXCL10: new therapeutic tools for resolution of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:876319. doi: 10.1155/2013/876319. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23690671; PMCID: PMC3652186.
40. Bossé Y, Lemire M, Poon AH, Daley D, He JQ, Sandford A, White JH, James AL, Musk AW, Palmer LJ, Raby BA, Weiss ST, Kozyrskyj AL, Becker A, Hudson TJ, Laprise C. Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respir Res*. 2009 Oct 24;10(1):98. doi: 10.1186/1465-9921-10-98. PMID: 19852851; PMCID: PMC2779188.
41. Paul G, Brehm JM, Alcorn JF, Holguín F, Aujla SJ, Celedón JC. Vitamin D and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jan 15;185(2):124-32. doi: 10.1164/rccm.201108-1502CI. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22016447; PMCID: PMC3297088.
42. Liu Y, Li C, Chen P, Li X, Li M, Guo H, Li J, Chu R, Wang H. Polymorphisms in the vitamin D Receptor (VDR) and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e66716. doi: 10.1371/journal.pone.0066716. PMID: 23826116; PMCID: PMC3691226.
43. Devereux G, Macdonald H, Hawrylowicz C. Vitamin D and asthma: time for intervention? *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):739-40. doi: 10.1164/rccm.200901-0145ED. PMID: 19383926.



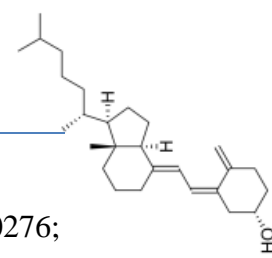
44. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect.* 2006 Dec;134(6):1129-40. doi: 10.1017/S0950268806007175. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16959053; PMCID: PMC2870528.
45. Montero-Arias F, Sedó-Mejía G, Ramos-Esquível A. Vitamin d insufficiency and asthma severity in adults from costa rica. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013 Sep;5(5):283-8. doi: 10.4168/aair.2013.5.5.283. Epub 2013 Jul 24. PMID: 24003384; PMCID: PMC3756174.
46. Mak G, Hanania NA. Vitamin D and asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Jan;17(1):1-5. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283411440. PMID: 21045696.
47. Kerley CP, Elnazir B, Faul J, Cormican L. Vitamin D as an adjunctive therapy in asthma. Part 1: A review of potential mechanisms. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015 Jun;32:60-74. doi: 10.1016/j.pupt.2015.02.004. Epub 2015 Feb 28. PMID: 25732539.
48. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, Eschmann R, Bals R. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. *Respir Res.* 2011 Mar 18;12(1):31. doi: 10.1186/1465-9921-12-31. PMID: 21418564; PMCID: PMC3071319.
49. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, Szegedi G, Brun JG, Gesztelyi R, Zeher M, Bodolay E. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol.* 2008 Sep;68(3):261-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02127.x. Epub 2008 May 29. PMID: 18510590.
50. Schedel M, Jia Y, Michel S, Takeda K, Domenico J, Joetham A, Ning F, Strand M, Han J, Wang M, Lucas JJ, Vogelberg C, Kabesch M, O'Connor BP, Gelfand EW. 1,25D3 prevents CD8(+)Tc2 skewing and asthma development through VDR binding changes to the Cyp11a1 promoter. *Nat Commun.* 2016 Jan 11;7:10213. doi: 10.1038/ncomms10213. PMID: 26750596; PMCID: PMC4712703.
51. Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, Harmelin A, Levo Y, Shachar I. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur J Immunol.* 2004 Apr;34(4):1068-76. doi: 10.1002/eji.200324532. PMID: 15048717.
52. Sypniewska G, Krintus M, Fulgheri G, Siodmiak J, Kuligowska-Prusinska M, Stepień-Jaszowska B, Staszak-Kowalska R, Zawadzka-Krajewska A, Kierat S, Bergmann K, Demkow U. 25-Hydroxyvitamin D, biomarkers of eosinophilic inflammation, and airway remodeling in children with newly diagnosed untreated asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2017 May 1;38(3):29-36. doi: 10.2500/aap.2017.38.4026. PMID: 28441982.
53. Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3432-6. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3432. PMID: 15322208.



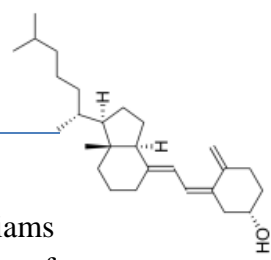
54. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1717S-20S. doi: 10.1093/ajcn/80.6.1717S. PMID: 15585793.
55. Upham JW, Sly PD. Vitamin D in Asthma. Is the Golden Bullet Losing Its Luster? *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Mar 15;193(6):598-600. doi: 10.1164/rccm.201511-2213ED. PMID: 26977965.
56. Galvão AA, de Araújo Sena F, Andrade Belitardo EMM, de Santana MBR, Costa GNO, Cruz ÁA, Barreto ML, Costa RDS, Alcantara-Neves NM, Figueiredo CA. Genetic polymorphisms in vitamin D pathway influence 25(OH)D levels and are associated with atopy and asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2020 Jul 9;16:62. doi: 10.1186/s13223-020-00460-y. PMID: 32834827; PMCID: PMC7386242.
57. Sikorska-Szaflik H, Sozańska B. The Role of Vitamin D in Respiratory Allergies Prevention. Why the Effect Is so Difficult to Disentangle? *Nutrients.* 2020 Jun 17;12(6):1801. doi: 10.3390/nu12061801. PMID: 32560403; PMCID: PMC7353247.
58. Riverin BD, Maguire JL, Li P. Vitamin D Supplementation for Childhood Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015 Aug 31;10(8):e0136841. doi: 10.1371/journal.pone.0136841. PMID: 26322509; PMCID: PMC4556456.
59. Himes BE, Koziol-White C, Johnson M, Nikolos C, Jester W, Klanderman B, Litonjua AA, Tantisira KG, Truskowski K, MacDonald K, Panettieri RA Jr, Weiss ST. Vitamin D Modulates Expression of the Airway Smooth Muscle Transcriptome in Fatal Asthma. *PLoS One.* 2015 Jul 24;10(7):e0134057. doi: 10.1371/journal.pone.0134057. PMID: 26207385; PMCID: PMC4514847.
60. Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Apr 1;181(7):699-704. doi: 10.1164/rccm.200911-1710OC. Epub 2010 Jan 14. PMID: 20075384; PMCID: PMC2868500.
61. Einisman H, Reyes ML, Angulo J, Cerda J, López-Lastra M, Castro-Rodriguez JA. Vitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphisms in asthmatic children: a case-control study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015 Sep;26(6):545-50. doi: 10.1111/pai.12409. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26011658.
62. Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest.* 2005 Dec;128(6):3792-8. doi: 10.1378/chest.128.6.3792. PMID: 16354847.
63. Ginter E, Simko V. Deficiency of vitamin D and vitamin C in the pathogenesis of bronchial asthma. *Bratisl Lek Listy.* 2016;117(6):305-7. doi: 10.4149/bll_2016_060. PMID: 27546360.
64. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, Bush A, Saglani S, Hawrylowicz CM. Vitamin D binding protein and asthma severity in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Jun;129(6):1669-71. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.017. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22460073.



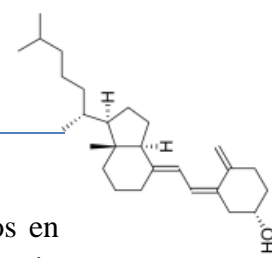
65. Ginde AA, Sutherland ER. Vitamin D in asthma: panacea or true promise? *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jul;126(1):59-60. doi: 10.1016/j.jaci.2010.05.030. PMID: 20620566.
66. Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019 Sep 4;11(9):2090. doi: 10.3390/nu11092090. PMID: 31487802; PMCID: PMC6769522.
67. Del Pinto R, Ferri C. Inflammation-Accelerated Senescence and the Cardiovascular System: Mechanisms and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 22;19(12):3701. doi: 10.3390/ijms19123701. PMID: 30469478; PMCID: PMC6321367.
68. Iribarren C, Tolstykh IV, Eisner MD. Are patients with asthma at increased risk of coronary heart disease? *Int J Epidemiol.* 2004 Aug;33(4):743-8. doi: 10.1093/ije/dyh081. Epub 2004 May 6. PMID: 15131088.
69. Strand LB, Tsai MK, Wen CP, Chang SS, Brumpton BM. Is having asthma associated with an increased risk of dying from cardiovascular disease? A prospective cohort study of 446 346 Taiwanese adults. *BMJ Open.* 2018 May 31;8(5):e019992. doi: 10.1136/bmjopen-2017-019992. PMID: 29858410; PMCID: PMC5988076.
70. Xu M, Xu J, Yang X. Asthma and risk of cardiovascular disease or all-cause mortality: a meta-analysis. *Ann Saudi Med.* 2017 Mar-Apr;37(2):99-105. doi: 10.5144/0256-4947.2017.99. PMID: 28377538; PMCID: PMC6150547
71. Tattersall MC, Evans MD, Korcarz CE, Mitchell C, Anderson E, DaSilva DF, Salazar LP, Gern JE, Jackson DJ, Lemanske RF Jr, Stein JH. Asthma is associated with carotid arterial injury in children: The Childhood Origins of Asthma (COAST) Cohort. *PLoS One.* 2018 Sep 27;13(9):e0204708. doi: 10.1371/journal.pone.0204708. PMID: 30261051; PMCID: PMC6160166.
72. Di Gennaro A, Haeggström JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. *Adv Immunol.* 2012;116:51-92. doi: 10.1016/B978-0-12-394300-2.00002-8. PMID: 23063073.
73. He X, Cheng G, He L, Liao B, Du Y, Xie X, Zhang S, Li G, Wang Y, Zhang Y. Adults with current asthma but not former asthma have higher all-cause and cardiovascular mortality: a population-based prospective cohort study. *Sci Rep.* 2021 Jan 14;11(1):1329. doi: 10.1038/s41598-020-79264-4. PMID: 33446724; PMCID: PMC7809422.
74. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WOCM; GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 23;363(13):1211-1221. doi: 10.1056/NEJMoa0906312. PMID: 20860503; PMCID: PMC4260321.
75. Li F, Jiang L, Willis-Owen SA, Zhang Y, Gao J. Vitamin D binding protein variants associate with asthma susceptibility in the Chinese Han population. *BMC Med*



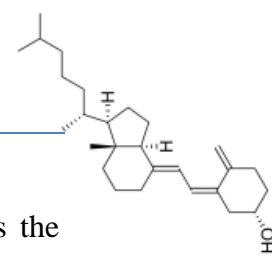
- Genet. 2011 Aug 3;12:103. doi: 10.1186/1471-2350-12-103. PMID: 21810276; PMCID: PMC3163515.
76. Ashok N, Kirubakaran R, Saraswathy R. Association of vitamin D gene polymorphisms in children with asthma - A systematic review. *Heliyon*. 2020 Sep 1;6(9):e04795. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04795. PMID: 32939414; PMCID: PMC7479342.
 77. Alizadeh-Navaei R, Rafiei A, Hedayatzadeh-Omran A, Mohammadzadeh I, Arabi M. Gene susceptibility in Iranian asthmatic patients: a narrative review. *Ann Med Health Sci Res*. 2014 Nov;4(6):837-40. doi: 10.4103/2141-9248.144871. PMID: 25506473; PMCID: PMC4250978.
 78. Haussler MR, Norman AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969 Jan;62(1):155-62. doi: 10.1073/pnas.62.1.155. PMID: 5253652; PMCID: PMC285968.
 79. Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res*. 2008 Jan 15;9(1):4. doi: 10.1186/1465-9921-9-4. PMID: 18197984; PMCID: PMC2244620.
 80. Lee SH, Park JS, Park CS. The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011 Oct;3(4):236-44. doi: 10.4168/aair.2011.3.4.236. Epub 2011 May 30. PMID: 21966603; PMCID: PMC3178821.
 81. Al-Daghri NM, Mohammed AK, Al-Attas OS, Ansari MGA, Wani K, Hussain SD, Sabico S, Tripathi G, Alokail MS. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Modify Cardiometabolic Response to Vitamin D Supplementation in T2DM Patients. *Sci Rep*. 2017 Aug 15;7(1):8280. doi: 10.1038/s41598-017-08621-7. PMID: 28811597; PMCID: PMC5557960.
 82. Triantos C, Aggeletopoulou I, Kalafateli M, Spantidea PI, Vourli G, Diamantopoulou G, Tapratzi D, Michalaki M, Manolakopoulos S, Gogos C, Kyriazopoulou V, Mouzaki A, Thomopoulos K. Prognostic significance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in liver cirrhosis. *Sci Rep*. 2018 Sep 14;8(1):14065. doi: 10.1038/s41598-018-32482-3. PMID: 30218108; PMCID: PMC6138740.
 83. Colombini A, Brayda-Bruno M, Ferino L, Lombardi G, Maione V, Banfi G, Cauci S. Gender differences in the VDR-FokI polymorphism and conventional non-genetic risk factors in association with lumbar spine pathologies in an Italian case-control study. *Int J Mol Sci*. 2015 Feb 9;16(2):3722-39. doi: 10.3390/ijms16023722. PMID: 25671813; PMCID: PMC4346922.
 84. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnott D, Schurr E, Hudson TJ. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 1;170(9):967-73. doi: 10.1164/rccm.200403-412OC. Epub 2004 Jul 28. PMID: 15282199.



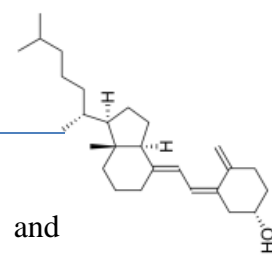
85. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H; ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):733-43. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69283-0. Erratum in: *Lancet*. 2007 Sep 29;370(9593):1128. PMID: 16935684.
86. Uysalol M, Uysalol EP, Yilmaz Y, Parlakgul G, Ozden TA, Ertem HV, Omer B, Uzel N. Serum level of vitamin D and trace elements in children with recurrent wheezing: a cross-sectional study. *BMC Pediatr*. 2014 Oct 16;14:270. doi: 10.1186/1471-2431-14-270. PMID: 25318349; PMCID: PMC4286924.
87. Lan N, Luo G, Yang X, Cheng Y, Zhang Y, Wang X, Wang X, Xie T, Li G, Liu Z, Zhong N. 25-Hydroxyvitamin D3-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. *PLoS One*. 2014 Nov 7;9(11):e111599. doi: 10.1371/journal.pone.0111599. PMID: 25380286; PMCID: PMC4224414.
88. Fitzpatrick AM, Park Y, Brown LA, Jones DP. Children with severe asthma have unique oxidative stress-associated metabolomic profiles. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):258-61.e1-8. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.012. PMID: 24369802; PMCID: PMC3915866.
89. Yu S, Zhao J, Cantorna MT. Invariant NKT cell defects in vitamin D receptor knockout mice prevents experimental lung inflammation. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4907-12. doi: 10.4049/jimmunol.1101519. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21948983; PMCID: PMC3197972.
90. Malling H, Wecke B. Position Paper of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48: 9-35. doi: 10.1111/j.1398-9995.1993.tb04754.x. PMID: 8342741.
91. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502. PMID: 4337382.
92. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namieśnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci*. 2010 Nov 17;11(11):4631-59. doi: 10.3390/ijms11114631. PMID: 21151461; PMCID: PMC3000105.
93. Moshage H. Simple and reliable measurement of nitric oxide metabolites in plasma. *Clin Chem*. 2009 Oct;55(10):1881-2. doi: 10.1373/clinchem.2009.128710. Epub 2009 Aug 13. PMID: 19679629.
94. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268. Epub 2006 May 23. PMID: 16720584.



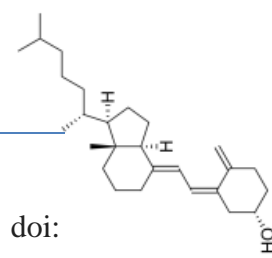
95. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit.* 2005 Jul-Aug;19(4):333-41. Spanish. doi: 10.1157/13078029. PMID: 16050971.
96. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001 Feb;2(2):91-9. doi: 10.1038/35052543. PMID: 11253062.
97. Li F, Jiang L, Willis-Owen SA, Zhang Y, Gao J. Vitamin D binding protein variants associate with asthma susceptibility in the Chinese Han population. *BMC Med Genet.* 2011 Aug 3;12:103. doi: 10.1186/1471-2350-12-103. PMID: 21810276; PMCID: PMC3163515.
98. Brehm JM, Celedón JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, Laskey D, Sylvia JS, Hollis BW, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 May 1;179(9):765-71. doi: 10.1164/rccm.200808-1361OC. Epub 2009 Jan 29. PMID: 19179486; PMCID: PMC2675563.
99. Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL, Griffiths CJ, Camargo CA Jr, Kerley CP, Jensen ME, Mauger D, Stelmach I, Urashima M, Martineau AR. Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med.* 2017 Nov;5(11):881-890. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30306-5. Epub 2017 Oct 3. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2018 Jun;6(6):e27. PMID: 28986128; PMCID: PMC5693329.
100. Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, Kleinman K, Gillman MW. Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):788-95. doi: 10.1093/ajcn/85.3.788. PMID: 17344501; PMCID: PMC4406411.
101. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, Javaid MK, Jiang B, Martyn CN, Godfrey KM, Cooper C; Princess Anne Hospital Study Group. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr.* 2008 Jan;62(1):68-77. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602680. Epub 2007 Feb 21. PMID: 17311057; PMCID: PMC2629513.
102. Brooke OG, Brown IR, Bone CD, Carter ND, Cleeve HJ, Maxwell JD, Robinson VP, Winder SM. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: effects on calcium status and fetal growth. *Br Med J.* 1980 Mar 15;280(6216):751-4. doi: 10.1136/bmj.280.6216.751. PMID: 6989438; PMCID: PMC1600591.
103. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, Tantisira KG, Rich-Edwards JW, Camargo CA Jr, Weiss ST, Gillman MW, Gold DR. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr.* 2006 Oct;84(4):903-11. doi: 10.1093/ajcn/84.4.903. PMID: 17023719; PMCID: PMC1994925.



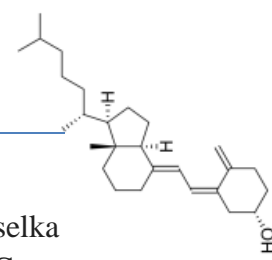
104. Weiss ST, Litonjua AA. Maternal diet vs lack of exposure to sunlight as the cause of the epidemic of asthma, allergies and other autoimmune diseases. *Thorax*. 2007 Sep;62(9):746-8. doi: 10.1136/thx.2007.079707. PMID: 17726168; PMCID: PMC2117306.
105. Allan KM, Prabhu N, Craig LC, McNeill G, Kirby B, McLay J, Helms PJ, Ayres JG, Seaton A, Turner SW, Devereux G. Maternal vitamin D and E intakes during pregnancy are associated with asthma in children. *Eur Respir J*. 2015 Apr;45(4):1027-36. doi: 10.1183/09031936.00102214. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359350.
106. Thorsteinsdottir F, Cardoso I, Keller A, Stougaard M, Frederiksen P, Cohen AS, Maslova E, Jacobsen R, Backer V, Heitmann BL. Neonatal Vitamin D Status and Risk of Asthma in Childhood: Results from the D-Tect Study. *Nutrients*. 2020 Mar 21;12(3):842. doi: 10.3390/nu12030842. PMID: 32245170; PMCID: PMC7146263.
107. Tamblyn JA, Hewison M, Wagner CL, Bulmer JN, Kilby MD. Immunological role of vitamin D at the maternal-fetal interface. *J Endocrinol*. 2015 Mar;224(3):R107-21. doi: 10.1530/JOE-14-0642. PMID: 25663707.
108. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, Szegedi G, Brun JG, Gesztelyi R, Zeher M, Bodolay E. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol*. 2008 Sep;68(3):261-9. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02127.x. Epub 2008 May 29. PMID: 18510590.
109. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 May;125(5):995-1000. doi: 10.1016/j.jaci.2010.03.008. Epub 2010 Apr 9. PMID: 20381849; PMCID: PMC2866800.
110. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Helms PJ, Seaton A, Weiss ST. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr*. 2007 Mar;85(3):853-9. doi: 10.1093/ajcn/85.3.853. PMID: 17344509.
111. Weiss ST, Litonjua AA. Vitamin D in asthma and allergy: what next? *Eur Respir J*. 2011 Dec;38(6):1255-7. doi: 10.1183/09031936.00129811. PMID: 22130761.
112. Fares MM, Alkhaled LH, Mroueh SM, Akl EA. Vitamin D supplementation in children with asthma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2015 Feb 3;8:23. doi: 10.1186/s13104-014-0961-3. PMID: 25643669; PMCID: PMC4328422.
113. Gerber AN, Sutherland ER. Vitamin D and asthma: another dimension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Dec 15;184(12):1324-5. doi: 10.1164/rccm.201109-1737ED. PMID: 22174108.



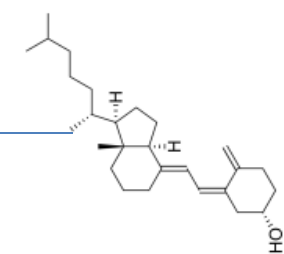
114. Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest*. 2005 Dec;128(6):3792-8. doi: 10.1378/chest.128.6.3792. PMID: 16354847.
115. Nasiri-Kalmarzi R, Abdi M, Hosseini J, Tavana S, Mokarizadeh A, Rahbari R. Association of vitamin D genetic pathway with asthma susceptibility in the Kurdish population. *J Clin Lab Anal*. 2020 Jan;34(1):e23039. doi: 10.1002/jcla.23039. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31541492; PMCID: PMC6977155.
116. Sharif A, Haddad Kashani H, Sharif MR. Association of 25-hydroxy vitamin D with asthma and its severity in children: a case-control study. *Clin Mol Allergy*. 2020 May 4;18:7. doi: 10.1186/s12948-020-00122-9. PMID: 32390767; PMCID: PMC7197187.
117. Aierken A, Yusufu B, Xu P. Correlation between asthmatic infants with rickets and vitamin D, inflammatory factors and immunoglobulin E. *Exp Ther Med*. 2020 Sep;20(3):2122-2126. doi: 10.3892/etm.2020.8949. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32765686; PMCID: PMC7401696.
118. Darabi B, Moin M, Purpbak Z. The effect of vitamin D supplementation over asthma outcome. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2013. 12 (1): S87.
119. Manousaki D, Paternoster L, Standl M, Moffatt MF, Farrall M, Bouzigon E, Strachan DP, Demenais F, Lathrop M, Cookson WOCM, Richards JB. Vitamin D levels and susceptibility to asthma, elevated immunoglobulin E levels, and atopic dermatitis: A Mendelian randomization study. *PLoS Med*. 2017 May 9;14(5):e1002294. doi: 10.1371/journal.pmed.1002294. PMID: 28486474; PMCID: PMC5423551.
120. Devereux G, Wilson A, Avenell A, McNeill G, Fraser WD. A case-control study of vitamin D status and asthma in adults. *Allergy*. 2010 May;65(5):666-7. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02220.x. Epub 2009 Oct 20. PMID: 19845573.
121. Dabbah H, Bar Yoseph R, Livnat G, Hakim F, Bentur L. Bronchial Reactivity, Inflammatory and Allergic Parameters, and Vitamin D Levels in Children With Asthma. *Respir Care*. 2015 Aug;60(8):1157-63. doi: 10.4187/respcare.03763. Epub 2015 Apr 21. PMID: 25899478.
122. Vollmert C, Illig T, Altmüller J, Klugbauer S, Loesgen S, Dumitrescu L, Wjst M. Single nucleotide polymorphism screening and association analysis--exclusion of integrin beta 7 and vitamin D receptor (chromosome 12q) as candidate genes for asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 Dec;34(12):1841-50. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02047.x. PMID: 15663557.
123. Iordanidou M, Paraskakis E, Giannakopoulou E, Tavridou A, Gentile G, Borro M, Simmaco M, Chatzimichael A, Bush A, Manolopoulos VG. Vitamin D receptor ApaI a allele is associated with better childhood asthma control and improvement in



- ability for daily activities. *OMICS*. 2014 Nov;18(11):673-81. doi: 10.1089/omi.2014.0023. Epub 2014 Oct 29. PMID: 25353337.
124. Zhang W, Xu Y. Association Between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism rs2228570 and Allergic Rhinitis. *Pharmgenomics Pers Med*. 2020 Aug 17;13:327-335. doi: 10.2147/PGPM.S262402. PMID: 32884328; PMCID: PMC7443006.
 125. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, Weiss ST. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 15;170(10):1057-65. doi: 10.1164/rccm.200404-447OC. Epub 2004 Jul 28. PMID: 15282200.
 126. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Płaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A, Medraś M. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male*. 2008 Sep;11(3):134-9. doi: 10.1080/13685530802273426. PMID: 18821289.
 127. Iqbal AM, Dahl AR, Lteif A, Kumar S. Vitamin D Deficiency: A Potential Modifiable Risk Factor for Cardiovascular Disease in Children with Severe Obesity. *Children (Basel)*. 2017 Aug 28;4(9):80. doi: 10.3390/children4090080. PMID: 28846662; PMCID: PMC5615270.
 128. McGreevy C, Williams D. New insights about vitamin D and cardiovascular disease: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2011 Dec 20;155(12):820-6. doi: 10.7326/0003-4819-155-12-201112200-00004. PMID: 22184689.
 129. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008 Oct;29(6):726-76. doi: 10.1210/er.2008-0004. Epub 2008 Aug 11. PMID: 18694980; PMCID: PMC2583388.
 130. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2008 Jun 9;168(11):1174-80. doi: 10.1001/archinte.168.11.1174. PMID: 18541825; PMCID: PMC3719391.
 131. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit? *Isr Med Assoc J*. 2017 Jul;19(7):438-443. PMID: 28786260.
 132. Hutchinson K, Kerley CP, Faul J, Grealley P, Coghlan D, Louw M, Elnazir B, Rochev Y. Vitamin D receptor variants and uncontrolled asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2018 May;50(3):108-116. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.46. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29384117.
 133. Razi F, Meshkani MA, Zarrabi F, Sadr M, Asgarbeik S, Bandarian F, Forouzanfar K, Amoli MM. Haplotypes in vitamin D receptor gene encode risk in diabetic nephropathy. *Gene*. 2019 Jan 30;683:149-152. doi: 10.1016/j.gene.2018.10.017. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30315926.

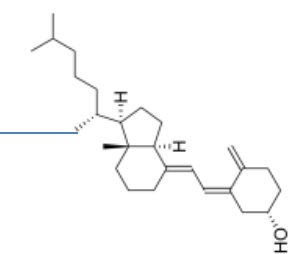


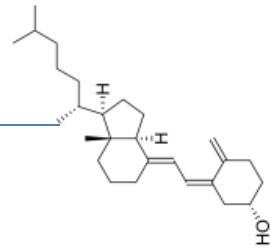
134. Rodrigues Simões TM, da Silva R, Bianco B, Fonseca FLA, Solé D, Oselka Saccardo Sarni R. Vitamin D Levels, Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Associations with Overweight and Asthma in Brazilian Schoolchildren. *Ann Nutr Metab.* 2019;75(4):238-245. doi: 10.1159/000504872.
135. Meyer V, Saccone DS, Tugizimana F, Asani FF, Jeffery TJ, Bornman L. Methylation of the Vitamin D Receptor (VDR) Gene, Together with Genetic Variation, Race, and Environment Influence the Signaling Efficacy of the Toll-Like Receptor 2/1-VDR Pathway. *Front Immunol.* 2017 Sep 11;8:1048. doi: 10.3389/fimmu.2017.01048. PMID: 28959253; PMCID: PMC5603903.



ANEXOS







7. ANEXOS

7.1 Comunicaciones, premios y publicaciones derivadas del trabajo

7.1.1 Comunicación oral en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación Pediátrica (SEINAP). Madrid, 6.7 Octubre, 2017



ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Ferrer Suay S.¹, Carrasco-Luna J^{1,3}, Sanchis Chorda J¹, Alonso Iglesias E², Tortajada-Girbés M^{1,4}, y Codoñer Franch P^{1,4}.

¹Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Universidad de Valencia. ²Departamento Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia. ³Departamento Ciencias Experimentales. Universidad Católica Valencia.

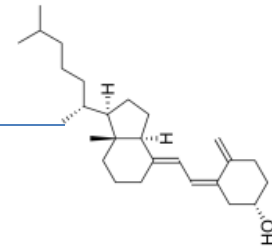
⁴Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

Objetivo: La vitamina D ha pasado de ser sólo una vitamina a ser una importante prohormona con múltiples efectos en diferentes tipos de tejidos y en diversos procesos fisiológicos. La relación existente entre déficit de vitamina D y riesgo cardiovascular está avalada por la bibliografía. El objetivo principal es el estudio de asociación entre ciertos polimorfismos del receptor de la vitamina D (VDR) y su efecto en el metabolismo lipídico. Según la bibliografía, los polimorfismos Fok1 y Apa1 son los más relacionados con enfermedad.

Material y Métodos: Población de estudio: 73 niños/as de los cuales 46 eran niños asmáticos y 27 niños sanos, sin ningún tipo de patología, de ambos sexos con edades comprendidas entre 3 y 14 años de edad. Se estudió la asociación de parámetros del metabolismo lipídico con los polimorfismos rs7975232 (Apa1) y rs2228570 (Fok1). El análisis de los polimorfismos se efectuó tras la extracción del ADN a partir de sangre total mediante kit Qiagen y posterior realización de PCR para genotipado y discriminación alélica mediante el programa SDS 2.4. Finalmente se realizó estudio de asociación con el programa SNP-stats.

Resultados: No se encontraron diferencias entre casos y control y los polimorfismos analizados. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos entre los polimorfismos estudiados con el colesterol y sus fracciones. El polimorfismo Apa1 presenta significación estadística en la asociación con niveles elevados de colesterol total ($p=0.024$), LDL colesterol ($p=0.0037$) y VLDL colesterol ($p=0.0065$). Por otra parte, el polimorfismo Fok1 presenta significación estadística con relación a valores elevados de HDL colesterol ($p=0.051$) y respecto a valores menores de VLDL colesterol ($p=0.0099$).

Conclusiones: La presencia del alelo minoritario C en el SNP Apa1 está relacionado con mayores niveles de colesterol total, LDL y VLDL y por lo tanto implica un mayor riesgo cardiovascular. Por el contrario, la presencia del alelo minoritario T del SNP Fok1 está relacionado con mayores niveles de HDL y también menores niveles de VLDL, lo cual confiere un efecto protector en este caso. El análisis de los polimorfismos genéticos del gen del receptor de la vitamina D podría identificar mayor o menor susceptibilidad de presentar enfermedad cardiovascular.



Esta comunicación fue PREMIADA por el Comité Científico del XVII Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría con la concesión de una BECA “Ángel Ballabriga de Investigación“, y SELECCIONADA PARA SU PRESENTACIÓN ORAL en el mencionado Congreso. A continuación se adjuntan los documentos de concesión de dicha beca y la comunicación oral presentada.

**Sociedad Española de
Investigación en Nutrición y
Alimentación en Pediatría**

Presidente
Benjamín Martín Martínez
Secretaría
Susana Redecillas Ferreiro
Tesorera
Pilar Codoñer Franch
Vocales
José Manuel Moreno Villares
Gloria Bueno Lozano
Mercedes Gil Campos

Madrid, 30 de agosto de 2017

Estimada Dra. Ferrer,

El Comité Científico del XVII Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría, tiene el placer de comunicarle que le ha sido concedida una de las becas “Ángel Ballabriga de Investigación” por su trabajo titulado:

“Asociación de polimorfismos en el receptor de la vitamina D y el metabolismo lipídico”

La presentación de su trabajo durante la celebración del Congreso, tendrá lugar el sábado 7 de octubre, en la sesión de las 11.00 hrs., en el Pequeño Anfiteatro del Colegio Oficial de Médicos de Madrid.

Para la presentación del trabajo, dispondrá de un tiempo máximo de exposición de 20 minutos: 15 de presentación y 5 de discusión. Deberá presentarla en soporte electrónico (pen-drive) y entregarla al técnico de la sala media hora antes del inicio de su sesión para su comprobación.

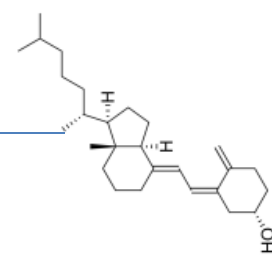
La Secretaría Técnica del Congreso se pondrá en contacto con usted para las diligencias de inscripción, alojamiento y desplazamiento. Le recordamos que deberá enviar a dicha secretaria (antes del 29 de septiembre) las 5-6 diapositivas que considere más interesantes (en formato Power Point) para su inclusión en la página web de la Sociedad.

Ante cualquier duda, puede ponerse en contacto con la Secretaría Técnica del Congreso: Ergon Time, S.A. (91 636 29 30 / cristina.ortega@ergon.es).

Reciba un cordial saludo,

Dr. Benjamín Martín
Presidente de la SEINAP

Dra. Susana Redecillas
Secretaria de la SEINAP



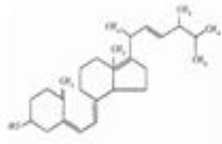
ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPIDICO.

Ferrer Suay S¹., Carrasco-Luna J^{1,3}., Sanchis Chorda J¹., Alonso Iglesias E²., Tortajada-Girbés M² y Codoñer Franch P^{1,2}.,

¹Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Universidad de Valencia.

²Departamento de Pediatría, Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

³Departamento Ciencias Experimentales, Universidad Católica Valencia.



INTRODUCCIÓN

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPIDICO



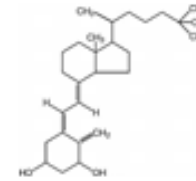
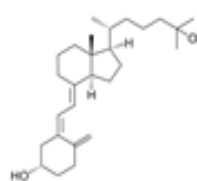
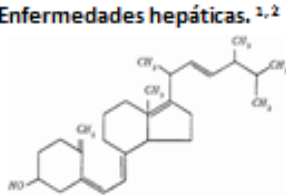
Vitamina D

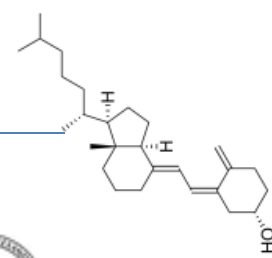
La **vitamina D** es un derivado liposoluble del grupo de los esteroides y ha pasado de ser sólo una vitamina a ser un importante sistema hormonal con múltiples efectos en diferentes tipos de tejidos y en diversos procesos fisiológicos.

La vitamina D (precursor **COLECALCIFEROL** puede ser sintetizada en la piel después de exponerse a la luz solar o bien ingerida en la dieta. Es metabolizado (hidroxilado) en el hígado **25 OH hidroxivit D CALCIDIOL** y posteriormente en riñón a su forma activa llamada **1,25-dihidroxivitamina D. Calcitriol** y se une **VDR**

La **vitamina D** es esencial para la **mineralización ósea**, pero cada vez hay más evidencias que apuntan a un papel más amplio; se ha encontrado que la deficiencia de vitamina D está asociada con varias enfermedades como son:

- **Enfermedades autoinmunes**
- **Enfermedades cardiovasculares** (afecta a la presión arterial, perfil lipídico, síndrome metabólico y niveles de creatinina, albúmina),
- **Obesidad**
- **Enfermedades hepáticas.** ^{1,2}





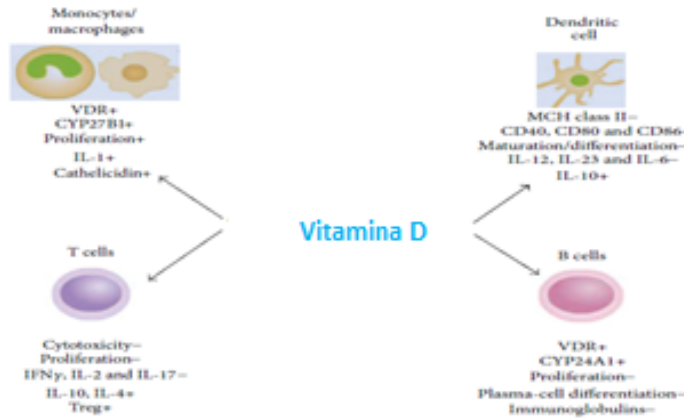
INTRODUCCIÓN

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



En la respuesta inmune:

La vitamina D hace decrecer, en sangre periférica, el perfil Th1 (inhibiendo la síntesis de IFN- γ y IL 2 y la actividad de los macrófagos), mientras que incrementa el perfil Th2 (induciendo la producción de IL-4, IL-13 e IgE con respuesta alérgicoespecíficas. Se ha identificado el receptor de la vitamina D (VDR) en las células presentadoras de antígenos CPA y linfocitos T activados)²



INTRODUCCIÓN

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Receptor Vitamina D

La proteína VDR es una fosfoproteína de 427 aminoácidos y 48 kDa en la que se reconocen 2 dominios fundamentales, uno de unión al ADN (DBD) y otro de unión al ligando (calcitriol) (LBD).

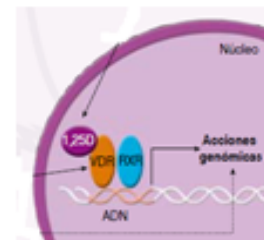
Se han encontrado receptores específicos de vit D en varios órganos como el intestino delgado, mayoritariamente en el duodeno posiblemente relacionada con la regulación de la captación del calcio y fósforo entre otras.

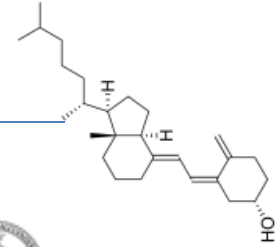


Receptor Vitamina D ⁴

El receptor de vitamina D es un factor de transcripción nuclear dependiente que interacciona con la vitamina D hormonalmente activa, 1,25 (OH) 2D3, localizado en las células diana para generar respuestas genómicas a través de la regulación de la transcripción génica de más de 900 genes implicados en una amplia gama de funciones fisiológicas en los sistemas inmune, endocrino y cardiovascular.

En los últimos años, se ha estudiado el efecto de ciertos polimorfismos de VDR por estar relacionados no solo con la respuesta inmunológica sino también con el metabolismo óseo, la diabetes tipo 1 y la obesidad⁵.





INTRODUCCIÓN

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



- El gen del Receptor de la Vitamina D (VDR 1,25- dihydroxyvitamin D3) es un gen localizado en el cromosoma 12 en la posición q13.11, tiene 9 exones y presenta varios polimorfismos conocidos como BsmI, FokI, ApaI, EcoRV (GATA) y TaqI, algunos están relacionados con la etiopatogenia de la **obesidad** y con la **antropometría** tanto en obesos como en no obesos.¹



OBJETIVOS

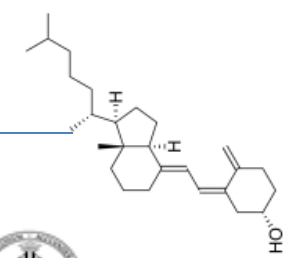
ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Estudio de la asociación entre los polimorfismos rs 2228570 (FokI), rs 7975232 (ApaI) del receptor de la vitamina D (VDR) y su efecto en el metabolismo lipídico en una población de niños alérgicos a los ácaros del polvo.



- 2 SNP
 - rs2228570 (FokI) → GGAAGTGCTGGCCGCCATTGCCTCC[A/G]TCCC
TGTAAGAACAGCAAGCAGGCC forward
 - rs 7975232 (ApaI) → AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]
CCTCACTGCTCAATCCCACCACTCC reverse



MATERIAL Y MÉTODOS

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



- La selección de estos SNPs rs2228570 (**FokI**) intrónico, rs7975232 (**Apal**) en el codon inicio.
- se ha basado en:
 - (1) **su frecuencia** en la población europea caucásica;
 - (2) su presunto impacto **funcional o regulatorio** sobre el comportamiento alimentario y sus posibles consecuencias funcionales.



Estudio aprobado por el Comité ético del H.U Dr. Peset de Valencia.
 Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

MATERIAL Y MÉTODOS

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Muestra: **73** niños | **46** niños asmáticos (casos)
 | **27** niños sanos (controles)

Población de estudio

Niños/as de ambos sexos entre 3 y 17 años de edad. Población española, raza caucásica.

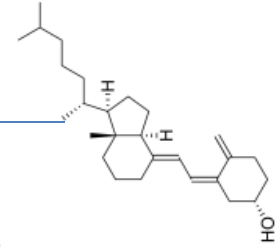
Tipo de Estudio . Estudio transversal casos y controles

Variables a estudio

Hospital Peset Valencia

- Análisis de sangre (extracción sangre periférica).
- Bioquímica basal Parámetros Metabolismo Lipídico





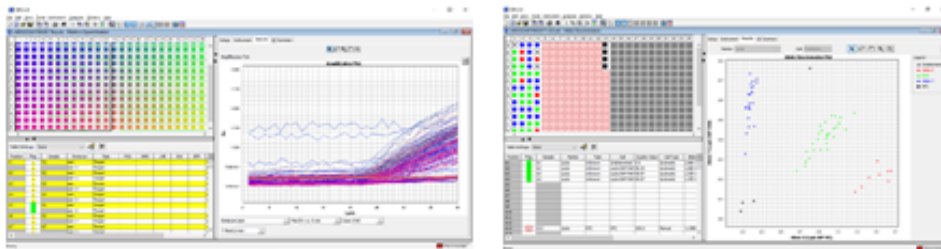
MATERIAL Y MÉTODOS

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Laboratorio POG Universitat de Valencia

- Extracción de ADN kit Qiagen QIAamp DNA blood (Izasa, Madrid, Spain)
- Amplificación QPCR Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystem)
- Genotipado y Discriminación alélica mediante sondas Taqman y Software SDS 2.4 de AppliedBiosystem (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- Estudio Asociación programa SNPstats, ICO Realizamos dos pruebas de asociación considerando tanto variables cuantitativas como binarias.



RESULTADOS

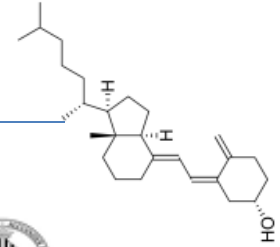
ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Estudio de la población:

Tabla 1. Características de la población a estudio. T student					
N=73	46 casos		27 controles		p<0,05
	24 ♂	22 ♀	16 ♂	11 ♀	
Edad años	11,76 ± 3,44		10,63 ± 3,42		0,18634415
Colesterol mg/dL	158.58 ± 25,3		170.14 ± 32,25		0,09618798
HDL mg/dL	51.02 ± 9,85		52.18 ± 8,96		0,62434329
LDL mg/dL	92.42 ± 23,9		104.37 ± 27,38		0,05922643
VLDL mg/dL	15.02 ± 8,14		12.88 ± 4,91		0,21234074
IMC kg/m ²	16.4 ± 3,47		18.5-7 ± 3,96		0,31378559
Vit D ng/ml	25.84 ± 9,55		32.88 ± 9,01		0,01019357
Ig E U/ml	885,69 ± 93,3		134,21 ± 256,2		0,00027885

No hay diferencias significativas en la población entre casos y controles para los marcadores lipídicos.



RESULTADOS

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Tabla II, Asociación de los polimorfismos a casos y controles

rs2228570 (FokI)	casos	controles	OR (95 % CI)*	valor de P	AIC
genotipado					
A/A	14	9	1	0,82	88,8
A/G	16	14	1,36(0,45-4,1)		
G/G	5	3	0,93(0,18-4,9)		
rs7975232 (ApaI)					
T/T	14	12	1	0,84	91,7
T/G	18	13	0,84 (0,29-2,41)		
G/G	4	2	0,58 (0,09-3,76)		

*OR: odds ratio, CI: intervalo de confianza. Significación p<0.025 Akaike's Information. Criterio(AIC) para seleccionar el mejor modelo de herencia.

No hay asociación significativa de los genotipados con casos y controles

RESULTADOS

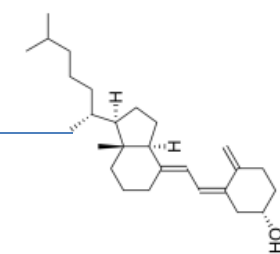
ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D Y EL METABOLISMO LIPÍDICO



Tabla III. Asociación de los SNPs de VDR con metabolismo Lipídico

SNPs	Colesterol total		LDL colesterol		HDL colesterol		VLDL colesterol	
valor de p <0.025								
rs7975232 (ApaI)	O- TG (16.92)	0.024	O-TG (19.67)	0.0037	R-GG (1.15)	0.76	R-GG (6.96)	0.0065
	T/G	2.6-31.7	6.9-32		6.1-8		2.1-11.8	
Rs2228570 (FokI)	R-GG (1.96)	0.88	O-AG 5.07	0.46	R-GG (7.96)	0.051	D-AA (-4.43)	0.0099
	A/G	23-26.9	8-18.5		0.1-15.8		-7-(-1)	

CI: intervalo de confianza. Observamos asociación: ApaI como factor de riesgo de tener los niveles de colesterol altos Fok L ser factor protector, al disminuir los niveles de VLDL.



CONCLUSIONES

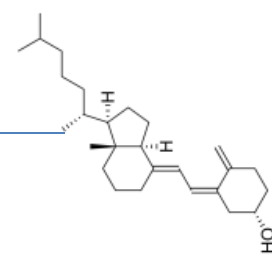
- Nuestro trabajo constituye la primera evidencia de que los polimorfismos **Apal** y **FokI** del gen del VDR están significativamente relacionados con **el metabolismo lipídico**.
- La aparición del **alelo minoritario G en Apal**, representa un factor de riesgo para el **aumento de los niveles de colesterol total, LDL y VLDL** en sangre. La aparición del **alelo minoritario G, en FokI**, disminuye **los niveles de VLDL** en sangre de forma significativa.
- Estos resultados se presentan por igual tanto en niños asmáticos como niños sanos.
- La determinación de estos polimorfismos puede constituir una herramienta para valorar el riesgo cardiovascular en niños y es una evidencia de que el receptor de la vitamin D, modula el metabolismo lipídico..

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Bienertová-Vašků J. et al. Allelic variants in vitamin D receptor gene are associated with adiposity measures in the central-European population. *BMC Medical Genetics* .2017; 18:90 DOI 10.1186/s12881-017-0454-z
2. ChemTech – Organic systems/ compounds. University Ghent Krijgslaan 281 S4 - B-9000 Gent 2017. In http://www.chemtech.ugent.be/en/expertise/vitamin_d_analogues.
- 3 Skaaby T1 .The relationship of vitamin D status to risk of cardiovascular disease and mortality. *Dan Med J*. 2015 Feb;62(2). pii: B5008
4. Bienertová-Vašků J, Bienert P, Forejt M, Tomandl J, Brázdová Z, Vašků A. Genotype x nutrient association of common polymorphisms in obesity-related genes with food preferences and time structure of energy intake. *Br J Nutr*. 2010;103:352–9

➤ .



7.1.2 Publicación en Translational Pediatrics (FI JCR: 2.286; Q2 (40/128) en el área de Pediatría)

Original Article



Vitamin D receptor gene *Apal* and *FokI* polymorphisms and its association with inflammation and oxidative stress in vitamin D sufficient Caucasian Spanish children

Sara Ferrer-Suay¹, Eulalia Alonso-Iglesias², Miguel Tortajada-Girbés^{1,3}, Joaquín Carrasco-Luna^{1,4}, Pilar Codoñer-Franch^{1,3,^}

¹Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, University of Valencia, Valencia, Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, Valencia, Spain; ³Service of Pediatrics, University Hospital Doctor Peset, Foundation for Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region (FISABIO), Valencia, Spain; ⁴Department of Experimental Sciences, Catholic University of Valencia, Valencia, Spain

Contributions: (I) Conception and design: P Codoñer-Franch; (II) Administrative support: P Codoñer-Franch; (III) Provision of study materials or patients: J Carrasco Luna, S Ferrer-Suay, M Tortajada-Girbés; (IV) Collection and assembly of data: J Carrasco-Luna, S Ferrer-Suay, E Alonso-Iglesias; (V) Data analysis and interpretation: All authors; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Pilar Codoñer-Franch. Department of Pediatrics University Hospital Dr. Peset. Avenida Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain. Email: pilar.codoner@uv.es.

Background: Vitamin D has gone from being just one vitamin to being an important prohormone with multiple effects on different tissue types. The mechanism of action of the active form or calcitriol is mediated by the intracellular vitamin D receptor (VDR). The interaction of the VDR with calcitriol modulates the expression of target genes involved in cell proliferation and cytokine production. Several studies have explored the effects of vitamin D deficiency in inflammatory disorders. Furthermore, some mutations in the *VDR* can affect its functionality. The focus of this study was to explore associations between *VDR* single nucleotide polymorphisms (SNPs) and markers of inflammation and oxidative stress in vitamin D sufficient children.

Methods: This is a cross-sectional study of a Caucasian Spanish population including 155 healthy children (87 males, 68 females) aged 10 to 14 years. *FokI*, *Apal* and *TaqI* SNPs of the *VDR* gene were genotyped. Routine biochemistry, serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor- α , interferon- γ , 8-isoprostaglandin F₂ α and nitrates were determined.

Results: The homozygous major allele AA in the *FokI* SNP was associated with increased levels of high-density lipoprotein cholesterol in a recessive inheritance mode (P=0.025). The minor allele A of *Apal* was significantly associated with decreased serum tumor necrosis factor- α and 8-isoprostaglandin F₂ α in an additive mode (P=0.016 and P=0.020 respectively). No significant associations were observed between the *TaqI* SNP and any of the parameters evaluated. Haplotype analysis confirmed the significance of the relationships between *Apal* and *FokI* SNPs and parameters associated with inflammation and oxidative stress.

Conclusions: Genetic variations of *VDR* are associated with subtle changes in metabolic, inflammatory and oxidative stress markers. These results may provide a better understanding of the relationships between vitamin D and these clinical parameters.

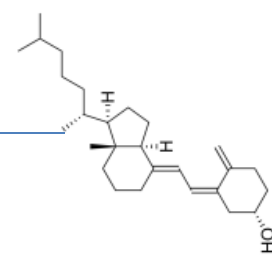
Keywords: Biomarkers; inflammation; oxidative stress; *VDR* polymorphisms and vitamin D

Submitted Jul 17, 2020. Accepted for publication Nov 06, 2020.

doi: 10.21037/tp-20-198

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/tp-20-198>

[^] ORCID: 0000-0002-1549-1573.



Introduction

Vitamin D has prominent physiologic roles that are not limited to calcium-phosphorus homeostasis and bone turnover. It has been characterized as an important prohormone with multiple actions associated with various immunological and inflammatory processes (1,2). Biological activities of vitamin D include regulation of gene expression at the transcriptional level that involve binding of its active form (1,25-dihydroxycholecalciferol) to the vitamin D receptor (VDR) located in the nucleus of the target cells (3). VDR is a ligand-dependent transcription factor, a member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily that transactivates genes involved in proliferation, differentiation and activation of immune cells as well as cytokine production. VDR is widely expressed in body tissues; as such, functional alterations may have critical repercussions with respect to vitamin D-associated responses. Similarly, genetic variations in the *VDR* gene (ID: 7421) can influence receptor structure, its capacity to interact with vitamin D, downstream signaling and function (4-7) as well as susceptibility to disease. Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the *VDR* gene have been documented (8,9). The most frequently studied SNPs include *FokI* A>G (rs2228570) which is located in exon 2, *ApaI* C>A (rs7975232) located in intron 8, and *TaqI* A>G (rs731236) located in exon 9. The *FokI* polymorphism is found near the 5' untranslated region within the *VDR* DNA-binding domain; *TaqI* and *ApaI* polymorphisms are closer to the 3' untranslated region (10). The untranslated regions play an essential role in mediating mRNA stability and post-transcriptional processing. These polymorphisms have been associated to tumorigenesis (11) metabolic profile (12) and immune response (13).

In addition, vitamin D is a controller of chronic inflammation and oxidative stress (14) closely related to the occurrence and development of many chronic conditions such as cardiovascular disease and other degenerative processes (15). The potential mechanisms by which vitamin D exert the biological actions are linked to the key redox agent glutathione and regulated by epigenetic modifications (16-18).

Status of vitamin D is of great concern in critical periods of growth, mainly in the pubertal spurt (19,20). To the date, most of the studies focused on VDR have been performed in subjects who are vitamin D-deficient because *VDR* SNPs may modify receptor-mediated responses based on vitamin D status (21). Scarce data are available for vitamin D

sufficient subjects (19). We carried out this study in healthy children and adolescents aged 10 to 14 years with sufficient levels of vitamin D to examine the relationships between *FokI*, *ApaI* and *TaqI* SNPs in the *VDR* gene and parameters of inflammation and oxidative stress. Our objective was determinate whether the presence of these SNPs may be involved in the mechanisms of degenerative processes in adulthood such as cardiovascular disease.

We present the following article in accordance with the Materials Design Analysis Reporting (MDAR) checklist (available at <http://dx.doi.org/10.21037/tp-20-198>).

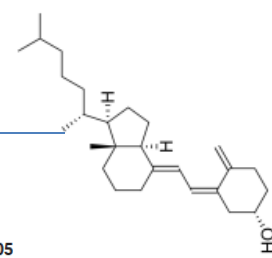
Methods

Study population

We conducted a cross-sectional study in a Caucasian Spanish population of consecutive recruited 155 children and adolescents of both sexes (87 males, 68 females) between the ages of 10–14 years. They were referred by their primary care pediatrician to the outpatient Pediatric Nutrition Unit of University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain) for health checks and/or family studies of hypercholesterolemia or celiac disease, among other conditions between December 2017 and October 2018. Only those children with normal nutritional status who were undergoing blood extraction as a part of their standard clinical protocol were recruited. Levels of vitamin D (25-hydroxycholecalciferol) should be in the sufficient range (≥ 50 nmol/L) (22–24). None of the children had acute infectious illnesses, were taking vitamin supplements or were engaged in frequent or vigorous physical activity. The children resided on the Spanish Mediterranean coast at latitude of 39° 28' 48", in a region with a mean of 2,660 hours of sunlight per year. Written consent for inclusion in the study was obtained from parents and/or guardians and/or children >12 years. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013) and it has the approval of the ethical committee for clinical research of the Hospital (approval number CEIC 27/12).

Biochemical determinations

Routine biochemical tests were performed in blood samples obtained after a 12-hour fasting period using peripheral venipuncture methods. Parameters evaluated included serum glucose, total cholesterol, and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) that were measured by



photometric automated techniques in self-analyzers (Abbot Architect c16000; Abbott Clinical Chemistry Abbott Park, IL, USA). Serum Vitamin D (25-hydroxycholecalciferol) was quantified by electrochemiluminescence immunoassay in the Roche COBAS 6000 autoanalyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Inflammatory markers

Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 and interferon- γ were determined by a multiplexed method using Luminex Map Technology LabScan 100 system (Luminex, Austin, TX, USA) and the Milliplex MAP human high sensitivity T cell panel-immunology multiplex assay catalog number HSTCMAG-28 SK. TNF- α inter- and intra-assay coefficient of variation (CV) were <20% and 10% respectively; interleukin-6 inter- and intra-assay CV were <15% and <10% respectively; INF- γ inter- and intra-assay CV were <20% and <5% respectively. Sensitivity was between 0.11 to 8.17 pg/mL and accuracy 98–107%.

Oxidative stress parameters

8-isoprostaglandin F $_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) and nitrates were measured as markers of oxidative stress. Serum levels of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ were determined with a commercially available competitive enzyme immunoassay kit (Catalog No 516351; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) with inter- and intra-assay CV were <20% and <9.5% respectively, sensitivity 80%. Colorimetric readings of absorbance were carried out using Perkin Elmer VICTOR X3 Multilabel Plate Reader serial number 20300255 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Serum nitrate levels were evaluated as indicators of nitric oxide production by spectrophotometric measurements using the Griess reaction following conversion of nitrate to nitrite with nitrate reductase from *Aspergillus* spp. The values obtained by this procedure were the sum of nitrite plus nitrate, which are the stable end products of nitric oxide metabolism. Conditions were essentially as described by Moshage *et al.* (25) using absorbance readings at 540 nm recorded on a Multiskan EX microplate reader (Thermo Lab Systems, Helsinki, Finland).

VDR SNPs genotyping

The VDR gene variants rs2228570 A>G (*FokI*), rs7975232 C>A (*ApaI*) and rs731236 A>G (*TaqI*) were analyzed in

DNA samples from 155 children. Genomic DNA was isolated from blood samples using the QIAamp DNA mini blood kit from Qiagen Hilden Germany (purchased at Izasa, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were amplified using a real time polymerase chain reaction (PCR) system QuantStudio 3 and 5 Real Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 384 wells, 0.1 mL per well qPCR Thermal Cyclers). A total of 2.5 μ L of template DNA was evaluated at a concentration of 5 μ g/mL using standard cycling conditions; genotyping was performed using Taqman SNPs probes from Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Genotyping and allelic discrimination were performed using QuantStudio Real Time PCR System Software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Statistical analysis

The statistical software SNPStats (Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain, available at <https://www.snpstats.net/>) was used to evaluate associations between the analytical parameters and VDR SNPs. Allele frequency distribution and haplotype pattern were analyzed for Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium as unique populations.

Associations linking biochemical parameters, markers of inflammation and oxidative stress with the SNP-genotypes were determined using linear regression models that considered five modes of inheritance (codominant, dominant, recessive, additive, and overdominant). A P value <0.05 was considered statistically significant; the lowest Akaike and Bayesian information criterion assessment was applied. Multiple comparison test (Dunnnett test) was made to avoid the false positive rate (error type I).

Results

The serum levels of biochemical, inflammatory and oxidative stress parameters evaluated in 155 children are summarized in Table 1. All values were within normal range including serum vitamin D levels. VDR SNPs *FokI*, *ApaI* and *TaqI* were successfully genotyped in more than 99% of the DNA samples and outcomes fit the Hardy-Weinberg equilibrium test ($P>0.05$). Linkage analysis revealed equilibrium between *FokI* and *ApaI* ($D' = 0.29$, $r^2 = 0.040$) and *TaqI* ($D' = 0.37$, $r^2 = 0.036$) SNPs and disequilibrium between *ApaI* and *TaqI* ($D' = 0.91$, $r^2 = 0.452$).

Comparisons among VDR SNPs and clinical and

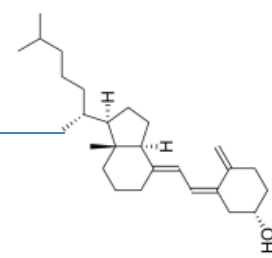


Table 1 Clinical, biochemical data and markers of inflammation and oxidative stress of children included in the study (n=155)

	Mean	SEM
Body mass index (kg/m ²)	18.4	0.4
Systolic blood pressure (mmHg)	109	1.5
Diastolic blood pressure (mmHg)	58	1.1
Glucose (mmol/L)	4.97	0.04
Total cholesterol (mmol/L)	4.13	0.05
HDL-C (mmol/L)	1.37	0.02
Vitamin D (nmol/L)	72.1	1.7
Interleukin-6 (pg/mL)	3.95	0.47
TNF-α (pg/mL)	8.63	0.60
Interferon-γ (pg/mL)	1.26	0.12
8-iso-PGF2α (pg/mL)	63.6	6.8
Nitrates (μM)	35.8	3.0

8-iso-PGF2α, 8-isoprostaglandin F2α; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; SEM, standard error of the mean; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

experimental parameters revealed significant relationships with variables associated with lipid metabolism, inflammation and oxidative stress (Table 2). Specifically, quantitative analysis revealed that the homozygous major allele AA in the *FokI* SNP was associated with an increase in the levels of serum HDL-C (0.17 mmol/L) in a recessive inheritance mode (P=0.04). The minor allele A of *ApaI* was significantly associated with diminished levels (-1.97 pg/mL per allele) of serum TNF-α in an additive mode (P=0.02). An additive inheritance mode was also observed in the serum levels of 8-iso-PGF2α which were also significantly diminished (-22.4 pg/mL per A allele; P=0.02). Dunnett test post hoc reveals significant results in the mutated genotypes respect to wild type concerning HDL-C levels (P=0.025) for *FokI* and decreasing 8-iso-PGF2α (P=0.02) and TNF-α (P=0.016) levels for *ApaI* genotype.

When we analyzed data separately in males and females, we did not find gender-related differences. No significant associations were observed between *TaqI* SNP and any of the parameters evaluated in our study (data not shown).

Results associated with haplotype analysis for the three

Table 2 Vitamin D receptor polymorphisms association with biochemical, inflammatory and oxidative stress parameters in the children included in the study

SNP ID	Parameter	Genotype	Mean (SEM)	Difference (95% CI) [†]	P	Best model
rs2228570 <i>FokI</i> A>G	Glucose (mmol/L)	G/G-A/G	4.99 (0.05)	-0.16 (-0.47 to 0.13)	0.28	R
		A/A	4.83 (0.14)			
	Total-C (mmol/L)	G/G-A/G	4.11 (0.07)	0.20 (-0.21 to 0.61)	0.35	R
		A/A	4.30 (0.16)			
	HDL-C (mmol/L)	G/G-A/G	1.36 (0.03)	0.17 (0.01 to 0.32)	0.04	R
		A/A	1.52 (0.09)			
	Vitamin D (nmol/L)	G/G	74.6 (3.0)	-3.5 (-9.2 to 2.3)	0.25	A
		A/G	70.6 (2.7)			
		A/A	68.4 (6.0)			
	IL-6 (pg/mL)	G/G-A/A	3.69 (0.79)	-0.61 (-1.26 to 2.47)	0.52	OD
		A/G	4.30 (0.50)			
	TNF-α (pg/mL)	G/G-A/G	8.72 (0.64)	-0.34 (-4.05 to 3.56)	0.86	R
		A/A	8.38 (1.98)			
	IFN-γ (pg/mL)	G/G	1.35 (0.27)	-0.13 (-0.50 to 0.25)	0.51	A
		A/G	1.27 (0.13)			
		A/A	1.05 (0.17)			

Table 2 (continued)

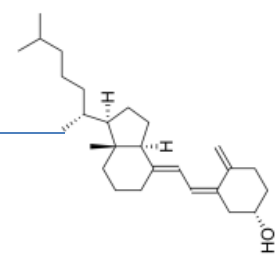


Table 2 (continued)

SNP ID	Parameter	Genotype	Mean (SEM)	Difference (95% CI) [†]	P	Best model
rs7975232 <i>ApaI</i> C>A	8-iso-PGF2 α (pg/mL)	G/G-A/G	62.2 (6.9)	14.7 (-28.3 to 57.6)	0.50	R
		A/A	76.9 (26.9)			
	Nitrates (μ M)	G/G	40.6 (6.4)	-5.9 (-14.1 to 2.4)	0.16	A
		A/G	33.2 (2.0)			
		A/A	30.3 (2.1)			
	Glucose (mmol/L)	C/C	5.02 (0.72)	-0.07 (-0.19 to 0.07)	0.33	A
		A/C	4.97 (0.08)			
		A/A	4.89 (0.09)			
	Total-C (mmol/L)	C/C	4.08 (0.09)	0.08 (-0.20 to 0.35)	0.60	D
		A/C-A/A	4.16 (0.09)			
	HDL-C (mmol/L)	C/C-A/C	1.35 (0.03)	0.11 (-0.03 to 0.21)	0.12	R
		A/A	1.45 (0.04)			
	Vitamin D (nmol/L)	C/C	72.6 (3.2)	-0.8 (-9.0 to -8.0)	0.90	D
		A/C-A/A	71.9 (2.5)			
	IL-6 (pg/mL)	C/C-A/C	3.97 (0.43)	-1.46 (-3.13 to 0.22)	0.09	R
		A/A	2.51 (0.50)			
	TNF- α (pg/mL)	C/C	10.17 (1.16)	-1.97 (-3.62 to 0.33)	0.02	A
		A/C	8.89 (0.88)			
		A/A	6.12 (1.13)			
	IFN- γ (pg/mL)	C/C-A/C	1.37 (0.16)	-0.41 (-1.02 to 0.18)	0.17	R
A/A		0.95 (0.14)				
8-iso-PGF2 α (pg/mL)	C/C	85.8 (17.3)	-22.4 (-41.1 to -3.7)	0.02	A	
	A/C	60.9 (8.9)				
	A/A	41.4 (7.1)				
Nitrates (μ M)	C/C-A/C	38.1 (3.5)	-10.4 (-23.5 to 2.6)	0.12	R	
	A/A	27.6 (1.3)				
	A/A	88.1 (1.7)				

8-iso-PGF2 α , 8-isoprostaglandin F2 α ; A, additive; CI, confidence interval; D, dominant; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; IFN- γ , interferon gamma; IL-6, interleukin-6; OD, overdominant; R, recessive; SEM, standard error of the mean; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; Total-C, total cholesterol. [†]Maximum significant difference between means.

SNPs evaluated are as shown in Table 3. The differences in the experimental parameters were established with respect to the GCA haplotype for *FokI*, *ApaI* and *TaqI*, respectively, which was the most prevalent in this population, identified with a frequency of 32.3%. Our results revealed that the ACA haplotype (24.8% frequency) was significantly

associated with higher levels of HDL-C (an increase of 0.11 mmol/L, P=0.04). The haplotype AAA (frequency 4.16%) was significantly associated with diminished levels of TNF- α (a decrease of 6.0 pg/mL, P=0.01). It is also important to note the association of the haplotype GAA (*FokI* minor allele G, *ApaI* minor allele A, and *TaqI* major allele A) with

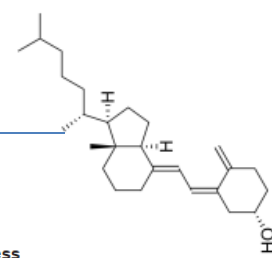


Table 3 Haplotype analysis of vitamin D receptor polymorphisms in 155 children

	rs2228570 <i>FokI</i> A>G	rs7975232 <i>Apal</i> C>A	rs731236 <i>TaqI</i> A>G	Frequency (%)	Difference (95% CI) [†]	P
HDL-C (mmol/L)	A	C	A	24.8	0.11 (0.00 to 0.22)	0.04
TNF- α (pg/mL)	A	A	A	4.2	-6.0 (-10.8 to -1.2)	0.01
8-iso-PGF2 α (pg/mL)	G	A	A	11.6	-35.0 (-67.4 to -2.7)	0.03

8-iso-PGF2 α , 8-isoprostaglandin F2 α ; CI, confidence interval, HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; TNF- α , tumor necrosis factor- α .
[†]Difference was established with respect to the GCA haplotype for *FokI*, *Apal* and *TaqI*.

parameters associated with oxidative stress. This haplotype was detected in nearly 11.6% of the participants in our study and was associated with diminished levels of 8-iso-PGF2 α (decrease of 35.0 pg/mL, P=0.03).

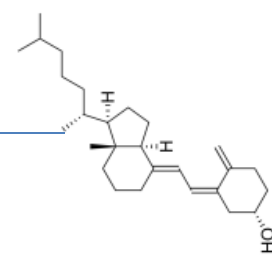
Discussion

Our findings have revealed direct relationships between the *FokI* and *Apal* SNPs of the *VDR* gene and parameters associated with lipid metabolism, inflammation and oxidative stress in children and adolescents who were vitamin D sufficient.

VDR regulates the major biological functions of vitamin D; as such, we hypothesized that functional SNPs may have a direct impact on *VDR* expression and susceptibility to conditions related to vitamin D metabolism. Many preclinical studies in animals with vitamin D deficiency or with genetically-silenced expression of *VDR* have demonstrated that the alterations in the interactions between vitamin D and its receptor may result in chronic disorders and cardiovascular events (26). Although we identified no significant variation in vitamin D levels among the participants, patients with the *FokI* AA genotype had significantly higher levels of serum HDL-C. This finding was more evident in boys. As such, we hypothesize that this genotype may be associated with reduced risk of cardiovascular disease. HDL-C has a prominent role in reverse cholesterol transport; HDL-C particles have been associated with numerous additional protective aspects related to atherosclerosis, including antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, metabolic and vasodilatory functions (27-29). HDL-C may also play a role in immune system modulation. *FokI* A>G (rs2228570) located in exon 2 of the *VDR* gene is the only known *VDR* SNP that results in two distinct *VDR* protein products; the A to G conversion in the first translation initiation codon results in modifications of *VDR* protein structure (10).

The presence of the G allele or F variant in the ATG translational start codon results in a protein that is missing three amino acids (424 amino acids); interestingly, this variant is more active than the longer form (427 amino acids) in terms of its transcription factor activity. The presence of the longer *VDR* form (i.e., the A allele or variant) with reduced transcriptional activity has been attributed to the absence of a functional *VDR* and may lead to increased levels of serum cholesterol and HDL-C (30). Our data are in agreement with the study of Filus *et al.* that focused on a population of individuals from Poland diagnosed with metabolic syndrome; the individuals with this same variant also had higher levels of serum HDL-C and reduced cardiovascular risk (31). Moreover, the *FokI* SNP GG genotype-FF variant has been associated with cardiovascular disease in adult population (32). By contrast, other studies found no relationship between *FokI* SNPs and serum lipid levels (33,34). Taken together, our results suggest that the functional effects of *FokI* SNP might be gene and/or cell type-specific and may also be age- and gender-dependent. However, the mechanisms underlying modulation of serum HDL-C levels by *VDR* SNP remain unclear.

We further demonstrated that the A allele in *Apal* SNP was associated with diminished levels of serum TNF- α and 8-iso-PGF2 α , which are markers of inflammation and oxidative stress respectively, in an additive mode of heritage. Serum levels of 8-iso-PGF2 α represent an index of endogenous oxidative stress and provide evidence for the direct chemical impact of reactive oxygen species in biological systems. Inflammation plays a central role in a wide variety of physical and mental health problems and may also be a risk factor promoting the development of many cancers. Complex interactions between the oxidative stress and inflammatory pathways have been described in the literature. Reactive oxygen species can activate transcription factors including nuclear factor-kappa B



(NF- κ B) and thereby increase expression of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α (9). Vitamin D can inhibit this signaling pathway and thereby limit inflammation. In this study, we found that diminished levels of both TNF- α and 8-iso-PGF2 α were related to the *ApaI* SNP in children who were vitamin D sufficient. Thus, this genotype could contribute to protection of inflammatory processes. The *ApaI* SNP is located at intron 8 at the 3' untranslated region of the *VDR* gene and has no impact on the amino acid sequence or structure of the VDR protein; however, it could alter the stability of the *VDR* mRNA and/or interfere with *VDR* transcription. Untranslated regions can modulate levels of gene expression, most notably via regulation of mRNA stability. Reduced levels of mRNA stability and thus translation of the VDR protein will result in reduced responses to vitamin D. In this sense, the *ApaI* polymorphism may function as an intronic enhancer, it might mediate alternative splicing of the *VDR* mRNA and/or be relevant as an enhancer that increases gene transcription.

Haplotype analysis suggested that the specific combinations of alleles from the *FokI*, *ApaI* and *TaqI* SNPs were associated with changes in lipid profile as well as in levels of inflammatory and oxidative mediators. Among these results, we identified a significant association between the ACA haplotype and elevated levels of serum HDL-C; this confirms their role with respect to modulation of lipid metabolism. By contrast, the AAA haplotype was associated with levels of serum TNF- α and the GAA haplotype with diminished levels of 8-iso-PGF2 α , to an even greater extent than that associated with *ApaI* individually. Thus, these haplotypes contribute to a lesser inflammation and oxidative stress. Previous studies have examined *VDR* SNP haplotypes; they established that VDR haplotypes associated with *FokI*, *BmsI*, *TaqI* and *ApaI* SNPs could contribute significantly as a group over and above those mediated by *VDR* SNPs on an individual basis (35,36). Our findings contribute to this group, and likewise suggest associations between *VDR* haplotypes with inflammatory and oxidative stress markers. Moreover, it is true that linkage disequilibrium with one or more functional SNPs elsewhere in the *VDR* gene might also serve to explain some of the associations observed.

There are several limitations with respect to this study that should be considered when interpreting our results. One limitation is the sample size. However, it is the consequence of the homogeneity of the population studied that was designed in order to limit bias and to increase the

validity of results. One reason for the divergence between our results and those from other studies might be related to differences in homogeneity vs. heterogeneity of the other studied populations. We have studied specific haplotypes and these associations may be different in other haplotype contexts. Finally, this study focused exclusively on healthy Caucasian Spanish children with vitamin D sufficiency. It is well established that many factors as age, ethnicity and environment might affect not only vitamin effects but also *VDR* mRNA expression (37). Further studies will be needed to elucidate the importance of the observed genetic differences in other populations or conditions. Particularly studies in all the range of vitamin D levels might be highly informative.

Conclusions

In this study, we demonstrated significant associations of clinical parameters with known variants encoded by the *VDR* gene in children who were vitamin D sufficient. Among our findings, *FokI* has been associated with elevated levels of HDL-C and *ApaI* was associated with diminished levels of serum TNF- α and 8-iso-PGF2 α , which are markers of inflammation and oxidative stress, respectively. Moreover, specific haplotypes, including the ACA combination for *FokI*, *ApaI* and *TaqI*, were associated with changes in serum lipid profiles. Furthermore, the AAA haplotype was associated with serum levels of TNF- α and GAA with 8-iso-PGF2 α . These results highlight the fact that specific *VDR* polymorphisms may play a role in general susceptibility or protection to further degenerative diseases.

Acknowledgments

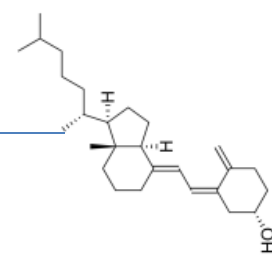
Funding: None.

Footnote

Reporting Checklist: The authors have completed the MDAR reporting checklist. Available at <http://dx.doi.org/10.21037/tp-20-198>

Data Sharing Statement: Available at <http://dx.doi.org/10.21037/tp-20-198>

Conflicts of Interest: All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form (available at <http://dx.doi.org/10.21037/tp-20-198>)



[org/10.21037/tp-20-198](https://doi.org/10.21037/tp-20-198)). The authors have no conflicts of interest to declare.

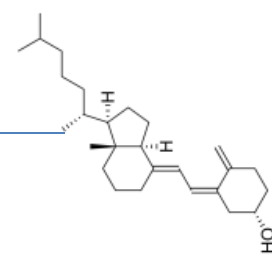
Ethical Statement: The authors are accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013). Ethical approval was obtained at the Ethical Committee of Dr. Peset University Hospital (Number CEIC 27/12). Written informed consent was obtained from parents or guardians of the children.

Open Access Statement: This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0), which permits the non-commercial replication and distribution of the article with the strict proviso that no changes or edits are made and the original work is properly cited (including links to both the formal publication through the relevant DOI and the license). See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

References

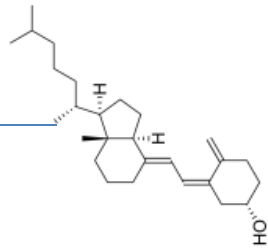
1. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18:153-65.
2. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R, et al. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr* 2012;161:848-54.
3. Vojinovic J. Vitamin D receptor agonists' anti-inflammatory properties. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1317:47-56.
4. Yu F, Cui LL, Li X, et al. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016;25:614-24.
5. Lu S, Guo S, Hu F, et al. The Associations between the Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e3467.
6. Bakke D, Sun J. Ancient Nuclear Receptor VDR with New Functions: Microbiome and Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2018;24:1149-54.
7. Shaikh F, Baig S, Jamal Q. Do VDR Gene Polymorphisms Contribute to Breast Cancer? *Asian Pac J Cancer Prev*

- 2016;17:479-83.
8. Akdogan N, Alli N, Incel Uysal P, et al. Role of serum 25-hydroxyvitamin D levels and vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with rosacea: a case-control study. *Clin Exp Dermatol* 2019;44:397-403.
9. Hutchinson K, Kerley CP, Faul J, et al. Vitamin D receptor variants and uncontrolled asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2018;50:108-16.
10. Colombini A, Brayda-Bruno M, Ferino L, et al. Gender differences in the VDR-FokI polymorphism and conventional non-genetic risk factors in association with lumbar spine pathologies in an Italian case-control study. *Int J Mol Sci* 2015;16:3722-39.
11. Rai V, Abdo J, Agrawal S, et al. Vitamin D Receptor Polymorphism and Cancer: An Update. *Anticancer Res* 2017;37:3991-4003.
12. Al-Daghri NM, Mohammed AK, Al-Attas OS, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Modify Cardiometabolic Response to Vitamin D Supplementation in T2DM Patients. *Sci Rep* 2017;7:8280.
13. Mohammadi A, Khanbabaie H, Nasiri-Kalmarzi R, et al. Vitamin D receptor ApaI (rs7975232), BsmI (rs1544410), FokI (rs2228570), and TaqI (rs731236) gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis in an Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *J Microbiol Immunol Infect* 2020;53:827-35.
14. Filgueiras MS, Rocha NP, Novaes JF, et al. Vitamin D status, oxidative stress, and inflammation in children and adolescents: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;60:660-9.
15. Paršanathan R, Jain SK. Novel Invasive and Noninvasive Cardiac-Specific Biomarkers in Obesity and Cardiovascular Diseases. *Metab Syndr Relat Disord* 2020;18:10-30.
16. Jain SK, Paršanathan R, Achari AE, et al. Glutathione Stimulates Vitamin D Regulatory and Glucose-Metabolism Genes, Lowers Oxidative Stress and Inflammation, and Increases 25-Hydroxy-Vitamin D Levels in Blood: A Novel Approach to Treat 25-Hydroxyvitamin D Deficiency. *Antioxid Redox Signal* 2018;29:1792-807.
17. Paršanathan R, Jain SK. Glutathione deficiency induces epigenetic alterations of vitamin D metabolism genes in the livers of high-fat diet-fed obese mice. *Sci Rep* 2019;9:14784.
18. Bahrami A, Sadeghnia HR, Tabatabaeizadeh SA, et al. Genetic and epigenetic factors influencing vitamin D status. *J Cell Physiol* 2018;233:4033-43.
19. Dai J, Lv ZT, Huang JM, et al. Association between



- polymorphisms in vitamin D receptor gene and adolescent idiopathic scoliosis: a meta-analysis. *Eur Spine J* 2018;27:2175-83.
20. Smith TJ, Lanham-New SA, Hart KH. Vitamin D in adolescents: Are current recommendations enough? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;173:265-72.
 21. Lee C. Controversial Effects of Vitamin D and Related Genes on Viral Infections, Pathogenesis, and Treatment Outcomes. *Nutrients* 2020;12:962.
 22. Linden MA, Freitas RGBON, Hessel G, et al. Definition of vitamin D deficiency in schoolchildren: systematic review with meta-analysis. *Arq Gastroenterol* 2019;56:425-30.
 23. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1911-30.
 24. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutr Bull* 2014;39:322-50.
 25. Moshage H. Simple and reliable measurement of nitric oxide metabolites in plasma. *Clin Chem* 2009;55:1881-2.
 26. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29:726-76.
 27. März W, Kleber ME, Scharnagl H, et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance *Clin Res Cardiol* 2017;106:663-75.
 28. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2014;103:341-9.
 29. Nicholls SJ, Nelson AJ. HDL and cardiovascular disease. *Pathology* 2019;51:142-7.
 30. Li S, He Y, Lin S, et al. Increase of circulating cholesterol in vitamin D deficiency is linked to reduced vitamin D receptor activity via the Insig-2/SREBP-2 pathway. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:798-809.
 31. Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Plaksej J, et al. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male* 2008;11:134-9.
 32. He L, Wang M. Association of vitamin d receptor-a gene polymorphisms with coronary heart disease in Han Chinese. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:6224-9.
 33. Turhan T, Doğan HO, Boğdaycıoğlu N, et al. Vitamin D status, serum lipid concentrations, and vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Familial Mediterranean fever. *Bosn J Basic Med Sci* 2018;18:21-8.
 34. Jia J, Tang Y, Shen C, et al. Vitamin D receptor polymorphism rs2228570 is significantly associated with risk of dyslipidemia and serum LDL levels in Chinese Han population. *Lipids Health Dis* 2018;17:193.
 35. Razi F, Meshkani MA, Zarrabi F, et al. Haplotypes in vitamin D receptor gene encode risk in diabetic nephropathy. *Gene* 2019;683:149-52.
 36. Rodrigues Simões TM, da Silva R, Bianco B, et al. Vitamin D Levels, Frequency of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Associations with Overweight and Asthma in Brazilian Schoolchildren. *Ann Nutr Metab* 2019;75:238-45.
 37. Meyer V, Saccone DS, Tugizimana F, et al. Methylation of the vitamin D receptor (VDR) gene, together with genetic variation, race, and environment influence the signaling efficacy of the toll-like receptor 2/1-VDR pathway. *Front Immunol* 2017;8:1048.

Cite this article as: Ferrer-Suay S, Alonso-Iglesias E, Tortajada-Girbés M, Carrasco-Luna J, Codoñer-Franch P. Vitamin D receptor gene *Apal* and *FokI* polymorphisms and its association with inflammation and oxidative stress in vitamin D sufficient Caucasian Spanish children. *Transl Pediatr* 2021;10(1):103-111. doi: 10.21037/tp-20-198



7.2 Documentos justificativos e informativos de la realización del Proyecto

7.2.1 Aprobación del Proyecto de Investigación por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset

GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT



AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Departament de Salut València - Doctor Peset

A/A.: **Dra. Pilar Codoñer,**
Dr. Miguel Gracia y
Dr. Miguel Tortajada
Servicio de Pediatría
1º piso C. Externas

Vicent Valentin Segura, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 25 de abril de 2012 ha evaluado y ha aprobado las aclaraciones solicitadas del estudio titulado: Determinación de los polimorfismos del receptor de la vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo.

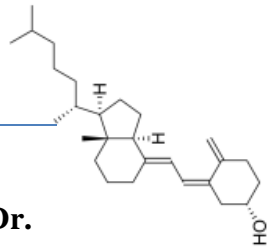
Proyecto de investigación.
Código Ceic: 27/12

Valencia 27 de abril de 2012



Fdo.: **Vicent Valentin Segura**
Presidente CEIC Hospital Universitario Dr. Peset

CS 5/1



7.2.2 Conformidad del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset sobre la idoneidad de los investigadores e instalaciones para su realización

CONFORMIDAD DE LA JEFA DE SERVICIO IDONEIDAD DE LOS INVESTIGADORES Y SUS COLABORADORES IDONEIDAD DE LAS INSTALACIONES

La Dra.Dña.Nuria Estañ Capell
Jefa de Servicio de:ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL DR.PESET

Investigador principal: Sara Ferrer Suay

Estudio: Determinación de los polimorfismos del receptor de la Vitamina D, en niños asmáticos, alérgicos a los ácaros del polvo.

Codigo: 27/12

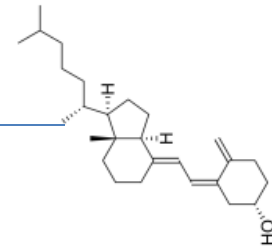
Hace constar:

1. Que da su visto bueno para la realización del ensayo una vez aprobado.
2. Que da su consentimiento en la participación del citado ensayo y que certifica la idoneidad de los investigadores y colaboradores.
3. Que cuenta con los recursos materiales y humanos necesarios para llevar a cabo el ensayo.
4. Que tras evaluar los procedimientos necesarios, las instalaciones son idóneas para la realización del ensayo.

Fdo.Dra.Dña.Nuria Estañ Capell
JEFA SERVICIO LAB.ANALISIS CLINICOS

Valencia, 6 de Marzo 2015





7.2.3 Hoja de Información al paciente sobre los objetivos y características del estudio



HOJA DE INFORMACIÓN

Título proyecto: *DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN NIÑOS ASMÁTICOS ALÉRGICOS A LOS ÁCAROS DEL POLVO.*

Equipo investigador: Dr. Miguel Tortajada, Dra. Pilar Codoñer: Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia; Dra. Eulalia Alonso. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia; Sara Ferrer Suay: Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

La presente información se ha realizado siguiendo las indicaciones de la ley de investigación biomédica del 14 de julio de 2007.

1. Objetivo/finalidad del estudio

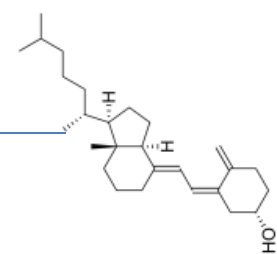
Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal pretende profundizar en el conocimiento de los posibles factores genéticos y valorar los polimorfismos del receptor de la vitamina D en los pacientes asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo.

Se le pide que otorgue su consentimiento para que done una muestra de ADN para el genotipado del receptor de la vitamina D.

2. Participación voluntaria

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria, pudiendo negarse e incluso revocar su consentimiento en cualquier momento sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que usted o cualquier familiar recibe en la actualidad o en un futuro en el Centro. La relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada en ninguna forma. Para revocar este consentimiento deberá dirigirse al mismo facultativo con el que firmó el presente consentimiento.

Antes de toma una decisión, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee para asegurarse que lo ha entendido y desea participar.



3. Procedimientos del estudio

Si tras la lectura de todo el consentimiento usted decide participar, se le extraerá un tubo adicional de sangre de 10ml para obtener las muestras de ADN. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células porque lo ha recibido de sus progenitores y lleva un código en forma de “genes” que determina sus características físicas personales, como el color de ojos, piel, etc... Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no.

4. Riesgos/Incomodidades

La toma de muestra de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección, que desaparecen en pocos días, más raramente, mareo en el momento de la extracción de sangre.

La extracción se realizará en el Hospital Dr.Peset, donde se dispondrá de los medios adecuados para minimizar y dar el tratamiento a los acontecimientos adversos que se pudieran presentar.

5. Beneficios

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores genéticos relacionados con los polimorfismos del receptor de la vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

6. Compensación

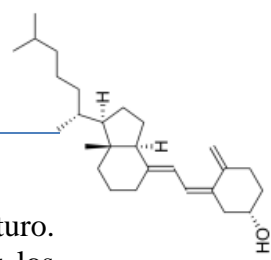
Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

7. ¿Qué se hará con su muestra?

Con el presente consentimiento, se le pide:

1. Que acepte que en el ADN de su sangre se estudien los genes específicos en el estudio Determinación de los polimorfismos del receptor de la vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo, que pueden estar involucrados en la enfermedad que usted padece o en relación con el fármaco que va a tomar. Una vez finalizado el estudio, su muestra será destruida.

2. Es probable que en un futuro se descubran nuevos genes relacionados con esta patología, por ello se le solicita que autorice al Investigador Principal a almacenar



su muestra de ADN para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en el futuro. Si usted acepta autorizar este almacenamiento, se eliminarán de su muestra todos los vínculos con su identidad a partir de ella, es decir, el almacenaje será totalmente anónimo. El Investigador Principal garantizará que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no quede más ADN. Una vez desvinculada la muestra, no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar con usted.

3. Usted puede también autorizar que en dicha muestra descodificada se realicen otros estudios genéticos de otras patologías diferentes distintas a las estudiadas en este proyecto.

Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, firmando este documento, indicando qué parte del estudio genético acepta, antes de la obtención de ADN:

- Usted puede aceptar que sólo se estudien en su muestra los genes expresados en el punto 1.
- Usted puede aceptar las propuestas de los puntos 1 y 2
- Usted puede aceptar todas las propuestas (puntos 1, 2 y 3)
- Usted puede decidir no aceptar ninguna

Si cambia de opinión después de la extracción de sangre para el estudio genético, usted puede solicitar que se destruya su muestra de ADN, dirigiéndose a su médico. Si ha aceptado que se guarde su muestra de ADN (punto 2 y 3), debe indicarlo antes de que se destruya el vínculo que liga su muestra de ADN con su identificación. Una vez que se haya destruido este vínculo, no será posible encontrar su muestra y por tanto no podrá ser destruida.

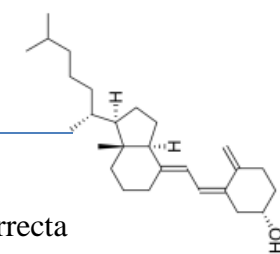
Usted podrá tener acceso a la información que se obtenga del estudio, solicitándolo al investigador. Si los hallazgos pueden tener relevancia para la salud del participante o sus familiares, éste se pondrá en contacto con usted aunque no lo haya solicitado. Puede renunciar a esta información, pero si ésta pudiera tener consecuencias para la salud de sus familiares se le comunicará para que designe a un representante al que se le dará la información imprescindible.

8. Confidencialidad

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y tratada de acuerdo a la *Ley orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal*. Para garantizar el anonimato de su identidad, cada una de las muestras del estudio recibirá un código (nunca su nombre) y nunca el investigador que lleva a cabo el análisis genético conocerá su identidad.

Su muestra será almacenada en el Hospital Universitario Dr. Peset durante la duración del proyecto o en función de los consentimientos que haya firmado.

Su médico guardará esta hoja de información y la hoja de su consentimiento otorgado con su firma y fecha, así como la relación entre su código y su identidad en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Su historia clínica no contendrá ninguno de sus resultados genéticos. Representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital y las Autoridades Sanitarias Españolas podrán tener



acceso a sus registros médicos, con el fin de controlar y garantizar la correcta realización del estudio.

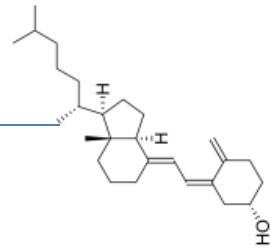
Los resultados médicos podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Sin embargo se mantendrá una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

9. Financiación

Los gastos serán cubiertos con fondos propios del Servicio de Pediatría disponibles en la fundación para la investigación en el Hospital Universitario Dr. Peset.

10. Información adicional

Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el Investigador Principal (Dr Miguel Tortajada) en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset . Teléfono 961622493.



7.2.4 Consentimiento Informado del representante legal para estudio genético (participantes menores de 12 años)



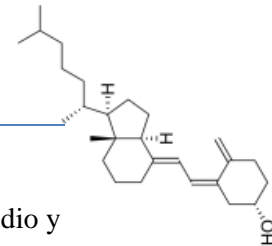
CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL PARA ESTUDIO GENÉTICO (Participantes menores de 12 años)

Título proyecto: *DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN NIÑOS ASMÁTICOS ALÉRGICOS A LOS ÁCAROS DEL POLVO*

Investigador principal: Dr. Miguel Tortajada, Dra. Pilar Codoñer. Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Dra. Eulalia Alonso. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Sara Ferrer Suay. Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

El presente documento se ha realizado siguiendo las indicaciones de la ley de investigación biomédica del 14 de julio de 2007.

- Yo, D/D^a.....(nombre y apellidos) en calidad de (relación con el participante) de..... (nombre y apellidos del participante), declaro bajo mi responsabilidad que he leído la **Hoja de información** sobre el estudio y acepto que..... (nombre y apellidos del participante) participe en este estudio genético.
- Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al paciente y una copia del Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
- Sé que se mantendrá en secreto la identidad del participante y que se identificará su sangre y sus muestras de ADN con un código numérico anónimo.
- Él/ella, es libre de retirarse del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta negativamente sobre su tratamiento médico futuro. Tras ellos se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar con el participante, de forma que no se podrá destruir.



- Entiendo que el objetivo del estudio genético es evaluar la población objeto de estudio y que puedo solicitar al investigador que me comunique los resultados del mismo. En el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para la salud del participante y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición en el mismo el investigador me lo comunicará a mí o al representante que yo designe.
- En mi presencia se ha dado a(nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Presto mi conformidad para que(nombre del participante) participe en este estudio en el/los apartado/s marcado/s a continuación.

Punto 1: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se pueda realizar el estudio genético referente a *Determinación de los polimorfismos del receptor de la Vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo* en la muestra de ADN.

Punto 2: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se guarde la muestra de ADN, con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro, cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con la patología estudiada en el proyecto

Punto 3: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se guarde la muestra de ADN desvinculada y se puedan realizar futuros estudios de otras enfermedades.

Fecha:

Firma del representante legal:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio genético, sus apartados y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba.

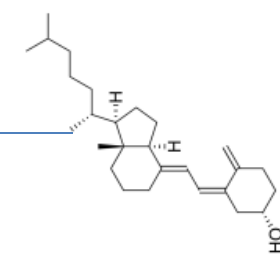
El sujeto consiente participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Nombre:

Firma:

(del investigador o la persona que proporciona la información y consentimiento)



7.2.5 Consentimiento Informado del representante legal para estudio genético (participantes mayores de 12 años)



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL PARA ESTUDIO GENÉTICO

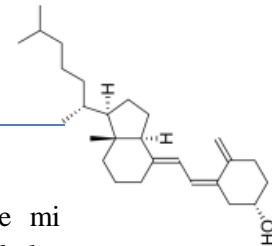
(Participantes mayores de 12 años)

Título proyecto: *DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN NIÑOS ASMÁTICOS ALÉRGICOS A LOS ÁCARIOS DEL POLVO*

Investigador principal: Dr. Miguel Tortajada, Dra. Pilar Codoñer. Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr.Peset de Valencia. Dra. Eulalia Alonso. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia. Sara Ferrer Suay. Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr.Peset de Valencia.

El presente documento se ha realizado siguiendo las indicaciones de la ley de investigación biomédica del 14 de julio de 2007.

- Yo, D/D^a.....de..... años de edad, declaro bajo mi responsabilidad que he leído la **Hoja de información** sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.
- Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al paciente y una copia del Consentimiento Informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
- Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi sangre y mis muestras de ADN con un código numérico anónimo.
- Soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada. Si se hubiera retirado previamente el vínculo de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.
- Entiendo que el objetivo del estudio genético es evaluar la población objeto de estudio y que puedo solicitar al investigador que me comunique los resultados del mismo. En el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para la salud del participante y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición en el mismo el investigador me lo comunicará a mí o al representante que yo designe.



Punto 1: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se pueda realizar el estudio genético referente a *Determinación de los polimorfismos del receptor de la Vitamina D en niños asmáticos alérgicos a los ácaros del polvo* en la muestra de ADN.

Punto 2: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se guarde la muestra de ADN, con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas en el futuro, cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con la patología estudiada en el proyecto

Punto 3: YO DOY / NO DOY (marcar lo que proceda) voluntariamente mi consentimiento para que se guarde la muestra de ADN desvinculada y se puedan realizar futuros estudios de otras enfermedades.

Consiento participar **voluntariamente** en el/los apartado/s marcado/s.

Fecha:

Firma del paciente:

- Yo, D/D^a.....(nombre y apellidos)
en calidad de..... (relación con el participante)
de..... (nombre y apellidos del participante),
declaro bajo mi responsabilidad que:
He leído la **Hoja de información** sobre el estudio y, EN MI PRESENCIA, SE HA DADO A..... (nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar. Presto mi conformidad para que(nombre del participante) participe en este estudio en el/los apartado/s marcado/s por él/ella previamente.

Fecha:

Firma del representante legal:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio genético, sus apartados y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba.

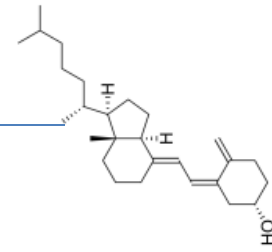
El sujeto consiente participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Nombre:

Firma:

(del investigador o la persona que proporciona la información y consentimiento)



7.2.6 Hoja para extracción de sangre en Consultas Externas del Hospital Universitario Dr. Peset

ESTUDIOS PEDIATRÍA HOSPITAL DR. PESET

RESPONSALBE:

FECHA:

CÓDIGO:

OBSERVACIONES:

Por favor, pinchar y entregar a la madre junto a este papel:

1 tubo lila (EDTA)

1 tubo rojo (GELOSA)

Finalizada la extracción entregar a la madre para que lleve a CONSULTAS EXTERNAS DE PEDIATRÍA (consulta 8, enfermería) las muestras de sangre.

Los padres entregarán en la consulta 8 lo siguiente:

1 muestra de orina (desechando la primera del día)

1 tubo lila

1 tubo rojo

Gracias por su colaboración

Atentamente,
P. Codoñer

IMPORTANTE. Respecto a la orina: El niño orinará nada más levantarse (**esa primera orina de la mañana no se recoge**). Bebe agua y antes o después de la extracción sanguínea, pasa al lavabo de las Consultas externas y orina en dos tubos (uno para el laboratorio y otro para entregar a las enfermeras de la Consulta).

