



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROAMBIENTE
DE LA PIEL EN PACIENTES CON VITILIGO, PARA LA
BUSQUEDA DE BIOMARCADORES INDICADORES DE
RESPUESTA A TRATAMIENTO**

**Escrita y presentada por Jorge Ocampo Candiani
para optar al grado de Doctor por la *Universitat de València***

Dirigida por los doctores: Juan José Vilata Corell, Rocio Ortiz López.

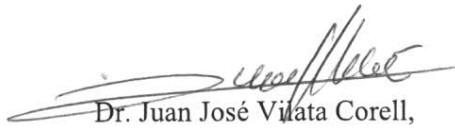
Valencia, 2016

Carta que certifica la realización de la tesis

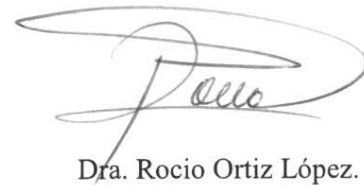
Los doctores Juan José Vilata Corell, Rocío Ortiz López, como directores de tesis, certifican que Don Jorge Ocampo Candiani ha realizado el estudio titulado: ***“Caracterización molecular del microambiente de la piel en pacientes con Vitiligo, para la búsqueda de biomarcadores indicadores de respuesta a tratamiento”***. Siguiendo el programa de Doctorado en Medicina y en cumplimiento de la normativa vigente de la *Universitat de València*; el doctorando presenta el presente proyecto para optar

al grado de Doctor por la *Universitat de València*.

Directores:

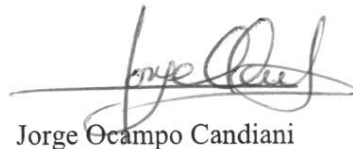


Dr. Juan José Vilata Corell,



Dra. Rocio Ortiz López.

Doctorando:



Jorge Ocampo Candiani

A Sonia mi esposa, a mis hijos Jorge Alejandro y Sonia Sofía, quienes han sido motor y fuente de inspiración para llevar a cabo este sueño, que es la realización de esta tesis doctoral, esperando sirva de ejemplo a futuras generaciones.

Agradecimientos

A mis directores de tesis: Dr. Juan Vilata y Dra. Rocío Ortiz López, por la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado bajo su tutela, por todo el conocimiento adquirido a través de sus consejos y aportaciones.

Al Dr. Med. Santos Guzmán López, Dr. Med. Edelmiro Alanís, Dr.C Mauricio Salinas, Dr. José Luis Alfonso, Dr.C Augusto Rojas Martínez, Dr. Jorge Ocampo Garza, Dra. Alejandra del Muro, Lic. Blanca Ojeda, Dr. Med. Eloy Cárdenas, Dra.C Celia Sánchez, Dr. Víctor Treviño, Dr. Eduardo de la Rosa, Rosa María García de Mata, Dr. Med. Jesús Ancer Rodríguez y al Maestro Rogelio Garza Rivera por su disposición, sugerencias y la ayuda incondicional que me brindaron.

A la Facultad de Medicina, Hospital Universitario Dr. José E. González y al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de nuestra Universidad Autónoma de Nuevo León, por la ayuda irrestricta para realizar esta investigación en sus instalaciones.

La vida es aprendizaje, cuando dejes de aprender, mueres.

Tom Clancy

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCION	1
1.1. Etiología	3
1.1.1. Teoría neural	4
1.1.2. Teoría bioquímica	5
1.1.3. Teoría autocitotóxica	5
1.1.4. Teoría autoinmune	6
1.1.5. Teoría genética	6
1.2. Participación de melanocitos y queratinocitos en el desarrollo del vitiligo.	9
1.3. Apoptosis de melanocitos y queratinocitos en la disfunción de la piel	11
1.3.1. Genes marcadores de apoptosis	12
1.4. Clasificación del vitiligo	15
1.4.1. Estabilidad en el Vitiligo	17
1.5. Tratamiento del vitiligo	17
1.5.1. Mecanismos de repigmentación con tratamiento no quirúrgico	18
1.5.1.1. Fototerapia	18
1.5.1.2. Inmunomoduladores	20
1.5.1.3. Análogos tópicos de la vitamina D	21
1.5.1.4. Pseudocatalasa	22
1.5.1.5. 5-fluorouracilo tópico	22
1.5.2. Mecanismos de repigmentación con tratamiento quirúrgico	22
1.5.2.1. Técnica sin cultivo de células	24
I. <i>Transplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión</i>	24
II. <i>Mini injertos</i>	24

III. <i>Injertos epidérmicos por medio de ampollas</i>	27
IV. <i>Injertos de piel de espesor parcial</i>	27
V. <i>Técnicas combinadas</i>	27
1.5.2.2. Técnica con cultivo de células	28
I. <i>Trasplante de melanocitos cultivados</i>	28
II. <i>Trasplante de melanocitos-queratinocitos cultivados</i>	29
1.6. Perfiles de expresión génica y su utilidad en el diagnóstico en el vitiligo	32
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
2.1. Hipótesis de trabajo	35
2.2. Objetivo principal	35
2.3. Objetivos concretos	35
III. MATERIAL Y MÉTODO	37
3.1. Diseño metodológico del estudio	37
3.1.1. Cálculo del tamaño muestral	37
3.1.2. Ámbito del estudio y pacientes	37
3.1.2.1. Información recolectada	38
3.1.2.2. Obtención de muestras biológicas y pruebas de laboratorio	38
3.1.2.3. Criterios de selección	39
I. Criterios de inclusión	39
II. Criterios de exclusión	40
III. Criterios de eliminación	41
3.2. Características de las biopsias	41
3.3. Tratamiento con Fototerapia	42
3.4. Procesamiento de biopsia en laboratorio	43

3.4.1. Extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos	43
3.4.2. Verificación de la Calidad del ARN	43
3.4.3. Análisis de expresión en biopsias de piel mediante secuenciación <i>TruSeq</i> de <i>Illumina</i>	48
3.4.3.1. Transcripción inversa de ARN y generación de librería para secuenciación	49
3.4.3.2. Análisis de expresión de genes	49
3.4.4. Análisis de resultados de expresión <i>TruSeq</i> de <i>Illumina</i>	50
3.4.5. Generación de Mapas de Calor “Heat Map”	52
3.4.6. Análisis estadístico	52
3.4.7. Variables	54
IV. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL _____	63
4.1. Análisis demográficos	63
4.2. Resultados de análisis clínicos	65
4.3. Antecedentes heredofamiliares	65
4.4. Selección de muestras para la realización de perfiles de expresión génica	66
4.5. Resultado general de perfiles de expresión de genes	67
4.5.1. Análisis de expresión mediante R de Bioconductor	68
4.5.2. Análisis estadísticos, prueba T de Student	71
4.6. Resultados de respuesta a tratamiento UVB-nb	79
4.6.1. Biomarcadores clínicos con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento	84
4.6.2. Genes con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento	86
4.6.3. Análisis de expresión y respuesta a tratamiento <i>BaseSpace</i> de <i>Illumina</i>	95
V. DISCUSIÓN _____	105

5.1. Respuesta a tratamiento UVB-nb experimentado por los pacientes	105
5.2. Análisis de expresión mediante secuenciación masiva de ARNm <i>TruSeq</i> de <i>Illumina</i>	106
5.3. Análisis estadístico	107
5.3.1. Prueba T de Student	107
5.3.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de respuesta a tratamiento	112
5.3.2.1. Parámetros clínicos	112
5.3.2.2. Perfiles de expresión	113
5.3.2.3. Perfiles de expresión agrupados por actividad del vitiligo	116
5.3.3. Identificación de patrones de expresión con utilidad pronóstica mediante <i>TruSeq</i> de <i>Illumina</i>	118
VI. CONCLUSIONES	123
VII. BIBLIOGRAFÍA	125
VIII. RESUMEN	141
ANEXO 1: Forma de consentimiento informado	145
ANEXO 2: Encuesta a pacientes	157
ANEXO 3: Pruebas T Student perfiles de expresión biopsias de piel	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Teorías propuestas en el desarrollo del vitiligo.....	4
Figura 2. Esquema de las principales vías de señalización que conducen a la apoptosis o supervivencia de las células.....	14
Figura 3. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente de 13 años tratado con trasplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión.....	25
Figura 4. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente sometido a mini injertos de piel.....	26
Figura 5. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente sometido a dermoabrasión mas trasplante melanocito-queratinocito.....	28
Figura 6. Fotografías de Fototerapia UVB-nb.....	42
Figura 7. Procedimiento de extracción de ARN total a partir de una biopsia de piel.....	44
Figura 8. Flujo de trabajo para verificación calidad ARN.....	46
Figura 9. Electroferograma de ARN total de una muestra.....	48
Figura 10. Flujo de trabajo para análisis de expresión por secuenciación <i>TruSeq</i> de <i>Illumina</i>	51
Figura 11. Mapa de México.....	63
Figura 12. Distribución de géneros de pacientes incluidos en este estudio.....	64
Figura 13. Edad de inicio del vitiligo por grupos.....	65
Figura 14. Electroferograma ARNs extraídos.....	67
Figura 15. Mapa de calor de patrones de expresión de genes analizados en muestras antes y después de tratamiento.....	69
Figura 16. Mapa de calor de patrones de expresión agrupados de acuerdo al tipo de vitiligo y grupo de mejoría.....	70
Figura 17. Paciente afectado por vitiligo vulgar antes y después de tratamiento.....	81

Figura 18. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento baja (menor al 10%).....	82
Figura 19. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento media (entre el 10.1% y 29.9%).....	83
Figura 20. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento alta (mayor al 30%).....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Incidencia de Vitiligo en diferentes grupos étnicos.....	2
Tabla 2: Clasificaciones clínicas del vitiligo.....	16
Tabla 3: Alternativas terapéuticas utilizadas en el tratamiento de Vitiligo.....	31
Tabla 4: Rutas y genes candidatos analizados por secuenciación de ARN TruSeq.....	53
Tabla 5: Variables Socio demográficas.....	54
Tabla 6: Antecedentes heredofamiliares.....	55
Tabla 7a: Variables clínicas.....	56
Tabla 7b: Variables clínicas.....	57
Tabla 8a: Variables bioquímicas.....	57
Tabla 8b: Variables bioquímicas.....	58
Tabla 8c: Variables bioquímicas.....	59
Tabla 8d: Variables bioquímicas.....	60
Tabla 9: Variables hormonales.....	60
Tabla 10: Variables de expresión génica.....	61
Tabla 11: Antecedentes familiares de vitiligo.....	66
Tabla 16: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de pigmentación, para cada grupo de muestras analizadas.....	72
Tabla 17: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de pigmentación.	73
Tabla 18: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de Apoptosis, para cada grupo de muestras analizadas.....	74
Tabla 19: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de Apoptosis.....	74
Tabla 20: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de sobrevida celular, para cada grupo de muestras analizadas.....	75

Tabla 21: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de sobrevivencia celular	76
Tabla 22: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de estrés oxidativo, para cada grupo de muestras analizadas.....	77
Tabla 23: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de respuesta al estrés oxidativo.....	77
Tabla 24: Promedios y desviación estándar obtenido en gen relacionado con mecanismo de traducción de señales, para cada grupo de muestras analizadas.....	78
Tabla 25: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de traducción de señales.....	78
Tabla 26: Respuesta a tratamiento experimentada por tipo de vitiligo.....	79
Tabla 27: Porcentaje de Respuesta a tratamiento experimentada por pacientes.....	80
Tabla 28: Estadísticos descriptivos niveles de TSH y peso observados para cada grupo de respuesta a tratamiento.....	85
Tabla 29: Diferencia de niveles de TSH observados para los grupos de respuesta a tratamiento bajo y alto.....	85
Tabla 30: Diferencias de pesos observados para los grupos de respuesta a tratamiento bajo y medio.....	85
Tabla 31: Estadísticos descriptivos para los genes observados para cada grupo de respuesta a tratamiento.....	87
Tabla 32: Diferencias de patrones de expresión de genes observados para los grupos de respuesta a tratamiento.....	89
Tabla 33: Diferencias de pesos observados para cada grupo de respuesta a tratamiento	90
Tabla 34: Estadísticos descriptivos para las variables que presentaron diferencias significativas para cada grupo de respuesta a tratamiento considerando tipo de vitiligo.....	91
Tabla 35: Diferencia de patrones de expresión de genes observados para cada uno de los 6 grupos de respuesta a tratamiento generados considerando el tipo de vitiligo.....	92

Tabla 36: Genes predictores de acuerdo al grado de repigmentación considerando tres grupos de respuesta a tratamiento.....	93
Tabla 37: Gen predictor de acuerdo al grado de repigmentación considerando seis grupos de respuesta a tratamiento.....	94
Tabla 38: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs media).....	96
Tabla 39: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs alta).....	98
Tabla 40: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (media vs alta).....	99
Tabla 41: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs media).....	101
Tabla 42: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs alta).....	102
Tabla 43: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (media vs alta).....	104

GLOSARIO

5-FU:	5-fluorouracilo
°C:	Gado Celsius
µg:	Micro gramo
µL:	Micro litro
%:	Por ciento
α-MSH:	Hormona estimulante de melanocitos alfa
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ADNc:	Ácido desoxiribonucleico complementario
ANA's:	Anticuerpos antinucleares
ANOVA:	Análisis de varianza
Apaf-1:	Factor activador de la proteasa apoptótica.
APP:	Proteína precursora β-amiloide.
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr:	Ácido ribonucleico mitocondrial
Ask:	Cinasa reguladora de la señal de apoptosis
Bad:	Gen que codifica a protein BAD (BCL2-Associated Agonist Of Cell Death)
BAX:	Proteina X asociada a BCL2
BCL2:	Proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B (B-cell lymphoma 2)
BCL3:	B-Cell CLL/Lymphoma 3)
BH:	Biometría Hemática
Bid:	Gen que codifica a la protein BID (BH3 Interacting Domain Death Agonist)

Bik: Gen que codifica a la proteína BIK (BCL2-Interacting Killer, inductora de apoptosis)

CASP3: Caspasa 3 o cistein peptidasa 3

CASP7: Caspasa 7 o cistein peptidasa 7

CASP8: Caspasa 8 o cistein peptidasa 8

CASP10: Caspasa 10 o cistein peptidasa 10

CAPN3: Calpaina 3

CCBL2: Cysteine conjugate-beta lyase 2

CDC5L: Cell division cycle 5-Like

CFLAR: CASP8 and FADD-like apoptosis regulator

células T: Linfocitos que coordinan la respuesta inmune.

CIDICS: Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud

cm: Centímetros

CRT: Calreticulina

CSNK1G3: Caseina cinasa 1, Gamma 3

DEPC: Dietilpirocarbonato

DCT: Dopacromo tautomerasa

DM: Diabetes Mellitus

ErK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ET-1: Endotelina-1

FASLG: Ligando FAS (miembro 6 de la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral

g: gravedades

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfate deshidrogenasa.

GGT1: Gamma-Glutamiltransferasa 1

GPD1:	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1
GWAS:	Estudios genómicos de asociación amplia
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HLA:	Complejo mayor de histocompatibilidad humano
HLA-DR4:	Complejo mayor de histocompatibilidad humano, DR cadena beta 4
HTA:	Hipertensión arterial
HUJEG:	Hospital Universitario José Eleuterio González
Hz:	Hertz
IADVL:	Asociación India de Dermatólogos y Venereólogos
IAP:	Inhibidor de apoptosis
IL:	Interleucina
JNK:	Jun quinasa N-terminal
L-tirosina:	para-tirosina
LEF1:	Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1
MAPK1:	Proteína quinasa activada por mitógenos 1
MC1R:	Receptor 1 de melanocortinas
MC4R:	Receptor 4 de melanocortinas
mJ:	Mili Joules
min:	Minutos
MITF:	Factor de transcripción asociado a Microftalmia
ml:	Mili litros
MLANA:	Melan-A
mm:	Milímetros
MSH:	Hormona estimulantes de melanocitos.

MTY:	Monterrey
NFKB1:	Factor nuclear Kappa
NOR:	Corresponde a biopsia de piel normal
NOREP:	Corresponde a biopsia de piel que no repigmentó después de tratamiento
nm:	Nanometros
p:	Brazo pequeño del cromosoma
P13K:	Fosfoinositido 3 quinasa.
p38:	Proteína cinasa activada por mitógeno
p53:	Proteina Tumoral P53.
PAICyT:	Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PBMCs:	En células mononucleares de sangre periférica
PFHS:	Análisis de función hepática
PHACTR2:	Fosfatasa y regulador de actina-2
PIK3CB:	Fosfatidil inositol -4,5-Bifosfato 3-cinasa, subunidad catalítica Beta
POMC:	Proopiomelanocortina
PUVA:	Luz ultravioleta de tipo A con un espectro de 320 a 400 nm .
q:	Brazo largo del cromosoma
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QS:	Química sanguínea
Redox:	Óxido reducción
REP:	Corresponde a biopsia de piel repigmentada después de tratamiento
RNA-Seq:	Análisis de expresión mediante secuenciación masiva de ARN
RSK:	Cinasa ribosómica S6 90 kDa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RQI: Coeficiente de integridad del ARN

RPS6KB1: Proteína Ribosomal S6 cinase, 70kDa, Polipeptido 1

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con reacción de retro-transcripción (del Inglés Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction):

SCF: Factor de células madre SCF

SPSS: Acrónimo de Statistical Package for the Social Sciences, paquete estadístico de la empresa IBM

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNF α : Factor de necrosis tumoral α o 1

TNF-R: Receptor del factor de necrosis tumoral

TNFRS1A: Miembro 1A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral.

TPT1: Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

TYRP1: Proteína relacionada con tirosinasa-1

TXN: Tioredoxina

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

UBMGyS: Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación

U/L: Unidades por litro

UV: Luz ultravioleta

UVB-nb: Luz Ultra Violeta de banda estrecha

USA: Estados Unidos de Norte América

USF1: Factor de transcripción río arriba 1

Vit: Vitiligo

VIT: Corresponde a biopsia de piel con Vitiligo

WNT: Vía de señalización celular asociada a la proteína Wingless

WNT7A: Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A

YAG: Acrónimo del inglés Yttrium aluminium garnet

I. INTRODUCCIÓN

El vitiligo pertenece a una familia de enfermedades cutáneas congénitas o adquiridas, caracterizadas por falta de pigmentación en la piel, en forma de máculas o manchas bien definidas, acrómicas o hipocrómicas en las cuales se ha observado el deterioro de la función del melanocito, la célula de la piel encargada de la producción de la melanina. El análisis de la piel mediante técnicas de inmunohistoquímica ha permitido observar que en la piel de pacientes con vitiligo existe destrucción selectiva de este tipo celular y, en caso de estar presentes se encuentran en un estado indiferenciado sin actividad melanogénica (1).

La enfermedad comienza con una o varias máculas asintomáticas y de límites precisos, que gradualmente aumentan de tamaño; de forma y distribución variada, afectando cualquier región de la piel y membranas mucosas, predominantemente en áreas como superficies extensoras y salientes óseas (rodillas, articulaciones interfalángicas y tobillos), comprometiendo, en algunos casos, el pigmento de otros lugares, incluidos los ojos y el cabello (2-4).

Se ha descrito que la enfermedad afecta entre el 0.1 y el 2% de la población mundial, sin embargo, su incidencia varía considerablemente entre la población o grupo étnico analizado, estimándose un 0.14% en Rusia, entre 1% a 2.5% en Estados Unidos y Japón (5), y más altas como las descritas en México (4%) y en la India (8.8%)(1, 6). En España no hay estadísticas de esta enfermedad, sin embargo, según datos de la Asociación Española de Pacientes con Vitiligo se ha estimado prevalencias del 0,6%-1% para esta población.

Afecta por igual a ambos sexos y a todas las razas (7), siendo particularmente importante en pacientes con fototipos oscuros, o

blancos que se broncean intensamente, debido al contraste entre zonas de la piel pigmentadas y despigmentadas, causando que más de dos terceras partes de estos pacientes sufran un intenso estrés psicosocial (2) (Tabla 1).

Tabla 1: Incidencia de Vitiligo en diferentes grupos étnicos

Porcentaje incidencia	Lugar	Autor	Año publicación
0.5-2%	Mundial	Lerner y Nordlund ⁽⁸⁾	1978
1-4%	Mundial	Parsad y cols. ⁽⁶⁾	2003
0.5-1%	Mundial	Taïeb y Picardo ⁽⁹⁾	2007
0.1 - 2%	Mundial	Halder y cols. ⁽¹⁰⁾	2009
1%	USA, estimación	Nordlund y Majunder ⁽¹¹⁾	1997
1%	USA, estimación	Halder y cols. ⁽¹⁰⁾	2009
2%	Japón, estimación	Nordlund y Majunder ⁽¹¹⁾	1997
0.15-0.32%	Turquía	Akay y cols. ⁽¹²⁾	2010
0.38%	Dinamarca, población representativa	Howitz y cols. ⁽¹³⁾	1977
0.30%	Italia	Fornara ⁽¹⁾	1941
3.00%	Francia	Perrot ⁽¹⁾	1973
4%	México, clínicas dermatológicas	Canizares ⁽¹⁴⁾	1960
4%	México, clínicas dermatológicas	Ruiz-Maldonado ⁽¹⁵⁾	1964
2.60%	México, clínicas dermatológicas (Pacientes pediátricos)	Ruiz-Maldonado y cols. ⁽¹⁶⁾	1977
3.30%	México, N.L., clínica dermatológica	Ocampo y Cols. ⁽¹⁷⁾	2007
1.64%	Japón	Arakawa ⁽¹⁾	1944
1.25-8.8%	India	Sehgal y Srivastava ⁽¹⁾	2007

Esta afección dermatológica puede presentarse en cualquier etapa de la vida, sin embargo, se ha observado que la mayoría de los casos comienzan entre los 10 y los 30 años (18), describiéndose que casi la mitad de ellos se presentan durante la etapa de crecimiento activo, antes de los 20 años, y entre un 70% a 80% de los pacientes la desarrolla antes de los 30 años (1).

El vitiligo puede estar asociado con enfermedades autoinmunes tales como tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus, enfermedad de Addison, alopecia areata o anomalías oftálmicas como la iritis, entre otras (4, 19, 20), apoyando esta asociación la presencia de linfocitos en la dermis de lesiones tempranas, autoanticuerpos en circulación contra melanocitos y antígenos del sistema melanogénico en muchos pacientes que presentan la enfermedad activa, además de responder al tratamiento con agentes inmunomoduladores como corticoesteroides y fototerapia (21).

Ha sido descrito que los anticuerpos presentan un limitado acceso con los antígenos blanco expresados dentro de células viables, y se ha propuesto que los anticuerpos contra antígenos intracelulares, probablemente, son generados en respuesta al daño del melanocito. También ha sido publicada la asociación de vitiligo con la presencia de antígenos leucocitarios humanos HLA-DR4, con DW7, DR1, B13, A2, B21, CW6, DR53, A19 y DR52 (5).

1.1. Etiología del vitiligo

La causa del vitiligo es compleja y aún no se conoce en su totalidad. Varias hipótesis y teorías han sido desarrolladas para explicar el proceso de despigmentación, o incluso la destrucción del melanocito que ocurre en esta patología. Sin embargo, no dan cuenta del completo espectro de esta enfermedad. Para el desarrollo de ellas han sido considerados tanto los resultados

obtenidos de las observaciones clínicas de la patología, el origen embrionario del melanocito, asociación con diversos trastornos autoinmunes, presencia de familiares afectados con la enfermedad, entre otros, lo que sugiere que es causada por una combinación de factores ambientales, autoinmunes y genéticos, por lo que se han propuesto varias teorías al respecto (3, 22, 23) (fig. 1):

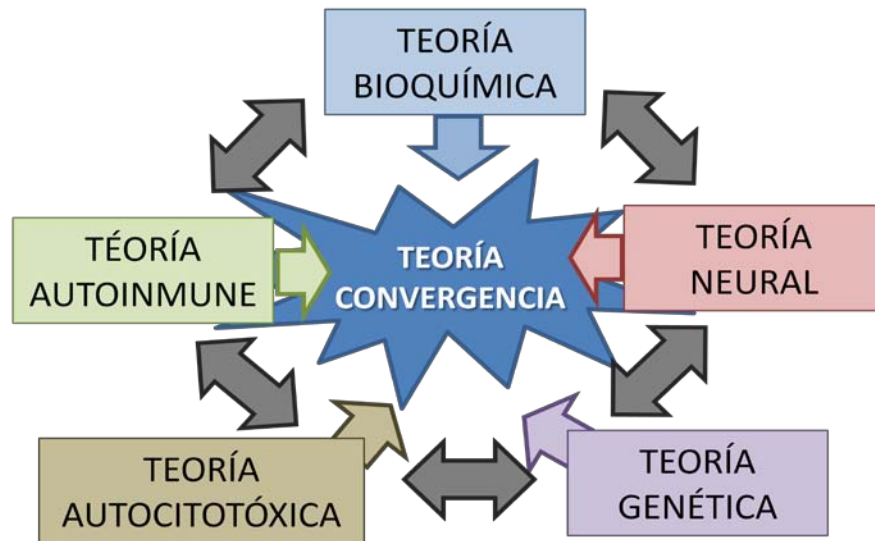


Figura 1. Teorías propuestas en el desarrollo del vitiligo. En ella se representa como pueden actuar los diferentes factores de manera independiente o en conjunto (teoría de la convergencia) en el desarrollo de la patología.

1.1.1. Teoría neural. Esta teoría se sustenta en el origen embrionario del melanocito en la cresta neural, y su morfología dendrítica similar a las células nerviosas. De acuerdo con este origen común del melanocito y células nerviosas, además de la existencia en la hipófisis de la hormona estimulante de los melanocitos, se ha propuesto que la intervención de factores neuroendocrinos, involucrando a la hipófisis, glándula suprarrenal, hipotálamo y sistema neurovegetativo, así como la producción de

un mediador neuroquímico (ej. Norepinefrina) que destruiría los melanocitos o inhibiría la producción de estas células (24). La Teoría neural probablemente es la base de los tipos más localizados como vitiligo focal y segmentario que presenta patrón metamérico (25), mientras que la melancitorragia puede explicar las lesiones causadas por el fenómeno isomórfico de *Koebner* (aparición de lesiones en sitios de presión o trauma) (21, 26). En la melancitorragia se propone que los melanocitos están débilmente anclados y producto de la menor fricción y / u otros tipos de estrés, pueden inducir la migración y la subsiguiente pérdida transepidérmica de este tipo celular (21).

1.1.2. Teoría bioquímica. La teoría bioquímica establece que ocurre desregulación en la vía de biopterina en la epidermis, lo que predispone a la citotoxicidad de los melanocitos y el vitiligo (21). Esto debido a que a nivel bioquímico ocurre un defecto en la actividad de la enzima 4-alfa-hidroxitetrahidrobiopterina deshidratasa aumentando sus niveles, y actuando como inhibidor competitivo para la enzima fenilalanina hidroxilasa que participa en la síntesis de tirosina (precursor de la melanina) a partir de fenilalanina, que daría por resultado vitiligo. La presencia excesiva de este factor en la epidermis bloquea la producción de L-tirosina desde la fenilalanina y también la transcripción del gen de la tirosinasa, además causa la producción exagerada de catecolaminas por los queratinocitos; sugiriendo su participación en los mecanismos de lesión de los melanocitos, los que son inactivados.

1.1.3. Teoría autocitotóxica. Esta teoría considera que el vitiligo se produce debido a la acumulación de metabolitos tóxicos

en los melanocitos producto de un defecto en el aclaramiento metabólico de toxinas (27).

Estos metabolitos tóxicos, ya sea producto de exposición ambiental a agentes tales como fenol o hidroquinonas, o a los originados de vías intrínsecas de síntesis de melanina (precursores de la melanina), pueden acumularse y dañar los melanocitos de los individuos genéticamente susceptibles (28).

1.1.4. Teoría autoinmune. En esta teoría se propone que un trastorno del sistema inmunológico causa la destrucción de los melanocitos. Las lesiones originadas en el vitiligo se caracterizan por la infiltración de células inflamatorias, particularmente células citotóxicas, células T colaboradoras y macrófagos. Esta infiltración es más prominente en la piel perilesional justo antes de la aparición clínica de vitiligo (29).

Así mismo, se han observado niveles elevados de anticuerpos contra antígenos de melanocitos en pacientes, y una asociación frecuente con trastornos autoinmunes como el hipotiroidismo, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal, tanto en pacientes con vitiligo y en sus familiares de primer grado, lo que sugiere un vínculo etiológico genético común entre el vitiligo y otras enfermedades autoinmunes (29, 30).

1.1.5. Teoría genética. En cuanto a los factores genéticos involucrados en el desarrollo del vitiligo, ha sido útil la información recopilada a partir de estudios realizados sobre gemelos homocigotos y sobre casos familiares. Además, se ha propuesto que es un componente genético multifactorial el que

predispone a ciertos individuos a desarrollar la enfermedad, el cual sería también responsable de su compleja presentación clínica (5, 7, 18). Existen varios artículos en la bibliografía que hacen referencia a la participación de distintos *loci* génicos seleccionados a partir de estudios genómicos amplios en familias que presentan prevalencia elevada para esta patología (3, 31), además de estudios de ligamiento y asociación que han proporcionado fuerte evidencia de la participación de diferentes genes de susceptibilidad a vitiligo, como por ejemplo los localizados en los cromosomas 4q13—q21, 1p31, 7q22, 8p12 y 17p13, entre otros (18).

Investigadores de diferentes áreas del mundo han explorado intensamente los posibles genes de susceptibilidad involucrados tanto en el vitiligo y otras enfermedades autoinmunes, y aquellos genes implicados sólo en el desarrollo del vitiligo, mediante estudios de análisis de la expresión génica, estudios de asociación de genes candidatos, estudios de ligamiento genético y estudios genómicos de asociación amplia (GWAS) (21). Por otra parte, a través de estudios de expresión génica realizados en el vitiligo, han sido analizados los cambios en el patrón de expresión de varios genes asociados con la inmunomodulación, la melanogénesis, y la regulación del desarrollo y la supervivencia de los melanocitos (32-34).

Al respecto Kingo K *et al* (2007 y 2008) realizaron análisis de expresión de genes pertenecientes a la ruta de traducción de señal de las melanocortinas (MITF, LEF1, p38, PIK3CB, RPS6KB1, USF1 y BCL2) y en el proceso de melanogénesis (POMC, MC1R, MC4R, TRP1 y DCT) a través de qPCR en ARNm obtenido biopsias de piel de pacientes con vitiligo, describiendo los cambios

de expresión de algunos de los genes participantes en estos procesos y resaltando su importancia en la manifestación de esta enfermedad. (32, 33). Por otra parte, Strömberg S *et al* (2008), utilizando tecnología de micro arreglos de ARNm, analizaron el perfil de expresión de aproximadamente dieciséis mil genes, describiendo 5 rutas comprometidas en el desarrollo del vitiligo: (i) desarrollo de los melanocitos, (ii) procesamiento intracelular y tráfico de proteínas de la familia de genes de la tirosinasa, (iii) empaquetamiento y transporte de melanosomas, (iv) adhesión celular y (v) procesamiento y presentación de antígenos (34).

Cabe resaltar que ese estudio fue realizado en cultivo celular de melanocitos provenientes de piel con vitiligo y, a pesar de la gran cantidad de información aportada por este estudio, es necesario considerar que las técnicas de cultivo celular pueden modificar los patrones de expresión de las células estudiadas, en comparación a lo observado *in vivo* en el contexto de la piel.

Salinas M en su tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias (2012), describe los resultados de expresión de ARNtotal obtenido de biopsias de piel de pacientes con vitiligo vulgar activo y estable mediante análisis con microarreglos de expresión (35). En este caso se encontró patrones de expresión alterados en genes involucrados en el metabolismo de la melanina, transporte de vesículas y citoesqueleto, respuesta inmune, estrés oxidativo, apoptosis, proteosoma, diferenciación y mantenimiento de los queratinocitos.

1.2. Participación de melanocitos y queratinocitos en el desarrollo del vitiligo.

En numerosas publicaciones se ha establecido que el melanocito, una célula dendrítica que deriva de la cresta neural que migra hacia la epidermis y al folículo piloso durante la etapa de embriogénesis, es la célula principalmente involucrada en el vitiligo. Sin embargo, se ha dejado de lado la importante participación del queratinocito, sin tomar en cuenta que ambos tipos celulares forman unidades estructurales y funcionales en la piel (36).

El proceso que da origen a la pigmentación en vertebrados ocurre en el melanocito (37), por lo cual, el color de la piel depende de la actividad de estas células, en especial de su capacidad de producir y almacenar melanina en vesículas especializadas conocidas como melanosomas, organelos membranosos que contienen las enzimas necesarias para desarrollar el proceso de melanogénesis, particularmente tirosinasa, que son transferidos a los queratinocitos adyacentes en la piel. Este proceso es finamente regulado mediante estímulo de hormonas estimulantes de melanocitos (MSH).

La cascada de señalización que desencadena la activación de la ruta de la melanogénesis es controlada por una serie de genes, cuyos productos actúan como enzimas, proteínas estructurales, reguladores transcripcionales, transportadores, receptores y factores de crecimiento que están relacionados con el proceso (38). Se han descrito diversos componentes que están relacionados con el proceso de melanogénesis. Entre ellos algunas de las hormonas y productos procedentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, así como sus respectivos receptores y sus reguladores negativos, los cuales desencadenan una cascada de señalización nuclear que conlleva a la activación o represión de la Tirosinasa, enzima clave

del proceso, y cuya concentración determina la cantidad final de melanina producida (39, 40). Entre los reguladores hormonales de la síntesis de melanina, el más importante es la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), melanocortina producida por la hipófisis cerebral, que actúa recíprocamente con un receptor de superficie de célula específico (MC-1R) para estimular la síntesis de melanina y otras funciones de los melanocitos diferenciados (38).

Existe suficiente evidencia que sugiere la regulación ejercida desde el queratinocito sobre el melanocito. Las interacciones célula - célula juegan un papel importante en homeostasis y regeneración de tejidos adultos, estimulando la proliferación in vitro y la diferenciación de los melanocitos. Se sabe que la luz ultravioleta (UV) estimula la producción de endotelina-1 (ET-1) y proopiomelanocortina (POMC) por queratinocitos, factores que pueden actuar de manera paracrina estimulando la función de los melanocitos. Además de los queratinocitos, cuyo daño puede tener un efecto significativo en la supervivencia de los melanocitos, los fibroblastos, y posiblemente otras células de la piel que producen citocinas, factores de crecimiento, y mediadores inflamatorios que pueden aumentar la producción de melanina y/o estimular la transferencia de melanina desde melanocitos a queratinocitos. Así mismo se ha publicado que los factores de crecimiento de melanocitos afectan no sólo el crecimiento y la pigmentación de melanocitos, sino también su forma, dendricidad, adherencia a proteínas de la matriz, y la movilidad (41).

1.3. Apoptosis de melanocitos y queratinocitos en la disfunción de la piel

La apoptosis o muerte celular programada tiene un papel importante durante el desarrollo de los diferentes órganos, y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, regulando el número de células en estos y eliminando aquellas células potencialmente peligrosas tales como los linfocitos reactivos, o células neoplásicas e infectadas por virus (42).

En el contexto de la piel, los queratinocitos contribuyen a la homeostasis de los melanocitos. Por esta razón, alteraciones de éste tipo celular pueden conducir a la disfunción de los melanocitos, proceso observado en pacientes con vitiligo. En particular se ha descrito en piel obtenida de lesiones con vitiligo la disminución en la liberación de mediadores melanogénicos involucrados en el proceso de pigmentación (factor de células madre SCF y endotelina-1 ET-1) y cambios en el nivel de funcionamiento de los queratinocitos que pueden originar la disfunción y apoptosis de los melanocitos en la epidermis de los pacientes con vitiligo (43). También se ha observado un aumento en los niveles de expresión de ARNm del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de la interleucina-6 (IL-6), dos citocinas pro-inflamatorias con un efecto inhibitor sobre la pigmentación, en la epidermis de biopsias de piel proveniente de lesiones de vitiligo, y la presencia de abundantes queratinocitos apoptóticos en piel obtenida de lesiones en comparación a lo observado en piel perilesional de pacientes con vitiligo o en epidermis de sujetos control, en la que estos fenómenos no son observados (43).

Por otra parte, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuye al proceso de apoptosis en melanocitos y el desarrollo de enfermedades cutáneas o alteraciones inmunes en la piel. Si

bien los mecanismos y las interrelaciones entre ROS y autoinmunidad son desconocidos, en estudios realizados con cultivo de melanocitos en el cual se investigó el papel de calreticulina (CRT), una proteína con diversas funciones en la células, en la inducción de apoptosis en melanocitos provocado por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sugieren una relación entre la apoptosis y las reacciones inmunes durante la destrucción de los melanocitos (44). En ese estudio se observó un aumento en los niveles totales de CRT en melanocitos humanos inmortalizados normales y también de aquellos obtenidos a partir de piel con vitiligo expuestos al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , describiéndose un aumento en los niveles superficiales del CRT. Por otra parte, la sobreexpresión de CRT produjo un aumento en la apoptosis inducida por H_2O_2 , mientras que la reducción de la expresión de este gen por técnicas moleculares o “knockdown” mostró resultados opuestos. Asimismo se observó que, en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) tratadas con CRT o melanocitos estresados, expresaron niveles más altos de IL-6 y TNF- α comparados con las células no tratadas, efecto que fue inhibido con la disminución de CRT(44).

1.3.1. Genes marcadores de apoptosis

Un gran número de genes y sus proteínas son las encargadas de regular el proceso de apoptosis. El análisis de los genes marcadores de este proceso puede ser particularmente importante en la caracterización de tejido normal o afectado por vitiligo.

En la actualidad se ha descrito casi un centenar de genes involucrados en el proceso de apoptosis. Por ejemplo, el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) unido a su ligando (TNF), inician la apoptosis mediante la activación de proteínas

adaptadoras relacionadas al proceso de muerte celular que reclutan y activan las caspasas (45).

Otros de los genes y sus productos proteicos de gran importancia involucrados en este proceso son los correspondientes a la familia de proteínas BCL-2 (fig. 2). Estas se encuentran en la superficie externa de la mitocondria y divide a 3 grupos, entre ellos: proteínas anti apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL, proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad y Bid, y las proteínas con actividad apoptótica como Bik (46). Bcl-2 y Bcl-XL residen en la membrana externa de la mitocondria y son las encargadas de inhibir la liberación de citocromo C. Por el contrario, Bad, Bid y Bax localizadas en el citoplasma translocan a la mitocondria provocando la liberación de citocromo C y la activación de las caspasas (47).

Después del daño severo ocurrido, el ADN no puede ser reparado de manera correcta, iniciándose un proceso que conduce a la apoptosis de la célula, mediado por la activación de p53 (gen que es encargado de la vigilancia del genoma, correcto control del ciclo celular y reparación del ADN) que induce la expresión de genes pro-apoptóticos como Bax (BCL-2 asociada a la proteína x). Esta proteína se localiza en la membrana externa de la mitocondria con algunas otras proteínas que participan en la formación del complejo de apoptosoma, que tiene el papel clave en la activación de las caspasas y la inducción de la apoptosis (46).

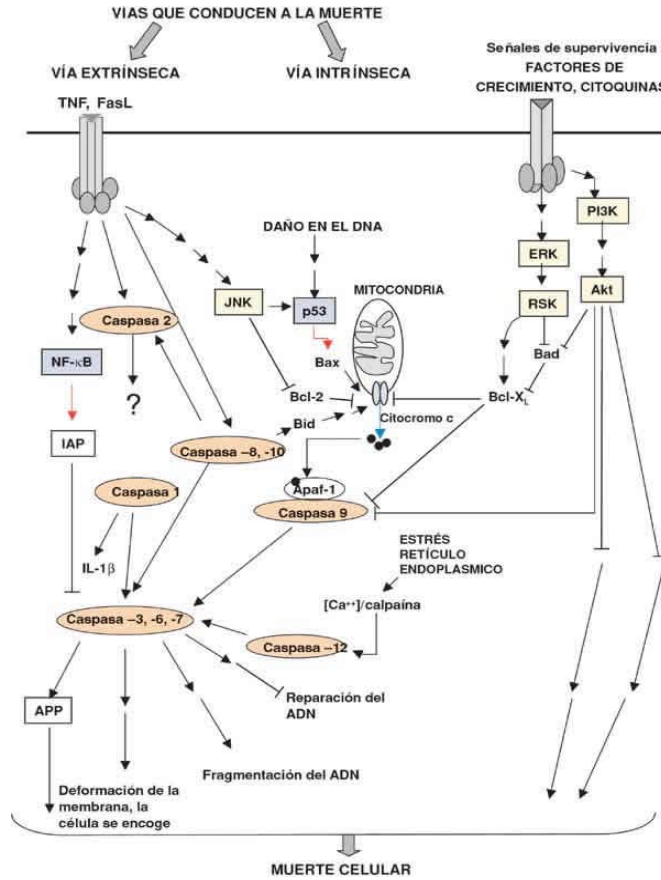


Figura 2. Esquema de las principales vías de señalización que conducen a la apoptosis o supervivencia de las células. Tomado de García M. y Vecino E., 2003 (48).

En esta figura se representan alguna de las proteínas involucradas en el proceso de apoptosis o supervivencia de la célula. Los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca). Un paso clave en activación de la vía intrínseca es la liberación de citocromo c y unión a la proteína Apaf-1, que activa a la caspasa 9. La salida de citocromo c desde la mitocondria está regulada por miembros de la familia Bcl-2, alguno de estos miembros son proteínas pro-apoptóticas como Bid y Bax mientras que otros son antiapoptóticas (Bcl-XL y Bcl-2). Otro mecanismo de apoptosis desencadenada por estímulos intracelulares se produce por estrés del retículo endoplásmico. Este proceso está mediado por caspasa 12. La vía extrínseca se activa tras la unión de un ligando, polipéptido de la familia del TNF, a su receptor esto activa a las caspasas iniciadoras. Una vez activadas, estas caspasas escinden y activan otras caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que en última instancia son las responsables de la escisión de proteínas del cito-esqueleto y proteínas nucleares, lo que conduce a la apoptosis de las células. Los ligandos antiapoptóticos, entre los que se incluyen los factores de crecimiento y las citocinas, activan Akt y RSK, inhibiendo Bad y evitando la salida de citocromo c. El receptor de TNF puede inhibir la apoptosis mediante una vía mediada por NF-κB que incluye la inducción del inhibidor de apoptosis (IAP) que inhibe directamente las caspasas 3, 7 y 9. Abreviaturas: Apaf-1: Factor activador de la proteasa apoptótica. APP: Proteína precursora β-amiloide. Ask: Quinasa reguladora de la señal de apoptosis. Bcl-2: proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B, Erk: Quinasa regulada por señales extracelulares. IAP: Inhibidor de apoptosis. JNK: Jun quinasa N-terminal. RSK: quinasa ribosómica S6 90 kDa. TNF: Factor de necrosis tumoral. NF-κB: Factor nuclear kappa B. P13K: Fosfoinositido 3 quinasa.

Por otra parte se ha descrito que el estrés ambiental puede conducir a la oligomerización de la proteína BCL2 (B-cell lymphoma 2) y su inserción en la membrana mitocondrial, liberando APAF1 y otros mediadores que activan a caspasas (49, 50). Estas últimas promueven una cascada de proteólisis que degrada proteínas celulares diana (51).

1.4. Clasificación clínica del vitiligo

Han sido propuestos diversos esquemas basados en la localización, distribución y extensión de las lesiones despigmentadas.

Respecto a la localización de las lesiones, el vitiligo ha sido clasificado en vitiligo localizado, generalizado y universal. Esta clasificación fue propuesta por Lerner AB y Nordlund JJ (1978) (1, 7, 8, 52). Una segunda clasificación, basada en los tipos clínicos determinados mediante un ensayo de estimulación de secreción del sudor fue determinada por Koga M (1977).(53) En esta última el vitiligo lo subdividió en dos tipos, que pueden presentar un mecanismo patogénico probablemente diferente: vitiligo no segmentario (o tipo A) y vitiligo segmentario (o tipo B) (1, 7, 54, 55). En la tabla 2 se presentan las diferentes clasificaciones y algunas de las características descritas para cada tipo de vitiligo.

En cuanto al estado del vitiligo, este ha sido clasificado en activo y estable, considerando para dicho efecto el intervalo de manifestación de nuevas áreas de despigmentación y el crecimiento de las lesiones ya presentes en el sujeto. El vitiligo se presenta usualmente en estado activo (progresivo), en el cual se produce progresión de lesiones viejas, desarrollo de nuevas lesiones y aparición de máculas blancas posteriores a la ocurrencia de un trauma (hecho conocido como fenómeno isomórfico o de *Koebner*) (56).

Tabla 2. Clasificaciones clínicas del vitiligo.

Clasificación Tipo	Lerner AB y Nordlund			Koga M	
	Localizado	Generalizado	Universal	Tipo A	Tipo B
Subtipos / características	<p>Focal: Una o más manchas en un área, pero no en un patrón segmental.</p> <p>Segmentario: Una o más máculas en distribución dermatomal</p> <p>Mucosas: Sólo afecta a mucosas</p>	<p>Acrofacial: Sólo afecta a cara y extremidades distales.</p> <p>Vulgar: Distribución simétrica de las lesiones en zonas típicas, por todo el cuerpo. Es la forma más común.</p> <p>Mixto: Segmentario / vulgar o acrofacial</p>	<p>Universals: Involucra a más de un 80% de despigmentación en el cuerpo</p>	<p><i>(no segmentario)</i> Evolución a lo largo de la vida, se asocia con el fenómeno de Koebner y frecuentemente con enfermedades autoinmunes; aparición a cualquier edad y es 3 veces más común en la población general que el tipo B. Presenta parches no confinados y distribución simétrica.</p>	<p><i>(segmentario)</i> Es poco común, y presenta distribución dermatomal. Luego de una aparición temprana (en la infancia o juventud) y rápida evolución, la enfermedad exhibe un curso estable. Puede ocurrir repigmentación espontánea en 10-20% de los pacientes</p>

En el caso del vitiligo estable el tamaño y número de las lesiones se presenta en estado estacionario por varios meses (6 meses o más) a años, y no se ha descrito el desarrollo del fenómeno de Koebner en este caso (56). Para ambos tipos de vitiligo se ha descrito que, además de ocurrir la destrucción selectiva de los melanocitos, se observan poblaciones de este tipo celular con inhibición de su función normal, lo que conduce a la aparición de zonas despigmentadas en la piel (57).

1.4.1. Estabilidad en el vitiligo

Hasta la actualidad no se ha alcanzado un consenso en los criterios para definir estabilidad en el vitiligo, en el cual han sido incluidos no sólo los aspectos clínicos de la estabilidad, sino también bioquímicos, serológicos y ultra estructurales recientemente identificados que correlacionan con la misma. La mayoría de estos parámetros han evolucionado como resultado de la comprensión de la patogénesis de la enfermedad y las diversas hipótesis para el origen de la misma (58).

Aunque no existe un consenso universal sobre la duración óptima de la no progresión de la enfermedad (estabilidad clínicamente), sugiriéndose en varios estudios periodos que varían entre 4 meses y 3 años, la Asociación India de Dermatólogos y Venereólogos (IADVL) la ha definido como aquella en que "un paciente no padece nuevas lesiones, sin progresión de las lesiones existentes, y la ausencia de fenómeno de *Koebner* durante 1 año" (58).

1.5. Tratamiento del vitiligo

Dependiendo del tipo de vitiligo, se han sugerido una serie de tratamientos médicos, quirúrgicos y cosméticos. Los cosméticos como maquillajes convencionales y preparaciones de auto

bronceado son métodos prácticos y rápidos que se pueden utilizar en una gran cantidad de pacientes.

1.5.1. Mecanismos de repigmentación con tratamiento no quirúrgico

En el caso de tratamientos no quirúrgicos, la repigmentación de las áreas acrómicas puede llevarse a cabo por medio de la aplicación de glucocorticoides tópicos, sobre todo en el caso de vitiligo localizado, utilizando esteroides de baja potencia en áreas de piel delgada (por ejemplo: área facial, axila o piel de los niños), o seleccionando esteroides de mayor potencia para áreas de piel más gruesa, sobre todo en piel de sujetos adultos (4).

El uso intralesional de corticosteroides es poco utilizado debido a complicaciones experimentadas por el paciente como el dolor y los posibles efectos secundarios inherentes del medicamento, como lo son atrofia de la piel, telangiectasias y hemorragias intradérmicas. El tratamiento sistémico con corticoides orales e inmunomoduladores ha sido utilizado con la finalidad de bloquear el sistema inmune en las áreas despigmentadas, disminuyendo así el daño a los melanocitos (5).

1.5.1.1. Fototerapia

La fototerapia, empleando luz UV o Láser se ha empleado con la finalidad de estimular la melanogénesis (59). Uno de los métodos que más se utiliza y con mejores resultados en el proceso de repigmentación de pacientes con vitiligo, debido a su efecto inductor de la melanogénesis, es la aplicación de psoralenos tanto por vía oral como tópica, con la subsecuente exposición a luz ultravioleta de tipo A con un espectro de 320 a 400 nm (PUVA), este tratamiento dura varios meses (60, 61). Este espectro de luz

tiene una penetración hasta la dermis; sin embargo menos del 20% de los casos presentan una repigmentación total (62, 63). En cuanto a su mecanismo de acción después de la exposición a los rayos UVA, los psoralenos se unen covalentemente al ADN e inhiben la replicación celular, sin embargo el cómo esto conduce a la repigmentación de lesiones de vitiligo es un mecanismo aún poco conocido. PUVA estimula la actividad de la tirosinasa y la melanogénesis en la piel no afectada de los pacientes con vitiligo, siendo también un inmunosupresor local que produce la disminución de la expresión de los antígenos de los melanocitos asociados con vitiligo (10).

La luz ultravioleta de tipo B de banda estrecha (UVB-nb) es considerada actualmente el tratamiento de elección para niños de más de 6 años y adultos (4), convirtiéndose en el tratamiento de primera elección en los casos de vitiligo generalizado (27); utiliza un espectro de luz de 311 nm, presentando una penetrancia hasta la capa basal de la epidermis (10, 64). El mecanismo de acción de UVB-nb es a través de la inducción de inmunosupresión local y de la estimulación de la proliferación de melanocitos en la piel y en la vaina externa de la raíz del folículo piloso; también hay un efecto estimulante sobre la melanogénesis y en la producción de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) (27).

En cuanto a la terapia con Láser, o Láser *excimer* (dímero excitado), es un tipo de laser UV de cloruro de xenón, con ancho de banda de 308nm coherente con UVB-nb. Se ha estudiado su eficacia en el tratamiento del vitiligo, encontrándose que es más eficaz cuando se utiliza 3 veces por semana. Períodos de tratamiento de más de 12 semanas son necesarios para obtener una

repigmentación satisfactoria. La dosis inicial es de 50 a 100 mJ por cm cuadrado. Al igual que con la fototerapia estándar, el láser *excimer* produce los mejores resultados en el tratamiento de la cara, observándose que las zonas menos sensibles a este tratamiento son las manos y los pies (10).

1.5.1.2. Inmunomoduladores

Debido a que el vitiligo ha sido considerado como una enfermedad inmunomediada, han sido utilizados tanto agentes inmunosupresores como inmunomoduladores como tratamiento en esta enfermedad. Entre los inmunosupresores, los esteroides sistémicos han sido utilizados comúnmente. Sin embargo, la terapia con esteroides sistémicos siempre se ha asociado con una alta incidencia de efectos adversos, especialmente en los niños, que es el grupo etario más afectado (27). Los esteroides tópicos son principalmente indicados para el tratamiento de áreas limitadas de vitiligo; las lesiones presentes en la cara parecen tener mejor respuesta a este tipo de tratamiento al igual que las lesiones de cuello y en las extremidades, con la excepción de los dedos y de los pies (10).

Los inmunomoduladores tópicos tacrolimus y pimecrolimus, han sido recientemente incorporados como tratamiento tópico del vitiligo. Su uso en apósitos hidrocoloides oclusivos durante la noche ha resultado ser eficaz y seguro en el tratamiento de áreas del cuerpo como en los antebrazos y parte anterior de la pierna (65). Recientemente, se ha demostrado que el tacrolimus aumenta la pigmentación y la migración de los melanocitos humanos, produciendo un aumento en el contenido de melanina, aunque se ha observado un efecto inhibitor sobre el crecimiento de

melanocitos humanos en cultivo. El aumento de la pigmentación se debe al resultado de la acción estimulante del tacrolimus sobre la expresión y la actividad de la tirosinasa que conduce a la biosíntesis de melanina. Además, promueve la migración celular de melanocitos humanos tratados con este fármaco (66).

El pimecrolimus al igual que el tacrolimus, es un antibiótico macrolactámico (macrólido lactama) con una estructura similar a este último. Su estructura, más lipofílica que la del tacrolimus, se une específicamente y con alta afinidad a macrofilina 12 inhibiendo la calcineurina y, por consiguiente, la transcripción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10. El pimecrolimus tiene un peso molecular bajo para penetrar en el estrato córneo y por lo tanto está activo después del tratamiento tópico.

En contraste con la pomada de tacrolimus, el pimecrolimus está disponible en un vehículo cremoso. Como resultado, su empleo es cosméticamente más favorable para muchos pacientes (67).

1.5.1.3. Análogos tópicos de la vitamina D

Análogos de la vitamina D, en particular el calcipotriol, se han utilizado tópicamente solos o en combinación con esteroides tópicos en el tratamiento de vitiligo. La base para el uso de estos agentes es que la vitamina D3 afecta el crecimiento y la diferenciación de melanocitos y queratinocitos (27). El calcipotriol tiene efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorio y estimula la diferenciación terminal de los queratinocitos actuando a través de un mecanismo inmunológico y regulando la concentración de calcio intracelular. Se usa actualmente en muchas dermatosis por ejemplo: psoriasis, vitiligo, morfea, pitiriasis rubra pilaris, ictiosis y queratodermias palmoplantares (68).

1.5.1.4. Pseudocatalasa

En pacientes con vitiligo se han descrito niveles bajos de catalasa, una enzima que se encuentra normalmente en la piel y que disminuye el daño producido por los radicales libres. La base para el uso de este agente en el tratamiento del vitiligo es la evidencia de estrés oxidativo y los altos niveles de H₂O₂ en la piel lesionada. La terapia de reemplazo usando un análogo de la catalasa humana normal, pseudocatalasa, en combinación con la fototerapia UVB-nb se ha informado que produce la repigmentación en algunos pacientes con vitiligo además de prevenir la progresión de la enfermedad (10, 27).

1.5.1.5. 5-fluorouracilo tópico

El 5-fluorouracilo (5-FU) tópico se supone que induce la repigmentación de las lesiones de pacientes con vitiligo mediante la sobre-estimulación de los melanocitos foliculares que migran a la epidermis durante la epitelización. Esta forma de terapia tópica puede ser combinada con la dermoabrasión de las lesiones de vitiligo para mejorar la respuesta de repigmentación (27, 69, 70).

1.5.2. Mecanismos de repigmentación con tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico se divide en:

a) Técnicas sin cultivo de células y b) técnicas con cultivos de células (71).

La terapia quirúrgica que implica el trasplante de melanocitos obtenidos a partir de piel con pigmentación normal o melanocitos crecidos en cultivo ha sido apropiado para el tratamiento de ciertos

vitiligos focales. Los melanocitos trasplantados tiene la habilidad de migrar al estar en contacto con la capa basal de la epidermis en el área receptora, lo cual se lleva a cabo en 7 a 8 días. Sin embargo, el tipo de repigmentación que se produce es del tipo difuso. En series de pacientes tratados a largo plazo se observó que los pacientes con vitiligo diseminado presentaron una repigmentación incompleta con cualquiera de las modalidades quirúrgicas (72). Además con este tipo de tratamiento se puede presentar una hiperpigmentación inicial por la estimulación de los melanocitos y, en algunos casos cuando se presenta hipopigmentación es por la reactivación de la enfermedad.

Numerosas técnicas quirúrgicas se han demostrado como exitosas en el tratamiento del vitiligo, siendo utilizadas principalmente en vitiligo estable; en ocasiones se puede inducir repigmentación con una simple dermoabrasión (73), por la estimulación mecánica que aumenta las citocinas y a su vez estimulan a los melanocitos a producir melanina.

Por otra parte, las técnicas que emplean implante de las células para el tratamiento de esta enfermedad pueden ser por medio de una dermoabrasión (63, 74), mediante el empleo de ampollas formadas por succión en zonas pigmentadas y no pigmentadas con el consiguiente injerto de la piel pigmentada en el área a pigmentar (75), utilizando ampollas formadas con nitrógeno líquido (75) o en áreas de difícil acceso se puede utilizar láser de dióxido de carbono o *Erbium: YAG* (76). El trasplante de melanocitos puede ser utilizado para diferentes trastornos de la pigmentación cutánea, tales como: leucoderma química o mecánica, piebaldismo (77) y vitiligo (78).

1.5.2.1. Técnica sin cultivo de células

I. *Transplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión:*

Esta técnica fue descrita por primera vez por Gauthier Y y Surleve-Bazeille JE (1992) (79). La suspensión de células epidérmicas se obtiene de una muestra de piel de espesor parcial, la cual se disgrega con solución de tripsina al 0.25%, posterior a la digestión enzimática se separan las células formando una suspensión que posteriormente se implanta por medio de una dermoabrasión en las máculas acrómicas (80, 81). Este método es muy utilizado por lo rápido del procedimiento y provee una repigmentación uniforme en más del 50% de los casos (81). La eficacia de esta técnica fue demostrada por Mulekar SV (2005) (fig. 3), quien obtuvo un alto porcentaje de repigmentación en vitiligo unilateral tratado con melanocitos-queratinocitos en suspensión (63).

II. *Mini injertos:* Es un procedimiento sencillo con un manejo ambulatorio y económico, sin embargo sus principales desventajas son la producción de cicatrices en empedrado y además se deben realizar múltiples biopsias (74). Con éste procedimiento se obtienen excelentes resultados en palmas y plantas (75).



Figura 3. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente de 13 años tratado con trasplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión. Tomada de Mulekar SV (2003)(81). (A) Antes de tratamiento. (B) Después de un año de tratamiento.

Inicialmente en este procedimiento es necesario realizar, en la zona en la cual se van a trasplantar los mini-injertos, una prueba mediante la cual son implantados unos pocos fragmentos de entre 1 a 3 mm de diámetro (aproximadamente 1.5 mm), y que estos sean capaces de generar una repigmentación de 3 a 5 mm alrededor del implante en un periodo de 3 a 4 meses, indicando de esta forma la potencialidad de éxito con este procedimiento.

Una vez que haya generado el halo de repigmentación y se ha demostrado la capacidad de repigmentar la zona leucodérmica, se prepara la zona receptora mediante la perforación de pequeños orificios con el mismo instrumento con el que serán extraídos los injertos del área donante, los cuales serán los receptores de los mini-injertos (fig. 4). Estas perforaciones son efectuadas a aproximadamente 3 o 4 mm de distancia entre sí,

para que la generación del nuevo pigmento alrededor de los implantes produzca por coalescencia la repigmentación total del área tratada (82, 83).



Figura 4. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente sometido a mini injertos de piel. Iconografías de paciente femenino tratada en el Servicio d Dermatología, Hospital Universitario, UANL. (A) Prueba de mini injertos. (B) Repigmentación observada después de 9 meses. (C) Repigmentación observada después de 1 año de tratamiento.

III. ***Injertos epidérmicos por medio de ampollas:*** Este es el tratamiento de elección en lesiones localizadas o en áreas de difícil pigmentación, es un método indoloro y con excelentes resultados (80). Se basa en la formación de ampollas por medio de presión negativa tanto en las áreas pigmentadas como despigmentadas, seguida por la eliminación del techo de dichas ampollas y la colocación de la superficie pigmentada en las máculas a pigmentar. Sus ventajas son: ser un injerto epidérmico, tener excelentes resultados cosméticos, el sitio donador sana sin cicatriz o despigmentación y por tanto puede volver a ser utilizado. Sus desventajas son: que tarda tiempo en repigmentar, las muestras son difíciles de manejar y que sólo se produce una repigmentación localizada exclusivamente al área del implante.

IV. ***Injertos de piel de espesor parcial:*** Este se utiliza en superficies muy extensas. Sus ventajas son que es el mejor método para cubrir múltiples lesiones en un solo tiempo quirúrgico y sus desventajas son que se requiere de entrenamiento especial para la obtención del injerto y no es posible cubrir áreas como las palmas y plantas, además de que pueden presentarse cicatrices en empedrado y el periodo de recuperación es prolongado. (84)

V. ***Técnicas combinadas:*** Estas técnicas han sido utilizada como tratamiento de pacientes con vitiligo estable de manera individual o en conjunto con trasplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión, para determinar su eficiencia en la inducción de la repigmentación, observándose una ligera eficacia en la técnica combinada (fig. 5). (70)

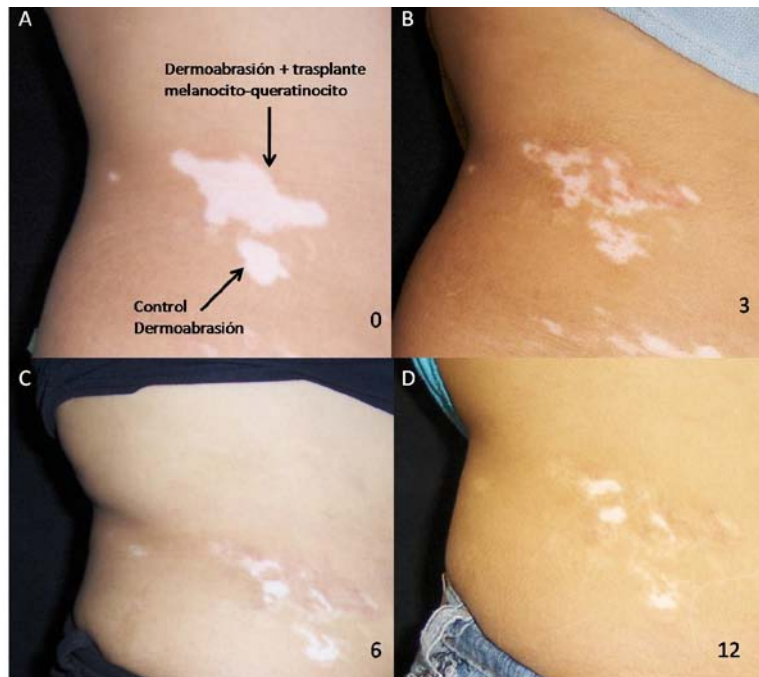


Figura 5. Ejemplo de repigmentación experimentado por un paciente sometido a dermoabrasión y dermoabrasión mas trasplante melanocito-queratinocito. (A) Antes de tratamiento. (B) Después de 3 meses. (C) Después de 6 meses. (D) Después de un año de tratamiento. Modificado de Vázquez-Marínez OT *et al.*, (2011). (70)

1.5.2.2. Técnica con cultivo de células

I. **Trasplante de melanocitos cultivados:** Es un método en el cual los melanocitos obtenidos de una superficie pigmentada del cuerpo, se cultivan en el laboratorio con el posterior trasplante a áreas desprovistas de los mismos. Sus principales ventajas son que sólo se requiere una pequeña muestra de piel pigmentada, que puede ser procesada o se puede guardar congelada para futuros trasplantes (74), la que es útil para cubrir grandes áreas con excelentes resultados tanto en color como en textura de la piel (80). Sus limitaciones son que requiere de un periodo de 10 días a 8 semanas para el proceso

completo del trasplante (84), además de producir en algunos casos reacciones inmunológicas debido a los medios de cultivo de laboratorio utilizados en el mantenimiento de los melanocitos; se requiere personal médico, técnico y de enfermería capacitado en trasplante de células, tiene un costo elevado por los materiales y reactivos utilizados y puede presentar una ligera hiperpigmentación en las primeras semanas (80). Se han publicado mejores resultados en áreas como la cabeza, cuello o tronco con repigmentación hasta de un 96% de la lesión, sin embargo, existen áreas como manos, pies, región perioral y periocular en las que se ha descrito menor porcentaje de repigmentación (85).

II. ***Transplante de melanocitos-queratinocitos cultivados:*** Esta técnica permite el cultivo de la unidad melanocito-queratinocito, el cual puede ser cultivado en membranas de ácido hialurónico u otras sustancias, el queratinocito regula el crecimiento y diferenciación del melanocito, permite una mayor cantidad de auto injertos y no existe el riesgo teórico de carcinogénesis (77). El resto de la técnica es el mismo que el utilizado para el cultivo de melanocitos.

Las técnicas para el implante de las células pueden ser: i) por medio de una dermoabrasión (63, 74), ii) por ampollas formadas por succión (75, 80), iii) por ampollas formadas con nitrógeno líquido (75) y iv) láser de dióxido de carbono o *Erbium :YAG* (76).

Para cada tipo de terapia han sido publicadas tanto sus ventajas así como también sus desventajas y la buena o pobre respuesta de los pacientes (2, 7, 86, 87). En algunos casos, el tratamiento óptimo

del paciente requiere la combinación de las terapias antes mencionadas, por ejemplo la combinación de tratamiento mediante UVB y el empleo de esteroides o inmunomoduladores tópicos, con lo que se observa mejores resultados. Como resultado de la terapia se han observado resultados variados tales como repigmentación completa, manchas de pigmentación y, en cierto porcentaje de los pacientes, fracaso de repigmentación. En casos extremos, en aquellos pacientes que presentan más de un 80% de la piel afectada, se ha empleado la despigmentación como terapia, utilizando éter monobencílico de hidroquinona al 20%, ya que se obtienen mejores resultados que el tratar de repigmentarlos (62). En la tabla 3 se presenta un resumen de las diferentes técnicas utilizadas en el tratamiento de vitiligo, sus ventajas y desventajas.

Tabla 3: Alternativas terapéuticas utilizadas en el tratamiento de Vitiligo.

Tratamiento	Tipo	Ventajas	Desventajas
No quirúrgico	Fototerapia	Buena eficacia del tratamiento, seguro en niños y mujeres embarazadas.	Tiempo prolongado de tratamiento. Entema, quemadura y prurito.
	Immunomoduladores	Eficaz en tratamientos de áreas limitadas del cuerpo	Efectos a diversos en niños.
	Análogos tópicos de la vitamina D	Estimula pigmentación, proliferación de melanocitos y controla respuesta inmune.	No se debe usar en pacientes con riesgo de hipercalcemia, en cuero cabelludo, en psoriasis pustulosa o eritodérmica.
	Pseudocatalasa	Previene la progresión de la enfermedad	No se han observado efectos secundarios, sólo oscurecimiento momentáneo de la piel y aumento de sudoración.
Quirúrgico sin cultivo de células	5-fluorouracilo tópico	Buena repigmentación en pacientes previa dermoabrasion	Enrojecimiento, quemazón, dolor, molestias locales y formación de costras en la zona donde se aplica. Fotosensibilidad.
	Trasplante de melanocitos-queratinocitos en suspensión.	Técnica de injerto simple, que permite tratar amplias áreas con una pequeña muestra de piel pigmentada.	Complejidad en procedimiento de obtención de células a injertar y elevados costos.
	Mini injertos	Procedimiento sencillo con un manejo ambulatorio y económico.	Formación de cicatrices.
	Injertos epidérmicos por medio de ampollas	Método indoloro y con excelentes resultados en lesiones localizadas o en áreas de difícil pigmentación.	Método tardado, las muestras son difíciles de manejar, sólo se produce una repigmentación localizada exclusivamente al área del implante.
	Injertos de piel de espesor parcial	Mejor método para cubrir múltiples lesiones en un solo tiempo quirúrgico.	Pueden presentarse cicatrices en empedrado, largo periodo de recuperación, necesidad de utilizar anestesia general e internamiento.
	Quirúrgico con cultivo de células	Trasplante de melanocitos cultivados	útil para cubrir grandes áreas con excelentes resultados tanto en color como en textura de la piel
Trasplante de melanocitos-queratinocitos cultivados		Permite una mayor cantidad de autoinjertos y no existe el riesgo teórico de carcinogénesis.	Complejidad en procedimiento de obtención de células a injertar y elevados costos.

1.6. Perfiles de expresión génica y su utilidad en el diagnóstico en el vitiligo

En la actualidad es creciente el conocimiento sobre los genes y las rutas de señalización potencialmente involucradas en el desarrollo del vitiligo (32-35, 88), sin embargo no ha sido explorada su utilidad en la clasificación, la relación que tienen con la manifestación clínicas y en la respuesta a tratamiento observada en los pacientes.

La elevada prevalencia de vitiligo en México (ocupando entre el 3er y 5º lugar de las dermatopatías) (89) y la falta de sustento de las bases moleculares de los mecanismos involucrados en su desarrollo, apoyan la necesidad de la caracterización de los patrones de expresión de genes antes y después a la realización del tratamiento de esta patología.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha se han enfocado en estudiar la importancia del melanocito como productor de pigmento y describir cómo las alteraciones en el mismo tienen como consecuencia el desarrollo del vitiligo. Sin embargo en su mayoría estos han sido realizados a través de métodos de cultivo celular, lo que puede alterar los patrones de expresión reales de la célula, en comparación con los presentes en su tejido de origen. Además es importante estudiar como un todo el papel de los diferentes tipos celulares presentes en la piel en el proceso de pigmentación, principalmente queratinocitos y melanocitos, debido a que ambas células forman parte de la misma unidad funcional y estructural de la epidermis, y es éste quien participa activamente en

el mantenimiento del microambiente de la piel tanto en la lesión, como en el tejido “sano adyacente”.

Además aún no ha sido explorada la existencia de cambios en los patrones de expresión del tejido afectado por vitiligo como consecuencia del tratamiento UVB-nb aplicado para esta enfermedad.

La información obtenida podría dar luz acerca de las vías bioquímicas y moleculares que se activan o reprimen en los diferentes tipos celulares y que finalmente dan lugar a la lesión característica del vitiligo pudiendo ser de utilidad en la caracterización de tipos de vitiligo vulgar de acuerdo a su actividad. Dependiendo de este resultado se podrían tomar decisiones en el tratamiento de esta patología, con la finalidad de disminuir el número de fracasos observadas durante los procedimientos de repigmentación.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de trabajo:

Existe una correlación directa entre los parámetros clínicos, bioquímicos y patrones de expresión de genes candidatos y la respuesta al tratamiento con fototerapia UVB-nb en pacientes con vitiligo.

Por ello nos proponemos los siguientes objetivos:

2.2. Objetivo principal:

Identificar marcadores clínicos, bioquímicos y cambios en patrones de expresión de genes con utilidad pronóstica en la piel de pacientes con vitiligo antes y después de ser sometidos a tratamiento con fototerapia UVB-nb.

2.3. Objetivos concretos:

1. Realizar un examen médico completo a cada paciente.
2. Clasificar los pacientes según las manifestaciones clínicas del vitiligo, grupos de edad, antecedentes personales y familiares de vitiligo y otras enfermedades, evolución y estado actual del padecimiento..
3. Determinar el perfil bioquímico, pruebas de función hepática y tiroidea de cada paciente.
4. Analizar el perfil de expresión de un grupo de genes participantes en las vías de apoptosis, inductora de pigmentación, respuesta al estrés oxidativo, señalización celular, sobrevivencia y

proliferación celular antes y después de tratamiento UVB-nb para identificar los genes y las rutas que se ven implicadas en el desarrollo del vitiligo.

5. Analizar los perfiles de expresión de las muestras de ARN obtenidas de las biopsias de piel, antes de tratamiento, para identificar su utilidad predictiva en la respuesta a la terapia UVB-nb.

6. Comparar la respuesta experimentada por cada paciente a la terapia con Luz UVB-nb, con los parámetros clínicos, bioquímicos y de expresión de la piel.

7. Evaluar y comparar los datos clínicos, antecedentes heredofamiliares, respuesta a tratamiento y resultados moleculares obtenidos con la finalidad de seleccionar un panel de marcadores moleculares con utilidad pronóstica.

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Diseño metodológico

Ensayo clínico randomizado a doble ciego, es decir, estudio epidemiológico, de tipo prospectivo, experimental, longitudinal, ciego con respecto al evaluador y asignador de los pacientes a los grupos.

3.1.1. Cálculo del tamaño muestral

Fueron incluidos un total de 45 pacientes, evaluados en dos grupos: 23 pacientes con vitiligo vulgar Activo y 22 pacientes con vitiligo vulgar estable, actuando cada paciente como su propio control: piel sana comparada con la piel enferma de cada paciente antes y después de tratamiento. Para un total de 90 muestras de piel basales y 90 muestras al finalizar el estudio.

Este cálculo de número de muestras está basado en el estudio realizado previamente por Kingo K *et al* (2007) (32), del cual se extrajeron los siguientes valores: probabilidad de error alfa= 0.05, desviación estándar=0.002, Media/Medias= 0.008 y delta=0.10, a partir del cual se obtiene una “n” de 19 pacientes totales como mínimo para realizar este estudio.

3.1.2. Ámbito del estudio y pacientes

Se incluyeron 45 pacientes reclutados por el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José E. González” (HUJEG), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México, que padecían vitiligo generalizado, definido por una afección mayor del 10% y menor al 80% de la superficie corporal, candidatos a tratamiento con fototerapia UVB-nb.

3.1.2.1. Información recolectada

A cada paciente que decidió participar del protocolo de investigación se le solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo 1), y se le realizó una entrevista y evaluación clínica por médicos dermatólogos o residentes en dermatología para confirmar el diagnóstico de vitiligo. También se les realizó una encuesta que incluyó una batería de preguntas en las cuales se le solicita información demográfica, datos personales, nacionalidad tanto del candidato como de sus padres y abuelos, antecedentes de la enfermedad (edad de aparición de la primera mácula, número y distribución de lesiones, causas atribuibles), si ha recibido algún tratamiento previo de sus lesiones y el tipo de respuesta que fue observado, historia familiar de la enfermedad, asociación con otras enfermedades de naturaleza autoinmune, si ha estado sometido a situaciones estresantes o si ha sufrido algún trastorno psicológico, y medidas de su talla y peso (Anexo 2).

Este estudio y su hoja de consentimiento informado contó con la aprobación del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y HUIJEG, UANL, con No de registro DE13-001.

3.1.2.2. Obtención de muestras biológicas y pruebas de laboratorio

Previo a su incorporación en el protocolo a cada paciente se le realizó toma de muestras de sangre para efectuar exámenes de laboratorio: biometría hemática (BH), química sanguínea (QS), análisis de función hepática (PFHS), anticuerpos antinucleares (ANA's) y perfil tiroideo, en Laboratorio Central y el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario UANL.

A cada sujeto le fueron tomadas biopsias de piel de áreas pigmentadas y provenientes de la lesión con punch de 4mm.

Los pacientes enrolados en el estudio recibieron tratamiento con fototerapia UVB-nb.

3.1.2.3. Criterios de selección

I. Criterios de inclusión

1. Hombres y mujeres no embarazadas mayores de 18 años de edad, con fototipos II al V inclusive de la clasificación de *Fitzpatrick* que acepten participar en la investigación.
2. Deben firmar su consentimiento informado escrito.
3. Sujetos con vitiligo vulgar estable o inestable, que afecte un área mayor al 10% de la superficie corporal.
4. Pacientes que no hayan recibido tratamiento en los últimos 6 meses con esteroides sistémicos y/o tópicos, inhibidores de la calcineurina, fototerapia, psoralenos sistémicos y/o tópicos, antioxidantes o medicamentos inmunomoduladores como azatioprina, metotrexate, ciclosporina.
5. Que tenga disposición y posibilidad por parte del paciente para llevar a cabo el tratamiento.
6. Que no estén participando en otro protocolo de investigación en el que sean suministrados fármacos de naturaleza esteroidea o en fase de ensayo.

II. Criterios de exclusión

1. Sujetos con vitiligo localizado y/o universal definidos como <10% y > 80% de la superficie corporal afectada respectivamente.
2. Sujetos con vitiligo segmentario.
3. Que no acepte participar en el protocolo de investigación o que no firme el consentimiento informado escrito.
4. Pacientes que hayan recibido tratamiento convencional para vitiligo ya sea mediante esteroides tópicos o sistémicos, inhibidores de la calcineurina tópicos, fototerapia UVA o UVB, antioxidantes y/o que hayan recibido o estén recibiendo tratamientos que influyan sobre el sistema inmune como ciclosporina, azatioprina, biológicos, metotrexate, etc. en los últimos 6 meses.
5. Pacientes que presenten infección o herida en la zona a tratar.
6. Cualquier enfermedad sistémica grave o mal controlada.
7. Pacientes con todo tipo de cáncer de piel o con antecedente personal de estos.
8. Pacientes que tengan antecedente de fotosensibilidad, enfermedades fotosensibles o que estén en tratamiento con algún medicamento que produzca fotosensibilidad.
9. Mujeres embarazadas o lactando.
10. Pacientes con enfermedades psiquiátricas.
11. Pacientes con enfermedades autoinmunes fotosensibles con manifestaciones clínicas.
12. Pacientes que no puedan tener un seguimiento adecuado.

13. Pacientes menores de 18 años de edad.
14. Que esté participando en otro protocolo de investigación en el que sean suministrados fármacos de naturaleza esteroidal o en fase de prueba.

III. Criterios de eliminación

1. No apego al protocolo de investigación.
2. Pacientes que presenten expediente clínico incompleto.
3. Que se apliquen otro producto farmacológico no autorizado por el responsable de la investigación.
4. Embarazo durante el tratamiento.
5. Indicación de algún otro medicamento tomado como corticoesteroides o inmunosupresores a lo largo del tratamiento / seguimiento.
6. Pacientes que presenten algún evento secundario o adverso serio durante el periodo de investigación o cuyas muestras biológicas presentaron mala calidad o fueron insuficientes para realizar los análisis incluidos en el estudio.
7. Si retiraron el consentimiento informado.

3.2. Características de las biopsias.

A cada paciente se le realizó toma de biopsia con sacabocados de 4mm antes del tratamiento, en la piel despigmentada proveniente de la lesión de vitiligo y una biopsia en piel pigmentada. Al finalizar los respectivos tratamientos, fue tomada una nueva biopsia de control en las mismas áreas: una en la piel lesionada ya tratada, y una en la piel pigmentada con un mínimo de 5cm de distancia de la piel lesionada. En total se tomaron 4 biopsias en sacabocado en cada paciente.

Las biopsias fueron almacenadas a -80°C previa inmersión durante 12 horas en RNAlater, como medio de preservación, estabilización y protección de ARN.

3.3. Tratamiento con fototerapia.

El tratamiento aplicado a cada paciente correspondió a fototerapia UVB-nb (fig. 6), realizado en sesiones de 2 veces por semana por un periodo de 6 meses (para un total de 48 sesiones), iniciando con una dosis de $150 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ con incrementos desde $50 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ cada tercer sesión, dependiendo del fototipo presentado por el paciente hasta lograr la dosis mínima de eritema asintomática, y se mantuvo la dosis una vez obtenida la respuesta clínica. En caso de que el paciente presentara alguna reacción, se disminuyó a la dosis previa tolerada.



Figura 6. Fotografías de Fototerapia UVB-nb. (A) Cámara de fototerapia UVB-nb. (B) Representación de tratamiento con fototerapia UVB-nb.

El seguimiento fue realizado a través de iconografías basales y a los 1, 3 y 6 meses de iniciado el tratamiento. Los resultados

clínicos (cambios de repigmentación) fueron evaluados por 2 investigadores independientes y a doble ciego, de los resultados de expresión de las muestras de piel.

La iconografía fue realizada con una cámara fotográfica *Sony Exmor DSC-HX1* de 9.1 megapíxeles.

3.4. Procesamiento de biopsias en laboratorios

3.4.1. Extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos

A partir de las biopsias de piel almacenadas con RNAlater, se realizó la extracción de RNA en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación (UBMGyS), CIDICS UANL, utilizando *RNAeasy Mini Kit* (QIAGEN) de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante, previa disrupción del tejido con Stainless Steel Beads de 5mm y *TissueLyser* (QIAGEN) utilizando 2 ciclos de 2 min. a 20 Hz y tratamiento con proteinasa K por 10 minutos a 55°C (fig. 7). Este procedimiento permitió obtener ARN de excelente calidad a partir de muestras pequeñas de tejido fibroso, el cual fue almacenado a -80°C hasta el momento de ser utilizado.

3.4.2. Verificación de la Calidad del ARN

La calidad y cantidad del ARN fue determinada mediante electroforesis capilar utilizando *Experion Automated Electrophoresis System* (Bio-Rad) a través de la determinación de la relación de las subunidades ribosomales 18S a 28S, con la finalidad de determinar el nivel de degradación existente en las muestras observadas en el gel de electroforesis generado a partir de este análisis. La cantidad de ARN obtenida fue confirmada mediante cuantificación espectrofotométrica en microvolumen realizada en el equipo *Nanodrop* (*Nanodrop Technologies*,

Thermo Scientific), utilizando 1 μ L de ARN total de muestra y cuantificando a una absorbancia de 260 nm, y evaluada su pureza mediante determinación de la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm, para descartar contaminación por proteínas o reactivos de extracción de ácidos nucleicos.

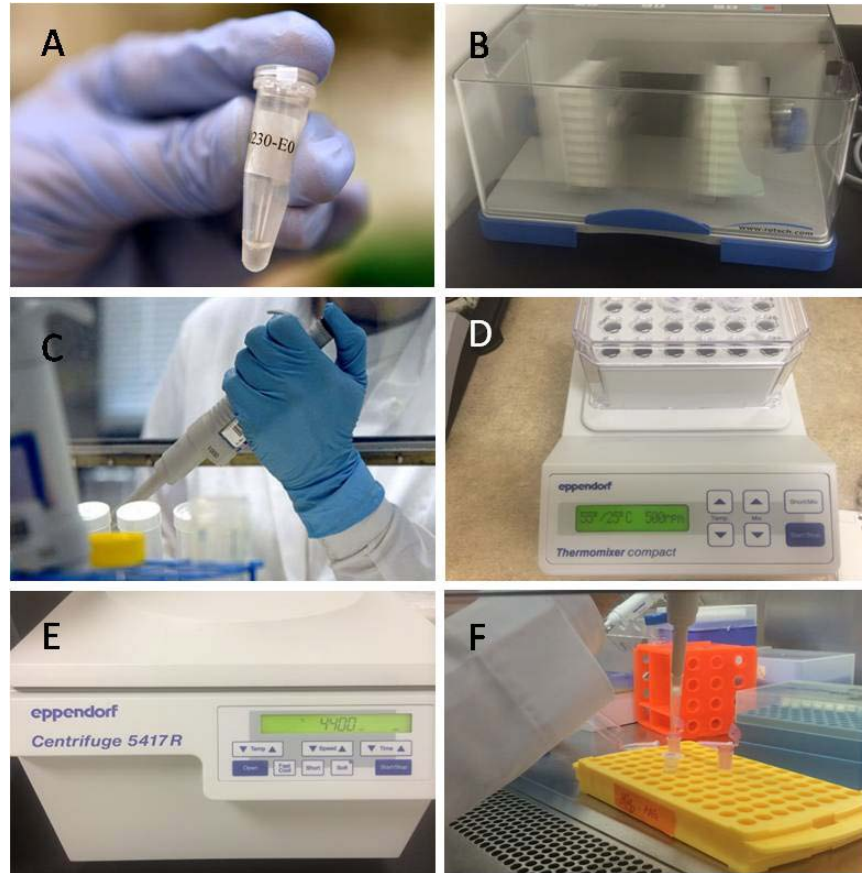


Figura 7. Procedimiento de extracción de ARN total a partir de una biopsia de piel. (A) Muestra de piel sacabocado #4. (B) Se agrega 1 perla de acero y el tejido es disgregado utilizando *Tissuelyser*. (C) Se agrega agua *RNasa-free* al lisado para ajustar el volumen y proceder con la eliminación de proteínas. (D) Incubación de la muestra homogenizada a 55 Celsius por 10 minutos con proteinasa K. (E) Pasar la muestra tratada a columna y realizar centrifugaciones sucesivas por 3 minutos a 10,000xg; adición de soluciones siguiendo protocolo QIAGEN. (F) Limpieza del lisado con etanol 96%, y transferencia de la columna a un tubo colector; elución final de ARN con agua libre de nucleasas

El resultado obtenido fue corroborado mediante Ensayo Fluorométrico para ARN de amplio rango *Qubit* (ThermoFisher), que permitió determinar la concentración real final antes de proceder con la secuenciación de ARNm.

Para realizar la verificación de la calidad del ARN mediante Experion inicialmente son mezclados los reactivos para preparar la matriz de gel necesaria para realizar la electroforesis capilar. Los ARNs son descongelados y mantenidos a 4°C en hielo hasta el momento de prepararlos para la electroforesis. De manera breve el protocolo consiste de los siguientes pasos (fig. 8):

i.- Los reactivos son equilibrados a la temperatura de trabajo. Se coloca la escalera de ARN en hielo y los restantes reactivos a temperatura ambiente (~15 min). Posteriormente son mezclados por agitador *vortex* y luego centrifugados para colectar en el fondo del tubo.

ii.- Se prepara el equipo limpiando los electrodos antes de emplearlos en la electroforesis; para ello se coloca en la estación de electroforesis el cartucho de limpieza de electrodos con 800 µl de solución de limpieza. Luego se cierra la tapa durante 2 minutos. Terminado este periodo de tiempo el cartucho de limpieza es retirado del equipo.

Se coloca un nuevo cartucho de limpieza con 800 µl de agua tratada con DEPC en la estación de electroforesis, se cierra la tapa por 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se sustituyó el agua en el cartucho de limpieza y se repite nuevamente este proceso.

Se retira el cartucho de limpieza y se abre la tapa de la estación de electroforesis durante 60 segundos para permitir que los electrodos se sequen completamente.

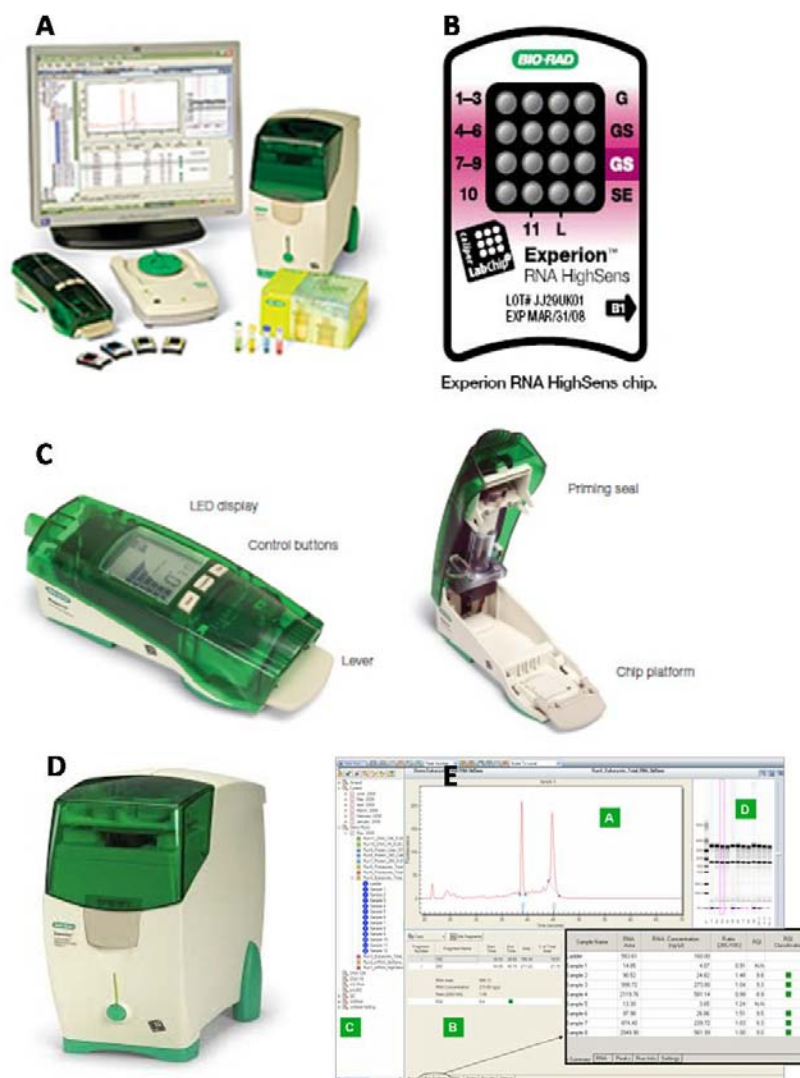


Figura 8. Flujo de trabajo para verificación calidad ARN. (A) Estación de trabajo *Experion BioRad*. (B) Cartucho para impresión de gel de electroforesis de ARN. (C) Equipo que permite imprimir el gel y distribuirlo homogéneamente en el cartucho, mediante presión. (D) El cartucho impreso y sobre el cual son adicionadas las muestras es transferido a *Experion* para realizar la electroforesis. (E) Terminada la electroforesis los datos son interpretados y analizados para determinar calidad y concentración del ARN mediante programa informático de *BioRad*.

iii.- Preparación del gel y solución de tinción. Son filtrados mediante centrifugación en columna 600 μ l de gel de electroforesis para ARN a 1500x g por 10 min. Posteriormente se utiliza 65 μ l de gel filtrado y se agrega 1 μ l de tinción de ARN. que permite detectar este tipo de ácido nucleico en la muestra de interés.

iv.- Posteriormente se preparan las muestras de ARN y la escalera de peso molecular de ARN. Para ello se toma con micropipeta al menos 2 μ l de escalera de peso molecular de ARN y 2 μ l de cada muestra de ARN, y son colocados cada uno en microtubos libres de RNasas. Las muestras y la escalera se desnaturalizan durante 2 min a 70°C. Inmediatamente transcurrido este periodo de tiempo las muestras y la escalera son colocadas en hielo durante 5 min.

Brevemente las muestras son llevadas al parte inferior de los tubos mediante centrifugación y mezcladas. Luego de esto, las muestras fueron almacenadas en hielo hasta el momento de realizar la electroforesis.

v.- Para la preparación de los cartuchos de electroforesis y carga de muestras, un cartucho *ARN StdSens* es colocado en la plataforma de la estación de preparación de *Experion*. Posteriormente se agregaron 9 μ l de mezcla de gel-solución de tinción en el pozo de carga y es introducida en el cartucho mediante presión durante 1 minuto, siguiendo las instrucciones del fabricante. Enseguida se carga 1 μ l de las muestras previamente desnaturalizada en cada uno de los 12 pozos de muestra y 1 μ l escalera de ARN en el cartucho. Finalmente se coloca el cartucho en la estación de mezcla del *Experion* y mezcla durante 1 min, procurando iniciar la corrida en la estación de electroforesis de *Experion* dentro de los 5 minutos posteriores a la carga.

vi.- Para la lectura y análisis de las muestras de ARN se inicia la corrida en la estación de electroforesis de Experion y el programa de análisis, se coloca el cartucho en la plataforma de la estación de electroforesis. Se selecciona corrida y ensayo *Experion RNA StdSens RNA total Eukariota*. Finalmente se inicia la electroforesis. Terminado el proceso se elimina el cartucho.

Una vez terminado el proceso se toma nota de la claridad de las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S en el electroferograma, así como los valores de la relación 28S/18S y de integridad (RQI) (fig. 9).

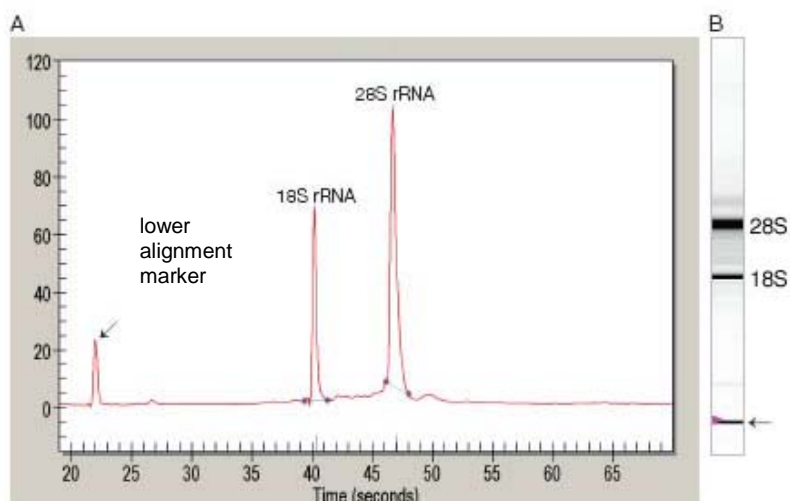


Figura 9. Electroferograma de ARN total de una muestra. (A) En la figura se representa la posición relativa del marcador de alineamiento (*lower alignment marker*), 18S ARNr, y 28S ARNr. (B) Gel de electroforesis virtual de un ARN de buena calidad.

3.4.3. Análisis de expresión en biopsias de piel mediante secuenciación *TruSeq* de *Illumina*

Las muestras de ARNm obtenidas de las biopsias de piel de los pacientes con diagnóstico de vitiligo vulgar antes y después del tratamiento, fueron sometidas a “Análisis de Expresión por Secuenciación Masiva de ARN *TruSeq*®” de la compañía

Illumina, proceso realizado en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación (UBMGyS), CIDICS UANL.

Para realizar este ensayo, a partir del ARN total extraído de las biopsias de los pacientes, se realizó la transcripción inversa del ARN, antes de proceder con el análisis de expresión. (fig. 10)

3.4.3.1. Transcripción inversa de ARN y generación de librería para secuenciación

Para realizar este proceso, a partir del 100 µg de ARN total tratado con DNasas extraído de las biopsias de los pacientes, se realizó una reacción de transcripción inversa utilizando el la transcriptasa reversa *ProtoScript*® (New England Biolabs), siguiendo las indicaciones del fabricante y lo establecido en el protocolo *TruSeq* de *Illumina* para secuenciación masiva. (fig. 10)

El ADNc generado es posteriormente utilizado para generar las librerías de fragmentos de PCR que son secuenciadas, siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera resumida, son ligados fragmentos de ácidos nucleicos adaptadores en los extremos del ADNc obtenido y posteriormente amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes de interés seleccionados. Los productos de PCR obtenidos para cada muestra son purificados, combinados y finalmente diluidos para introducir en el cartucho de secuenciación *Illumina (Flow Cell)*.

3.4.3.2. Análisis de expresión de genes

Los productos de PCR obtenidos de los ADNc de cada una de las biopsias de piel de los pacientes, antes y después del tratamiento, fueron utilizadas para realizar el análisis de expresión de un grupo de 29 genes involucrados en rutas de apoptosis, inductora de

pigmentación, respuesta al estrés oxidativo, señalización celular, sobrevida y proliferación celular, utilizando la metodología de análisis de expresión por secuenciación dirigida de ARN mediante *TruSeq* de la compañía Illumina, cubriendo con este diseño el análisis de expresión de genes clave involucrados en el proceso de pigmentación y homeostasis de las células de la piel (tabla 4).

Por otra parte, fueron incluidos 2 genes endógenos con expresión constitutiva empleados como referencia para la normalización de los patrones de expresión.

3.4.4. Análisis de resultados de expresión *TruSeq* de *Illumina*

Para verificar la calidad de los resultados de secuenciación masiva, se analizaron los datos obtenidos del secuenciador en formato *Fasta* mediante las herramientas de análisis llamadas *FastQC* y *FastQC Tools*, que permiten eliminar las secuencias de los adaptadores y oligonucleótidos necesarios para realizar el proceso de secuenciación, además de filtrar las secuencias obtenidas y de esta forma proceder solamente con los resultados de mayor calidad. A continuación, el análisis bioinformático y la validación estadística de los resultados se realizó utilizando distintas herramientas y programas con algoritmos ampliamente reconocidos en la comunidad científica, que tienen la ventaja de ser de libre distribución y se encuentran disponibles en el sitio *BaseSpace* de la compañía *Illumina*. Se utilizó la aplicación *TruSeq Targeted Expression* para contrastar los resultados y verificar su certeza en comparación con los resultados obtenidos por las herramientas *TopHat* para realizar los alineamientos usando como referencia la secuencia consenso obtenida en el proyecto *1000 Genomes* y el programa *Cufflinks*, utilizado para realizar el

cálculo de la expresión diferencial de los distintos ARNm bajo estudio.

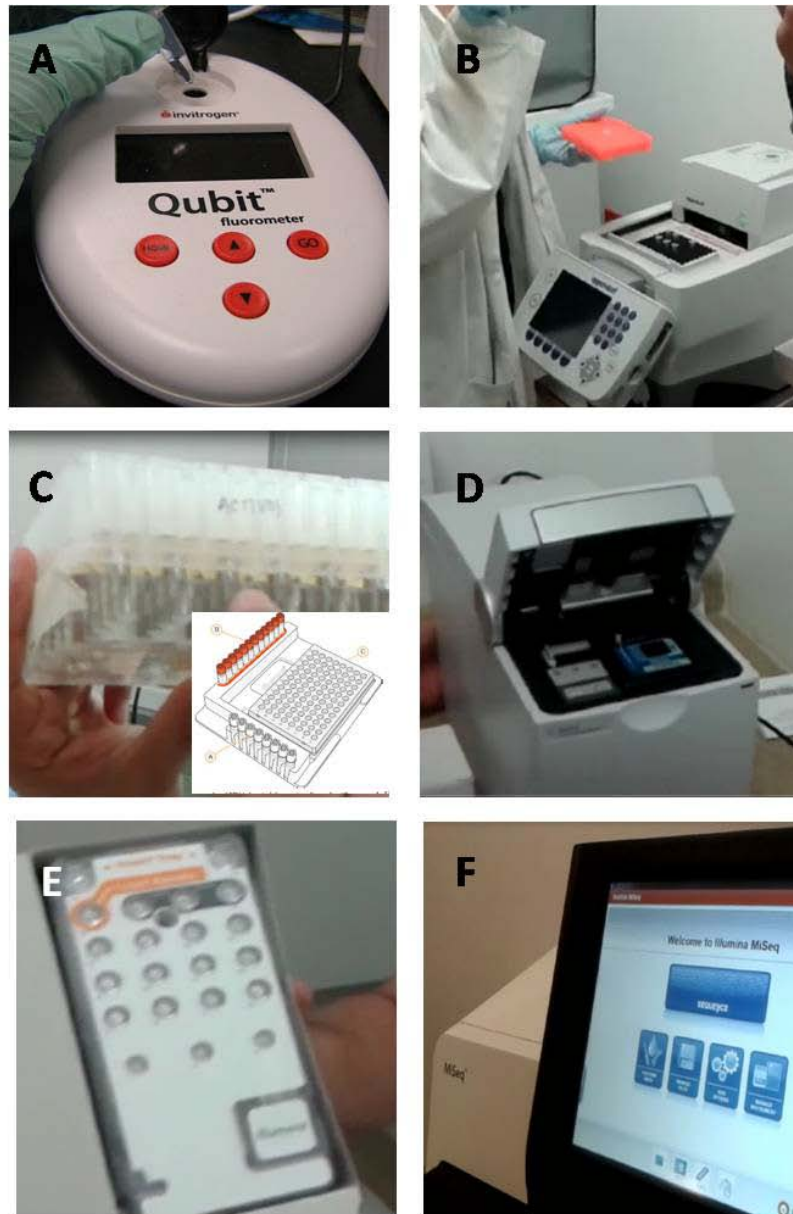


Figura 10. Flujo de trabajo para análisis de expresión por secuenciación *TruSeq* de *Illumina*. (A) Cuantificación de muestras por método fluorométrico y dilución a 100 μg / 5 μl . (B) Síntesis de ADNC a partir d ARN utilizando. (C) *Hibridize Oligo Pool, Wash, Extend, and Ligate Bound Oligos, PCR Amplification*; (D) *PCR Clean Up* (E) Preparación y carga de cartucho de secuenciación (F) Secuenciación de ARN *TruSeq* en equipo *MiSeq Illumina*.

3.4.5. Generación de Mapas de Calor “Heat Map”

Utilizando el paquete *Bioconductor* de R los archivos *FASTQ* generados mediante la secuenciación de ARN *Illumina*, fueron alineados con el genoma de referencia, y se prepara una matriz de conteo que coincide con el número de lecturas RNA-seq / fragmentos dentro de cada gen para cada muestra. Se realiza un análisis exploratorio de datos para evaluar la calidad y explorar la relación entre las muestras, realizar el análisis de la expresión génica diferencial, visualmente explorar los resultados mediante mapas de calor.

3.4.6. Análisis estadístico

Fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17.0. Para los datos demográficos, así como para variables definitorias, tanto para el grupo de mediciones de piel lesionada (con máculas acrómicas), como para el grupo de piel sana (piel normal), se utilizó estadística descriptiva. Para contrastar la normalidad, se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. De acuerdo al tipo de distribución presentada por los grupos (normal o no normal), se realizaron comparaciones de 2 grupos utilizando t de student y U de Mann Whitney, respectivamente. Las comparaciones de 3 grupos fueron realizadas utilizando las pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) para las variables con distribución normal y la prueba de H Kruskal-Wallis para las variables con distribución no normal. Adicionalmente, se aplicaron pruebas Post-Hoc para la comparación entre grupos (Tukey y Bonferroni para varianzas iguales; Tamhane y Dunnett T3 para varianzas diferentes). Se determinó la asociación entre variables, utilizando prueba de chi-cuadrada (χ^2) y prueba exacta de Fisher. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

Tabla 4: Rutas y genes candidatos analizados por secuenciación de ARN *TruSeq*.

Ruta	Gen	Función
Pigmentación	DCT	Dopa Cromo Tautomerasa
	MC1R	Receptor 1 de melanocortina
	MC4R	Receptor 4 de melanocortinas
	POMC	Proiomelanocortina
	TYRP1	Proteína 1 relacionada a la tirosinasa
	MLANA	Formación de los melanosomas
	PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2, transporte de vesículas pigmento
Apoptosis	BAX	BCL2-associated X protein; promueve la sobrevida celular
	BCL2	Suprime muerte celular, inhibe función de Caspasas
	BCL3	Regulación de proliferación celular, contribuye a la regulación transcripcional de NFKB
	CASP3	Caspasa 3, cisteína peptidasa relacionada con apoptosis
	CASP7	Caspasa 7, cisteína peptidasa relacionada con apoptosis
	CASP8	Caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con apoptosis
	CASP10	Caspasa 10, cisteína peptidasa relacionada con apoptosis
	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6); Citocina que se une a TNFRSF6/FAS, receptor encargado de traducir la señal apoptótica en las células
	TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A; induce señal de muerte por caspasa 8	
Estrés oxidativo	GGT1	Contribuye a mantener el nivel de GSH intracelular. Es parte del mecanismo de defensa antioxidante celular
	CCBL2	Cysteine conjugate-beta lyase 2, regulación de estrés oxidativo
	GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, metabolismo redox
	TXN	Tioredoxina; inhibe estrés oxidativo y caspasa 3
Sobrevida de la célula	CAPN3	Sobrevida del melanocito; es controlado por MITF
	MITF	Sobrevida del melanocito, controla la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina
	CDC5L	Control del ciclo celular
	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1, proliferación celular, diferenciación celular
Traducción de señales	CSNK1G3	Participa en la señalización por vía Wnt.
	NFKB1	Factor nuclear Kappa, traducción de señal de diferentes procesos celulares.
	WNT7A	Participa en la señalización por vía Wnt.
Genes endógenos expresión constitutiva	TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1; Involved in calcium binding and microtubule stabilization. Endógeno, expresión constitutiva
	GAPDH	gliceraldehido-3-fosfate deshidrogenasa. Endógeno, expresión constitutiva

3.4.7. Variables

Definición operacional de las variables:

Tabla 5: Variables Socio demográficas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Edad	Años cumplidos al momento de la entrevista	Se interrogó al paciente la edad en años cumplidos al momento de la entrevista verificando fecha de nacimiento en cualquier documento oficial.	Cuantitativa discontinua, años
Peso	Es la masa corpora expresado en kilogramos	Medición en kilogramos, obtenido por medio de báscula electrónica	Cuantitativa continua, kilogramos
Género	Diferencia fenotípica y de conducta que distingue a los sujetos.	Se observaron las características físicas del sujeto.	Catagórica Nominal 1= Femenino 2= Masculino

Tabla 6: Antecedentes heredofamiliares

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Diabetes Mellitus	Presencia de diabetes en alguno de los familiares	Mediante encuesta se le pregunta a los sujetos de estudio, la presencia de DM en alguno de ellos.	Categórica Nominal 1= Si 2= No
Hipertensión	Presencia de hipertensión arterial en alguno de los familiares	Mediante encuesta se le pregunta a los sujetos de estudio, la presencia de hipertensión arterial en ellos.	Categórica Nominal 1= Si 2= No
Psoriasis	Presencia de psoriasis en alguno de los familiares	Mediante encuesta se le pregunta a los sujetos de estudio, la presencia de psoriasis en alguno de ellos.	Categórica Nominal 1= Si 2= No

Tabla 7a: Variables clínicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Actividad de vitiligo	Presencia de nuevas lesiones de vitiligo por periodo de tiempo	Mediante encuesta se le pregunta a los sujetos de estudio, la presencia de nuevas lesiones en un periodo de 6 meses (vitiligo activo), o ausencia de nuevas lesiones (vitiligo estable)	Categórica Nominal 1= Estable 2= Activo
Problemas tiroideos	Presencia de alteraciones a la tiroides	Mediante encuesta se le pregunta a los sujetos de estudio, la presencia de problemas a la tiroides y es confirmado mediante perfil tiroideo.	Categórica Nominal 1= Si 2= No
Edad de inicio del vitiligo	Años cumplidos al momento de la manifestación del vitiligo	Se interrogó al paciente la edad en años cumplidos al momento presentó el inicio del vitiligo.	Cuantitativa discontinua, años

Tabla 7b: Variables clínicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Respuesta a tratamiento UVB-nb	Porcentaje de repigmentación experimentada por la piel de paciente con vitiligo a tratamiento UVB-nb	Se realizó la evaluación clínica de repigmentación experimentada por los pacientes con vitiligo por dos dermatólogos, después de 6 meses de tratamiento UVB-nb, utilizando iconografías.	Categorica Nominal 1= Baja (menor al 10%) 2= Media (entre 10.1-29.9%) 3= Alta (más del 30%)

Tabla 8a: Variables bioquímicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Hemoglobina (Hb)	Cifras de hemoglobina sanguínea	Cifras de hemoglobina obtenidas en una muestra sanguínea 1: Normales Hombre de 13.8 a 17.2 gramos por decilitro (g/dL); Mujer de 12.1 a 15.1 g/dL 2 : Anormal > o < a valor normal	Categorica Nominal 1= Normal 2= Anormal

Tabla 8b: Variables bioquímicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Leucocitos	Cantidad de glóbulos blancos (GB) en la sangre	Cantidad de Leucocitos en una muestra sanguínea 1: Normal Hombre adulto 4,5 a 10 mil/mm ³ ; Mujer adulta 4,5 a 10 mil/mm ³ 2: Anormal > o < a valor normal	Categoría nominal 1= Normal 2= Anormal
Plaquetas	Cantidad de plaquetas en la sangre	Cantidad de plaquetas en una muestra sanguínea 1: Normal 150 a 400 mil por microlitro (mcL). 2: Anormal > o < a valor normal	Categoría Nominal 1= Normal 2= Anormal

Tabla 8c: Variables bioquímicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Bun	Cifras de nitrógeno ureico circulante en la sangre	Valores de nitrógeno ureico en una muestra sanguínea. 1: Normal 6 a 20 mg/dL. 2: Anormal > o < a valor normal	Catagórica Nominal 1= Normal 2= Anormal
Creatinina	Cantidad de creatinina en suero	Cantidad de creatinina presente en una muestra sanguínea. 1: Normal de 0.9 a 1.3 mg/dL para los hombres adultos; de 0.6 a 1.1 mg/dL para las mujeres adultas 2: Anormal > o < a valor normal	Catagórica Nominal 1 = Normal 2= Anormal
Glicemia	Cifras de glucosa en ayunas	Valores de glucosa después de 9 a 12 hrs de ayuno. 1 < 100mg/dl Normal 2 ≥ 100 mg/dl Anormal	Catagórica Nominal 1 = Normal 2= Anormal

Tabla 8d: Variables bioquímicas

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
ANAs	Cifras de anticuerpos antinucleares	Valores de anticuerpos antinucleares en una muestra sanguínea. 1:Normal resultados positivos a dilución mayor de 1:20 2: Anormal < a 1:20	Catagórica Nominal 1 = Normal 2= Anormal

Tabla 9: Variables hormonales

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
T3	Cifras de triyodotironina (T3) en sangre	Cifras de triyodotironina en ng/dL, obtenidas en una muestra sanguínea.	Cuantitativa continua
T4	Cifras de tiroxina L (T4) en sangre	Cifras de tiroxina L en mcg/dL, obtenidas en una muestra sanguínea	Cuantitativa continua
TSH	Cifras de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en sangre	Cifras de hormona estimulante de la tiroides en mIU/L,obtenidas en una muestra sanguínea	Cuantitativa continua

Tabla 10: Variables de expresión génica

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE
Perfil de expresión	Log 10 de conteos normalizados de ARN mensajero	Perfil de expresión de ARNm analizado en una muestra de ARN total	Cuantitativa de continua

IV. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

4.1. Análisis demográficos

A través de campañas abiertas al público fueron invitados a participar 45 pacientes con vitiligo provenientes del Estado de Nuevo León, en el Noreste de México (fig. 11), 22 con tipo estable (14 masculinos y 8 femeninos) y 23 con tipo activo (10 masculinos y 13 femeninos) (fig.12), a quienes se les ofreció diagnóstico clínico de la enfermedad, biometría hemática, anticuerpos antinucleares y perfil tiroideo completo. Una vez obtenido los resultados de las pruebas de laboratorio y cumpliendo los criterios de inclusión al protocolo, fueron tomadas una biopsia de una zona despigmentada de la piel y otra de una zona pigmentada antes de iniciar el tratamiento estándar con UVB-nb, las que fueron almacenadas siguiendo el protocolo descrito en apartado de material y métodos.



Figura 11. Mapa de México. En rojo se destaca la región geográfica de México, correspondiente al estado de Nuevo León.

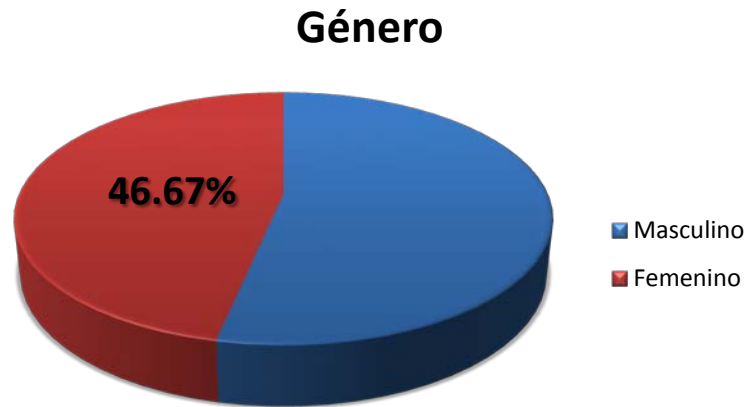


Figura 12. Distribución de géneros de pacientes incluidos en este estudio.

El promedio de la edad de los pacientes fue de 41.58 ± 14.36 años (mínimo 19 años, máximo 73 años). El promedio de la edad al inicio del vitiligo fue de 23.27 ± 17.17 años (mínimo 3 años, máximo 65 años). En la figura 13 se puede observar que el 73.3% de los pacientes involucrados en este estudio desarrollaron la enfermedad antes de los 30 años.

En el caso de los pacientes que presentaron vitiligo estable la edad promedio del grupo fue de 39.86 ± 13.48 años (mínimo 19 años, máximo 70 años), con una edad promedio de inicio de la enfermedad de 23 ± 16.85 años (mínimo 3 años, máximo 65 años). Para los pacientes que presentaron vitiligo activo la edad promedio del grupo fue de 43.22 ± 15.27 (mínimo 20 años, máximo 73 años), con una edad promedio de inicio de la enfermedad de 23.52 ± 17.84 años (mínimo 4 años, máximo 60 años).

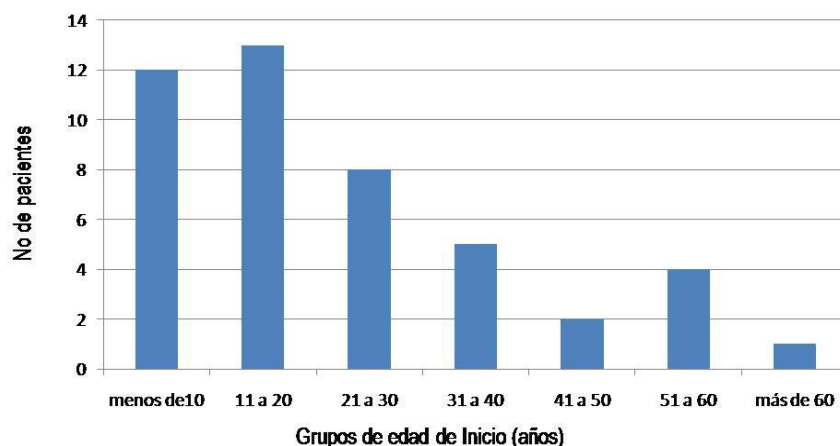


Figura 13. Edad de inicio del vitiligo por grupos.

4.2. Resultados de análisis clínicos

La biometría hemática arrojó valores normales para la población incluida en este estudio.

Sólo 2 pacientes (4.2%) presentaron alteraciones tiroideas (1 hipotiroidismo, 1 tiroiditis) y 4 pacientes (8.9%) hipertensión arterial (HTA) asociadas a vitiligo.

4.3. Antecedentes heredofamiliares

Se encontró que los pacientes con antecedentes familiares de vitiligo presentan mayor riesgo de padecer la enfermedad antes de los 30 años de edad (O.R.= 5.78; IC 95%= 1.00 – 62.29; Pc= 0.05) (Tabla 11); 27 pacientes (60%) presentaron antecedentes heredofamiliares de alguna enfermedad de naturaleza inmune en uno o más integrantes de su grupo familiar. Entre ellas podemos destacar la presencia de vitiligo en familiares de 20 pacientes

(44.4%), diabetes mellitus (DM) en familiares de 8 pacientes (17.8%), HTA en familiares de 3 pacientes (6.6%) y psoriasis en familiares de 1 paciente (2.2%). Estas patologías se presentaron en algún integrante de manera independiente o en conjunto, incluido con vitiligo.

Tabla 11: Antecedentes familiares de vitiligo

Antecedentes familiares vitiligo	≤ 30 años	> 30 años	O.R.	I.C.	X ²	Pc
Si	18	2	5.78	1.00-62.29	5	0.05
No	15	10	0.17	0.02-0.10	5	0.05

Pc = P corregida.

4.4. Selección de muestras para la realización de perfiles de expresión génica

Para realizar el análisis de expresión fueron utilizadas las muestras de piel de los 45 sujetos seleccionados: muestras de 22 pacientes con vitiligo vulgar estable y muestras de 23 pacientes que presentaron vitiligo vulgar inestable, provenientes de tejido afectado por vitiligo y de una región pigmentada.

El total de muestras de piel seleccionadas para ser analizadas sus patrones de expresión por *TruSeq Illumina* correspondió a aquellas cuya calidad del ARN extraído presentara un RQ₆ (relación 28S/18S ARN ribosomales y de integridad del ARN) calculado a través de su electroferograma (fig. 14). En la figura se puede observar los patrones electroforéticos obtenidos para los ARN ribosomales 28s y 18s de cada una de las muestras.

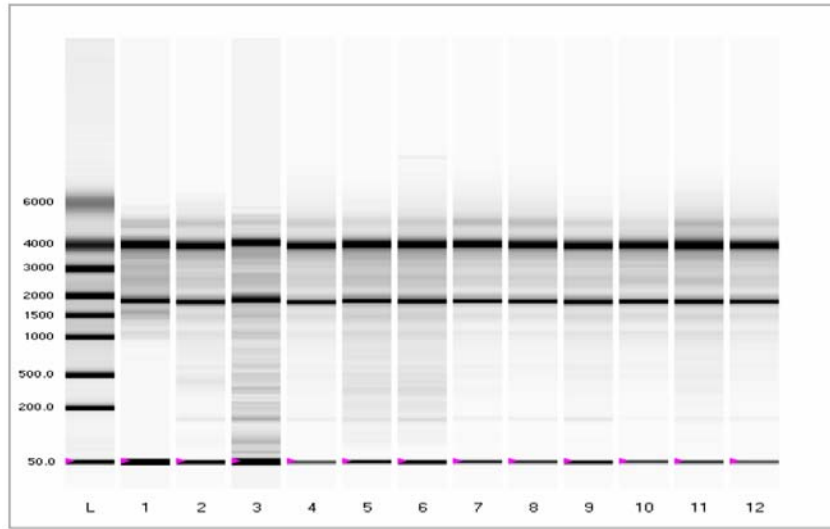


Figura 14. Electroferograma ARNs extraídos. Ejemplo de electroferograma obtenido de las muestras de ARN extraído de las biopsias de piel. L indica marcador de peso molecular para ARN, 1 a 12 corresponden a muestras de RNA.

4.5. Resultado general de perfiles de expresión de genes

En el desarrollo del vitiligo se ha descrito la existencia de diferencias entre los patrones de expresión de la piel sana y la piel no pigmentada de los pacientes. En el caso de la respuesta a tratamiento, se espera que la expresión de ciertos genes en la piel no pigmentada se modifique con la finalidad de inducir su repigmentación. Por otra parte, la expresión de dichos genes se esperaría que fuera diferente en la piel que no pigmenta.

Con la finalidad de determinar cuáles son los genes que participan en este proceso se realizó un análisis de expresión antes y después de tratamiento utilizando R de *Bioconductor*, y se realizaron las comparaciones mediante diferentes pruebas estadísticas para las combinaciones de: piel normal, piel con vitiligo, piel que repigmenta después de tratamiento. y piel que no repigmenta, utilizando SPSS.

4.5.1. Análisis de expresión mediante R de Bioconductor

Una vez obtenido el ARN, generado su ADNc y secuenciado para análisis de expresión mediante *TruSeq*, los resultados de las intensidades relativas obtenidos fueron normalizados y generados sus mapas de calor.

La comparación de los patrones de expresión obtenido para cada uno de los grupos de muestras de los respectivo pacientes, antes y después de tratamiento (fig.15), revelan similitudes entre los patrones de expresión de piel que presentan pigmento (muestra normal y muestra repigmentada) y las no pigmentadas (vitiligo y no repigmentada), lo que permite su organización en 2 ramas principales (*clados*).

Además se puede apreciar que existen patrones de expresión significativa en tres genes relacionados con pigmento: Dopacromo tautomerasa (DCT), Melan-A (MLANA) y en el gen que codifica a la Proteína Relacionada con la Tirosinasa (TYRP1), los que se encuentran sobre expresados en piel que presenta pigmento.

Al realizar el agrupamiento de las muestras de acuerdo al tipo y subtipo de pigmentación presentado por la biopsia de origen (con pigmento y sin pigmento), género del paciente (sexo femenino o masculino), edad, tipo de vitiligo (vitiligo activo y vitiligo estable), y al grado de respuesta al tratamiento (menos de 10% de mejoría, entre 10%-30% de mejoría y más de 30% de mejoría) (fig. 16), no se observan patrones de expresión claros que den cuenta de la relación de la enfermedad con edad, género del paciente, el grado de respuesta a tratamiento o el tipo de vitiligo manifestado en el paciente (vitiligo activo o vitiligo estable), sólo se puede observar patrones claros de sobre expresión en los genes DCT, MLANA y

TYRP1 relacionados con el grado de pigmentación de la piel (fig. 16).

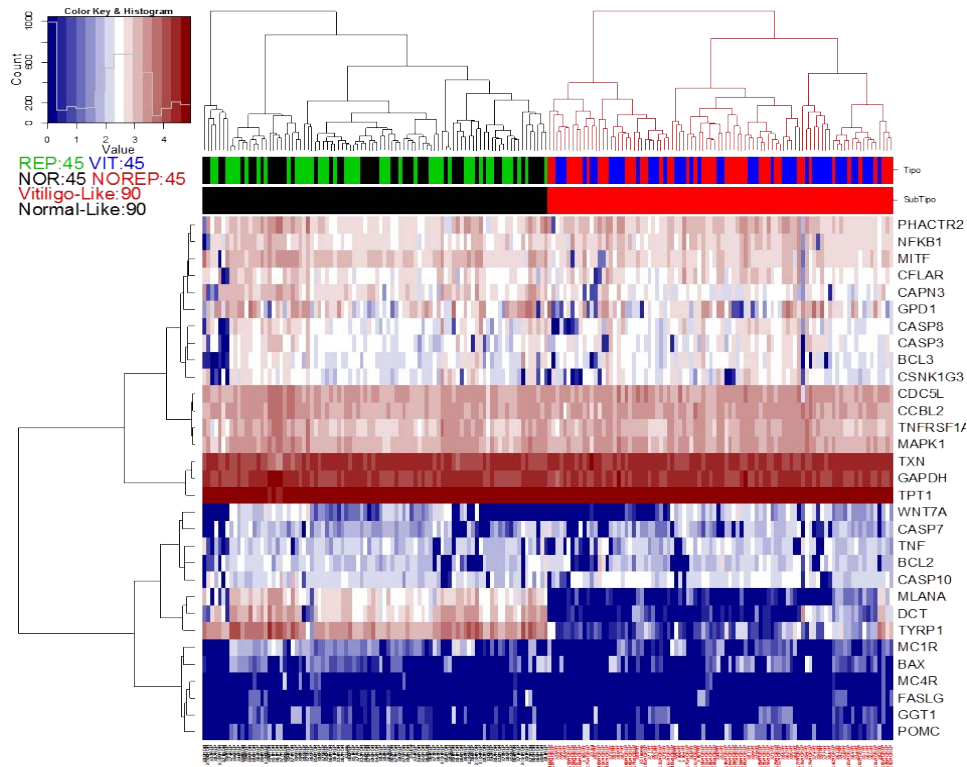


Figura 15. Mapa de calor de patrones de expresión de genes analizados en muestras antes y después de tratamiento. En la figura el eje vertical se representa los patrones de expresión de las muestras obtenidos para cada uno de los genes (horizontal). La coloración de la parte superior indica: azul muestra proveniente de tejido con vitiligo y negro muestra proveniente de tejido normal; verde muestra repigmentada y rojo no repigmentada después de tratamiento UVB-nb). *Clados* destacados con líneas de color negro y rojo en la parte superior del mapa. La coloración rojo al interior del mapa corresponde a sobreexpresión, blanco expresión intermedia y azul a subexpresión. En la parte inferior en letras y números negros y rojos se indica el código de identificación de las muestras.

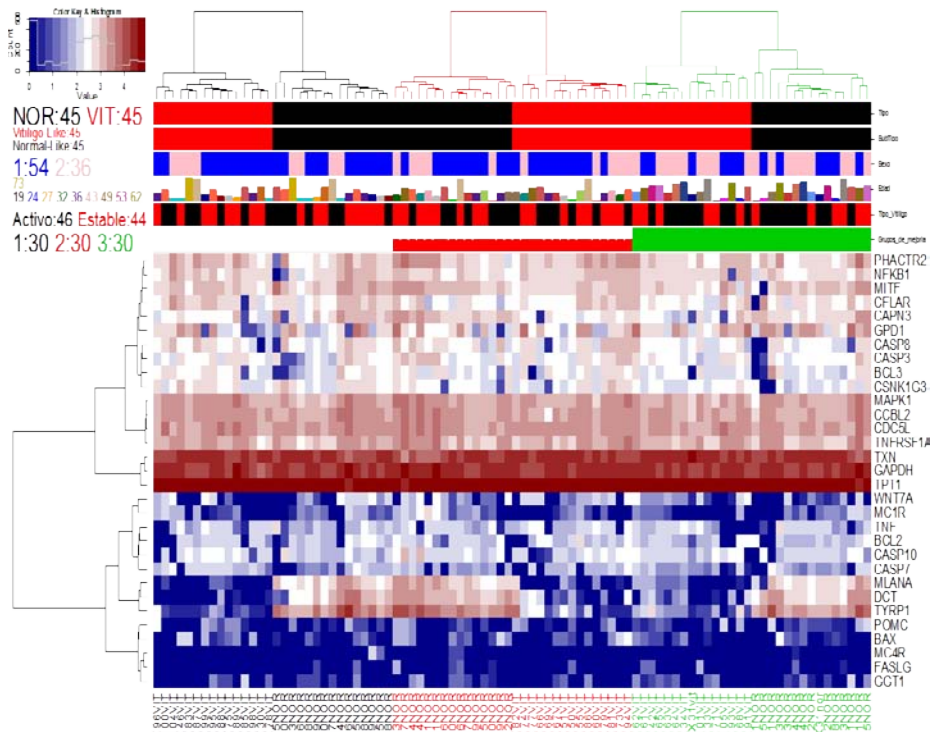


Figura 16. Mapa de calor de patrones de expresión agrupados de acuerdo al tipo de vitiligo y grupo de mejoría. En la parte superior del mapa de calor se representan los grupos de estudio: tipo y subtipo de muestra de acuerdo a su pigmentación en las que fueron agrupadas (negro y rojo), el género del paciente (Sexo; azul masculino, rosa femenino) En la figura el eje vertical se representa los patrones de expresión de las muestras obtenidos para cada uno de los genes (horizontal), edad de los pacientes (con barras de distinto color), tipo de vitiligo (negro muestra proveniente de paciente con vitiligo activo, rojo muestra proveniente de paciente con vitiligo estable) y grupo de mejoría (negro menos de 10% de mejoría, rojo entre 10%-30% de mejoría y verde para más de 30% de mejoría). *Clados* destacados con líneas de color negro, rojo y verde en la parte superior del mapa que indican agrupación de muestras. La coloración rojo al interior del mapa corresponde a sobreexpresión, blanco expresión intermedia y azul a subexpresión. En la parte inferior en letras y números negros, rojos y verdes se indica el código de identificación de las muestras.

4.5.2. Análisis estadísticos, prueba T de Student

Al realizar la comparación de los valores promedio obtenidos para los patrones de expresión de los genes analizados, en la piel pigmentada y no pigmentada antes y después de tratamiento (Anexo 3), se pudo observar diferencias significativas en 13 genes relacionados con los mecanismos de pigmentación, apoptosis, sobre vida de la célula, estrés oxidativo y mecanismos de señalización celular (tablas 16 a 25).

En el caso de los genes relacionados con el pigmento, en la tabla 16 se describen los promedios y desviaciones estándar obtenidos para cada grupo de biopsia. Para estos se observó diferencias estadísticamente significativas en los genes DCT (que participa en la regulación de los niveles de eumelanina y feomelanina), TYRP1 (involucrado en la biosíntesis de la melanina), MC1R (Receptor 1 de melanocortina que participa en el control de la melanogénesis), y MLANA (que participa en la biogénesis de los melanosomas), particularmente al comparar pieles que presentan pigmento (normal antes de tratamiento y repigmentada) contra pieles que no presentaron pigmento (piel con vitiligo y no repigmentada después de tratamiento), lo que da cuenta del grado de pigmento observado en los respectivos tipos de piel ($p < 0.05$) (tabla 17). Sin embargo, en el caso del gen MC4R (receptor 4 de melanocortinas, que interactúa con adrenocorticotrofina y MSH en el proceso de pigmentación de la piel), sólo se observó diferencia estadísticamente significativa en el grado de expresión de la piel con vitiligo y no repigmentada ($p = 0.05$). En ambos casos la piel correspondiente a la muestra de vitiligo es la que presenta una expresión genética menor.

Tabla 16: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de pigmentación, para cada grupo de muestras analizadas.

Gen	Tipo Muestras	N	Promedio	Desviation Est.
DCT	Normal	45	2.965	0.554
	Vitiligo	45	0.714	0.947
	Repigmentó	45	2.729	0.804
	No-Repigmentó	45	0.590	0.897
MC1R	Normal	45	1.148	0.822
	Vitiligo	45	0.602	0.742
	Repigmentó	45	1.013	0.788
	No-Repigmentó	45	0.529	0.621
MC4R	Normal	45	0.113	0.387
	Vitiligo	45	0.000	0.000
	Repigmentó	45	0.083	0.316
	No-Repigmentó	45	0.076	0.252
MLANA	Normal	45	2.793	0.505
	Vitiligo	45	0.476	0.745
	Repigmentó	45	2.489	0.653
	No-Repigmentó	45	0.454	0.699
TYRP1	Normal	45	3.544	0.343
	Vitiligo	45	1.214	0.920
	Repigmentó	45	3.451	0.463
	No-Repigmentó	45	1.230	0.983

En la tabla Normal corresponde a piel normal, Vitiligo corresponde a piel con vitiligo, Repigmento corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y No-Repigmentó a piel que no repigmentó después de tratamiento.

En cuanto a los genes involucrados en los mecanismos de apoptosis (tabla 18), se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de piel en dos de los genes seleccionados para este estudio ($p < 0.05$), CASP3 (cistein proteasa 3 que es procesada por las caspasas 8, 9 y 10, y que participa en la ejecución de la cascada de señalización de la apoptosis celular, activando las caspasas 6, 7 y 9) y en el gen TNFRS1A (miembro 1A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral) que induce señal de muerte celular por caspasa 8 (tabla 19). En ambos casos, estos genes se encuentran sobre expresados en piel con vitiligo, indicando la posibilidad de que la piel afectada por

vitiligo se deba a la inducción de un mecanismo extrínseco de Apoptosis.

Tabla 17. Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de pigmentación.

Gen	Comparación	Significancia (2-colas)
DCT	NOR - VIT	2.59E-14**
	NOR - REP	0.062
	NOR - NOREP	2.98E-19**
	VIT - REP	2.59E-14**
	VIT - NOREP	0.471
	REP - NOREP	2.56E-14**
MC1R	NOR - VIT	0.002*
	NOR - REP	0.348
	NOR - NOREP	3.00E-04**
	VIT - REP	0.006*
	VIT - NOREP	0.578
	REP - NOREP	0.001*
MC4R	NOR - VIT	0.057*
	NOR - REP	0.684
	NOR - NOREP	0.579
	VIT - REP	0.084
	VIT - NOREP	0.05*
	REP - NOREP	0.842
MLANA	NOR - VIT	2.76E-21**
	NOR - REP	0.021*
	NOR - NOREP	5.93E-22**
	VIT - REP	3.37E-18**
	VIT - NOREP	0.852
	REP - NOREP	9.45E-18**
TYRP1	NOR - VIT	2.22E-22**
	NOR - REP	0.256
	NOR - NOREP	7.04E-19**
	VIT - REP	1.10E-18**
	VIT - NOREP	0.93
	REP - NOREP	8.50E-17**

En la tabla NOR corresponde a Piel Normal, VIT corresponde a piel con Vitiligo, REP corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento. Letras color rojo indican la comparación que presento significancia estadística.

(*) $P \leq 0.05$ (**) $P < 0.0001$

Tabla 18: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de Apoptosis, para cada grupo de muestras analizadas.

Gen	Tipo Muestra	N	Promedio	Desviación Est.
CASP3	Normal	45	2.361	0.692
	Vitiligo	45	2.521	0.302
	Repigmentó	45	2.335	0.545
	No-Repigmentó	45	2.268	0.703
TNFRSF1A	Normal	45	3.158	0.310
	Vitiligo	45	3.180	0.246
	Repigmentó	45	3.054	0.303
	No-repigmentó	45	3.136	0.230

En la tabla Normal corresponde a piel normal, Vitiligo corresponde a piel con vitiligo, Repigmento corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y No-Repigmentó a piel que no repigmentó después de tratamiento.

Tabla 19: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de Apoptosis.

Gen	Comparación	Significancia (2-colas)
CASP3	NOR - VIT	0.146
	NOR - REP	0.845
	NOR - NOREP	0.47
	VIT - REP	0.052*
	VIT - NOREP	0.018*
	REP - NOREP	0.615
TNFRSF1A	NOR - VIT	0.662
	NOR - REP	0.053
	NOR - NOREP	0.602
	VIT - REP	0.005*
	VIT - NOREP	0.344
	REP - NOREP	0.057

En la tabla NOR corresponde a Piel Normal, VIT corresponde a piel con Vitiligo, REP corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento. Letras color rojo indican la comparación que presento significancia estadística.

(*) $P \leq 0.05$

Por otra parte, el análisis del patrón de expresión de genes involucrados en mecanismo de sobre vida de los melanocitos (tabla 20) indica que dos de los genes seleccionados mostraron algún patrón de expresión diferencial entre los tipos de piel analizados ($p < 0.05$). Entre ellos se observa que el gen CDC5L involucrado en el control del ciclo celular presenta diferencias entre los patrones de expresión entre tejido normal y repigmentado luego del tratamiento y entre tejido proveniente de vitiligo y repigmentado, siendo menor en la piel repigmentada que en sus contrapartes.

En el caso del gen MITF que controla la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina y sobrevida del melanocito, los patrones de expresión fueron en promedio mayores para los tejidos que presentaron pigmento (normal y repigmentada) en comparación con los tejidos con vitiligo y no repigmentados después de tratamiento (tabla 21).

Tabla 20: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de sobrevida celular, para cada grupo de muestras analizadas.

Gen	Tipo Muestra	N	Promedio	Desviación est.
CDC5L	Normal	45	3.377	0.199
	Vitiligo	45	3.373	0.174
	Repigmentó	45	3.291	0.190
	No-Repigmentó	45	3.359	0.250
MITF	Normal	45	3.014	0.522
	Vitiligo	45	2.862	0.248
	Repigmentó	45	2.980	0.238
	No-Repigmentó	45	2.643	0.605

En la tabla Normal corresponde a piel normal, Vitiligo corresponde a piel con vitiligo, Repigmentó corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y No-Repigmentó a piel que no repigmentó después de tratamiento.

Tabla 21: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de sobrevivencia celular.

	Comparación	Significancia (2-colas)
CDC5L	NOR - VIT	0.911
	NOR - REP	0.027*
	NOR - NOREP	0.679
	VIT - REP	0.022*
	VIT - NOREP	0.785
	REP - NOREP	0.093
MITF	NOR - VIT	0.116
	NOR - REP	0.703
	NOR - NOREP	0.003*
	VIT - REP	0.017*
	VIT - NOREP	0.046*
	REP - NOREP	0.001*

En la tabla NOR corresponde a piel normal, VIT corresponde a piel con vitiligo, REP corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento. Letras color rojo indican la comparación que presentó significancia estadística.

(*) $P \leq 0.05$

Al analizar los genes seleccionados participantes en respuesta al estrés oxidativo (tabla 22), se pudo observar que el gen GPD1 que participa en el metabolismo Redox de la célula se encuentra sobre expresado en tejido no-repigmentado luego de tratamiento. En cuanto al gen TXN que participa en la inhibición del estrés oxidativo y la activación de la caspasa 3 se sobre expresa en tejido con vitiligo y no repigmentado, dando cuenta de activación de mecanismo de respuesta frente a la apoptosis y al estrés oxidativo generado por este mecanismo de muerte celular (tabla 23).

Tabla 22: Promedios y desviaciones estándar obtenidos en genes relacionados con mecanismo de estrés oxidativo, para cada grupo de muestras analizadas.

Gen	Tipo Muestra	N	Promedio	Desviación Est.
GPD1	Normal	45	2.624	0.779
	Vitiligo	45	2.669	0.753
	Repigmentó	45	2.805	0.552
	No-Repigmentó	45	2.336	0.907
TXN	Normal	45	4.203	0.238
	Vitiligo	45	4.310	0.128
	Repigmentó	45	4.290	0.136
	No-Repigmentó	45	4.315	0.132

En la tabla Normal corresponde a piel normal, Vitiligo corresponde a piel con vitiligo, Repigmento corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y No-Repigmentó a piel que no repigmentó después de tratamiento.

Tabla 23: Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de respuesta al estrés oxidativo.

Gen	Comparación	Significancia (2-colas)
GPD1	NOR – VIT	0.704
	NOR – REP	0.185
	NOR - NOREP	0.064
	VIT – REP	0.279
	VIT - NOREP	0.029*
	REP - NOREP	0.004*
TXN	NOR – VIT	0.004*
	NOR – REP	0.030*
	NOR - NOREP	0.004*
	VIT – REP	0.299
	VIT - NOREP	0.843
	REP - NOREP	0.194

En la tabla NOR corresponde a piel normal, VIT corresponde a piel con vitiligo, REP corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento. Letras color rojo indican la comparación que presentó significancia estadística.

(*) $P \leq 0.05$

Finalmente, en cuanto a los genes relacionados con rutas de señalización y mecanismo de traducción de señales (tabla 24), encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de los patrones de expresión observados para el gen CSNK1G3 al comparar las muestras con Vitiligo y las que no repigmentaron después de tratamiento, siendo menores en este último caso (tabla 25). El producto del gen CSNK1G3 es una serina/treonina cinasa que fosforila una serie de proteínas que involucradas en la vía Wnt, participando en procesos celulares importantes como reparación del DNA, división celular, localización nuclear y transporte a través de la membrana.

Tabla 24: Promedios y desviación estándar obtenido en gen relacionado con mecanismo de traducción de señales, para cada grupo de muestras analizadas.

Gen	Tipo Muestra	N	Promedio	Desviación Est.
CSNK1G3	Normal	45	2.252	0.662
	Vitiligo	45	2.408	0.365
	Repigmentó	45	2.238	0.703
	No-Repigmentó	45	1.981	0.944

En la tabla Normal corresponde a piel normal, Vitiligo corresponde a piel con vitiligo, Repigmento corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y No-Repigmentó a piel que no repigmentó después de tratamiento.

Tabla 25. Prueba T de Student en genes relacionados con mecanismos de traducción de señales.

Gen	Comparación	Significancia (2-colas)
CSNK1G3	NOR – VIT	0.107
	NOR – REP	0.933
	NOR - NOREP	0.144
	VIT – REP	0.172
	VIT – NOREP	0.005*
	REP – NOREP	0.101

En la tabla NOR corresponde a piel normal, VIT corresponde a piel con vitiligo, REP corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento. Letras color rojo indican la comparación que presento significancia estadística. (*) $P \leq 0.05$

4.6. Resultados de respuesta a tratamiento UVB-nb

En cuanto a la respuesta a tratamiento experimentada por los pacientes, estos fueron clasificados en tres grupos:

Bajo: Aquellos sujetos que presentaron una respuesta a tratamiento menor al 10% transcurrido 6 meses.

Medio: Aquellos sujetos que presentaron una respuesta a tratamiento entre 10.1% y 29.9%, transcurrido 6 meses.

Alto: Aquellos sujetos que presentaron una respuesta a tratamiento mayor a 30% transcurrido 6 meses.

Luego de la evaluación realizada de manera independiente por 2 Médicos Dermatólogos se observó que, de los 45 sujetos incluidos en el análisis de expresión, 42 (93.33%; 20 Activos [44.44%], 22 Estables [48.89%]) mostraron algún grado de respuesta a tratamiento. Los tres sujetos que no presentaron repigmentación presentaban vitiligo en su forma Activa (6.67%). En la tabla 26 se describe el número de pacientes clasificados por tipo de vitiligo y grupo de mejoría; en la tabla 27 el porcentaje de respuesta experimentado por los pacientes incluidos en este protocolo

Tabla 26: Respuesta a tratamiento experimentada por tipo de vitiligo.

Grupo Mejoría	Tipo Vitiligo		Total (N, %)
	Activo N (%)	Estable N (%)	
Bajo	7 (30.43)	7 (31.82)	14 (31.11)
Medio	7 (30.43)	4 (18.18)	11 (24.44)
Alto	9 (39.14)	11 (50.0)	20 (44.45)
Total	23 (100)	22 (100)	45 (100)

Tabla 27: Porcentaje de Respuesta a tratamiento experimentada por pacientes.

No Registro	Genero	Tipo Vitiligo	% Respuesta	No Registro	Genero	Tipo Vitiligo	% Respuesta
30	M	Estable	10	31	F	Activo	35
33	F	Estable	70	34	M	Activo	50
46	F	Estable	10	42	F	Activo	35
51	M	Estable	20	50	F	Activo	24
55	M	Estable	20	60	M	Activo	19
61	M	Estable	30	63	M	Activo	45
62	F	Estable	40	64	M	Activo	35
65	F	Estable	30	66	F	Activo	27
68	M	Estable	40	67	F	Activo	19
71	F	Estable	30	69	F	Activo	28
73	F	Estable	12	78	F	Activo	0
74	F	Estable	25	82	F	Activo	14
75	M	Estable	0	83	M	Activo	2
77	M	Estable	20	85	F	Activo	5
79	M	Estable	25	87	M	Activo	5
81	F	Estable	24	88	F	Activo	2
86	M	Estable	20	91	M	Activo	40
89	M	Estable	1	93	F	Activo	40
95	M	Estable	5	94	M	Activo	20
96	M	Estable	2	100	F	Activo	0
98	M	Estable	10	101	M	Activo	50
99	M	Estable	3	104	M	Activo	0
				105	F	Activo	33
Total pacientes			22	Total pacientes			23

A modo de ejemplo se agregan parte de las iconografías capturadas de las regiones afectadas por vitiligo en los pacientes que participaron en este estudio. Como podemos observar en las fotografías de la figura 17, luego de transcurridos 6 meses de tratamiento, en esta paciente no se observó mejoría.

En la fotografías de la figura 18 se puede observar la respuesta a tratamiento experimentado por dos sujetos, uno con vitiligo en su

forma activa (A y B) y otro con su forma estable (C y D). En este caso, ambos pacientes presentaron una respuesta a tratamiento baja (menor al 10%) transcurrido 6 meses de fototerapia.



Figura 17. Paciente afectado por vitiligo vulgar antes y después de tratamiento. En la fotografía se observan las imágenes capturadas de regiones afectada por vitiligo en una paciente, antes de tratamiento (inicio) y después de 6 meses de tratamiento con fototerapia (término). En este caso no se observó respuesta frente al tratamiento aplicado.

Como se describe en la tabla 26, el número de pacientes que presentaron un porcentaje de mejoría media fue menor que sus contrapartes, e incluso se observó que sólo 4 sujetos con vitiligo estable se localizaron dentro de este grado de respuesta.

En la figura 19 se pueden observar las iconografías capturadas de dos pacientes que presentaron respuesta a tratamiento en el grupo media, uno con vitiligo en su forma activa (A y B) y otro con su forma estable (C y D).



Figura 18. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento baja (menor al 10%). En la fotografía se observan las imágenes capturadas de regiones afectada por vitiligo en dos pacientes, antes de tratamiento (inicio) y después de 6 meses de tratamiento con fototerapia (término). (A y B) Corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma activa; en este caso se evaluó que su respuesta a tratamiento fue del 2%. (C y D) Corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma estable; la evaluación clínica determinó que este paciente presentó un 5% de mejoría.



Figura 19. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento media (entre el 10.1% y 29.9%). En la fotografía se observan las imágenes capturadas de regiones afectada por vitiligo en dos pacientes, antes de tratamiento (inicio) y después de 6 meses de tratamiento con fototerapia (término). (A y B) Corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma activa; en este caso se evaluó que su respuesta a tratamiento fue del 19%. (C y D) Corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma estable; la evaluación clínica determinó que este paciente presentó un 23.5% de mejoría.

Por otra parte, un total de 20 pacientes (44.45%) presentaron una respuesta a tratamiento alta (mayor a 30%), 9 de ellos presentaron la forma activa de la enfermedad y 11 sujetos con la forma estable (tabla 26).

En la figura 20 se pueden observar las iconografías capturadas de dos pacientes que presentaron respuesta a tratamiento alta.



Figura 20. Pacientes afectados por vitiligo vulgar que presentaron una respuesta a tratamiento alta (mayor al 30%). En la fotografía se observan las imágenes capturadas de regiones afectada por vitiligo en dos pacientes, antes de tratamiento (inicio) y después de 6 meses de tratamiento con fototerapia (término). (A y B) Corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma activa y (C y D) corresponden a un paciente que presentó vitiligo en su forma estable; la evaluación clínica determinó en ambos casos que los pacientes presentaron un 40% de mejoría.

4.6.1. Biomarcadores clínicos con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento

El análisis de de varianza estadística (ANOVA) realizado mediante el paquete estadístico SPSS versión 17.0, considerando la respuesta a tratamiento experimentada por los pacientes agrupada en las tres clases antes mencionadas, permitió observar luego de realizar pruebas *Post-Hoc* (*Tukey* y *Bonferroni* para varianzas iguales, *Tamhane* y *Dunnnett T3* para varianzas diferentes), que los niveles de TSH presentan diferencias estadísticamente significativas entre los que presentan respuesta baja y los que

presentan respuesta a tratamiento alta (tablas 28 y 29). Como se puede observar en la tabla 28, considerando los niveles de TSH encontramos que en el grupo que presentó una respuesta a tratamiento alta presenta niveles bajos de esta hormona en comparación con los restantes grupos. A su vez existen diferencias en cuanto a peso y respuesta a tratamiento entre los grupos que presentan respuesta a tratamiento baja y media (tabla 30). En este caso podemos ver que el grupo que presenta una respuesta a tratamiento baja está constituido por los sujetos que presentaron, en promedio, mayor peso.

Tabla 28: Estadísticos descriptivos niveles de TSH y peso observados para cada grupo de respuesta a tratamiento.

Variable	Grupo de mejoría	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
TSH	Baja	15	2.277	0.688	1.17	3.85
	Media	15	2.034	0.630	1.16	2.98
	Alta	15	1.645	0.767	.60	3.21
	Total	45	1.986	0.730	.60	3.85
Peso	Baja	15	90.433	16.417	67.00	124.00
	Media	15	73.587	20.780	40.00	140.00
	Alta	15	77.867	19.511	53.00	120.00
	Total	45	80.629	19.914	40.00	140.00

Tabla 29: Diferencia de niveles de TSH observados para los grupos de respuesta a tratamiento bajo y alto.

Variable Dependiente	Grupos de mejoría I (Media ± Desv Est.)	Grupos de mejoría II (Media ± Desv Est.)	Sig.
TSH	Baja (2.2773 ± 0.6875)	Alta (1.6447 ± 0.7665)	0.044*

(*) $p \leq 0.05$

Tabla 30: Diferencias de pesos observados para los grupos de respuesta a tratamiento bajo y medio.

Variable Dependiente	Grupos de mejoría I (Media ± Desv Est.)	Grupos de mejoría II (Media ± Desv Est.)	Sig.
PESO	Baja (90.4333 ± 16.417)	Media (73.5867 ± 20.78)	0.05*

(*) $p \leq 0.05$

4.6.2. Genes con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento

Como el interés de este estudio es identificar marcadores predictivos, los patrones de expresión a considerar serán aquellos presentes en las muestras de ARN obtenidas en la piel de cada paciente antes de ser sometidos a fototerapia UVB-nb.

Al comparar los promedios de los patrones de expresión de los genes seleccionados para este estudio, considerando las agrupaciones definida por el porcentaje de respuesta a tratamiento se pudo detectar asociación estadística en la comparación realizada entre grupos (tabla 31).

En cuanto a la relación existente entre los patrones de expresión de los genes analizados en este estudio y los grupos de respuesta a tratamiento, se pudo observar que el patrón de expresión de Caspasa 3 (CASP3) en muestras que no repigmentaron (identificado como CASP3_NOREP) después de tratamiento, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo de pacientes con una respuesta a tratamiento media y el grupo con respuesta alta (tabla 32). Como se puede observar en la tabla 32, el patrón de expresión promedio del grupo que presentó respuesta a tratamiento alta, fue menor.

En el caso del gen CCBL2 se pudo observar que los patrones de expresión de la piel de muestras normales antes de tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo de pacientes que presentaron una respuesta a tratamiento media y el grupo con repuesta alta (tabla 32). Nuevamente podemos apreciar en este caso que el grupo con respuesta a tratamiento alta presentó patrones de expresión en promedio

menores para este gen (tabla 20), que participa en la respuesta al estrés oxidativo.

Tabla 31: Estadísticos descriptivos para los genes observados para cada grupo de respuesta a tratamiento.

Variable	Grupo de mejoría	N	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
CASP3_NOREP	Bajo	15	2.402	0.4010	1.731	2.970
	Medio	15	2.555	0.256	2.261	2.976
	Alto	15	1.846	1.012	0.000	2.860
	Total	45	2.268	0.703	0.000	2.976
CCBL2_NOR	Bajo	15	3.325	0.154	3.156	3.605
	Medio	15	3.466	0.217	3.078	3.823
	Alto	15	3.276	0.229	2.883	3.877
	Total	45	3.356	0.214	2.883	3.877
DCT_VIT	Bajo	15	0.149	0.451	-0.088	1.732
	Medio	15	1.177	1.106	0.000	3.011
	Alto	15	0.818	0.899	-0.257	2.273
	Total	45	0.715	0.947	-0.257	3.011
GPD1_VIT	Bajo	15	2.326	0.983	0.611	3.564
	Medio	15	2.678	0.587	1.841	3.832
	Alto	15	3.001	0.474	2.180	3.771
	Total	45	2.669	0.753	0.611	3.832
NFKB1_REP	Bajo	15	2.893	0.210	2.538	3.251
	Medio	15	2.775	0.209	2.257	3.184
	Alto	15	2.693	0.244	2.333	3.265
	Total	45	2.787	0.232	2.257	3.265
TYRP1_VIT	Bajo	15	0.766	0.732	0.000	2.592
	Medio	15	1.496	1.038	0.000	3.679
	Alto	15	1.381	0.845	0.000	2.824
	Total	45	1.214	0.920	0.000	3.679

En sombreado son destacados los genes que no se consideran con valor predictivo, ya que los cambios de expresión son observados después de tratamiento.

En muestras de piel con vitiligo, antes de tratamiento, se pudo observar diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) en el gen DCT entre los tres grupos de respuesta de tratamiento, siendo el patrón de expresión promedio menor en el grupo que presentó una respuesta a tratamiento baja, situación que claramente repercute en la pigmentación de la piel de estos pacientes, ya que el producto de

este gen participa directamente en la regulación de los niveles de melanina en la piel. Además, para los genes TYRP1 (involucrado en pigmentación) y GPD1 (involucrado en respuesta al estrés oxidativo) en piel con vitiligo antes de tratamiento, se observó tendencia de patrones de expresión diferencial ($p < 0.07$) entre los tres grupos de respuesta a tratamiento en estudio (tabla 32). En ambos casos se pudo observar que los patrones de expresión promedio para ambos genes fue menor en el grupo que presentó respuesta a tratamiento baja, reflejando en ambos casos la posibilidad de experimentar una pigmentación reducida debido a los niveles bajos del producto de TYRP1 en este grupo, y una baja respuesta frente al estrés oxidativo lo que puede conducir a daño celular en este grupo de pacientes (tabla 31).

Finalmente, para el gen NFkB1 involucrado en mecanismo de traducción de señales, se pudo observar patrones de expresión diferencial en muestras de piel que presentaron repigmentación luego del tratamiento ($p < 0.05$) entre el grupo de pacientes que presentaron una respuesta a tratamiento baja y el grupo que presenta una respuesta a tratamiento alta (tabla 32). En este caso, el patrón de expresión para este gen fue mayor en el grupo con respuesta a tratamiento baja (tabla 32).

Al utilizar el tipo de vitiligo (activo o estable) como parte de la variable de agrupación de respuesta a tratamiento, se generan 6 grupos con el número de pacientes para cada grupo descrito en la tabla 26. En este caso, al considerar las variables clínicas de los pacientes incluidos en este estudio, y debido al reducido número de sujetos incluidos en cada grupo, sólo fue posible detectar asociación significativa al realizar la comparación de los valores promedios de peso de los pacientes incluidos en estudio, entre el

grupo de sujetos con vitiligo estable que presentaron respuesta baja y los sujetos que presentaron vitiligo activo con respuesta de tratamiento entre media una vez efectuadas las pruebas Post Hoc (tabla 33), siendo en promedio mayor el peso en los sujetos incluidos en el grupo con menor respuesta a tratamiento que presentaron la forma estable de vitiligo (tabla 34). Cabe recordar que esta variable presentó una condición similar a lo descrito previamente en el análisis conducido con los tres grupos iniciales de respuesta.

Tabla 32: Diferencias de patrones de expresión de genes observados para los grupos de respuesta a tratamiento.

Dependent Variable	Grupos de mejoría I (Media ± Desv Est.)	Grupos de mejoría II (Media ± Desv Est.)	Sig.
CASP3_NOREP	MEDIA (2.5551 ± 0.2559)	ALTA (1.8462 ± 1.0115)	0.052*
CCBL2_NOR	MEDIA (3.4660 ± 0.2174)	ALTA (3.2755 ± 0.2285)	0.036*
DCT_VIT	BAJA (0.1485 ± 0.4508)	MEDIA (1.1774 ± 1.1060)	0.01*
		ALTA (0.8175 ± 0.8993)	0.051*
GPD1_VIT	BAJA (2.3261 ± 0.9831)	ALTA (3.0014 ± 0.4744)	0.075**
NFKB1_REP	BAJA (2.8927 ± 0.2102)	ALTA (2.6932 ± 0.2441)	0.046*
TYRP1_VIT	BAJA (0.7655 ± 0.7324)	MEDIA (1.4962 ± 1.0383)	0.071**

En sombreado son destacados los genes que no se consideran con valor predictivo, ya que los cambios de expresión son observados después de tratamiento.

(*) $p \leq 0.05$

(**) $p > 0.05$ $p < 0.1$

Tabla 33: Diferencias de pesos observados para cada grupo de respuesta a tratamiento.

Variable Dependiente	Grupos de mejoría I (Media ± Desv Est.)	Grupos de mejoría II (Media ± Desv Est.)	Sig.
Peso	Estable BAJO (98.6875 ± 14.5281)	Activo MEDIO (66.5714 ± 12.5546)	0.019*

(*) $p \leq 0.05$

En la tabla 34 se representan los valores obtenidos para la estadística descriptiva de las variables que presentaron significancia estadística en los 6 grupos de respuesta a tratamiento, indicándose los valores promedio obtenido para cada una de las variables analizadas.

En el caso del análisis de expresión presentado por las muestras incluidas en los 6 grupos, se observaron patrones de expresión diferencial en los genes Bax, Cflar, MC1R y Wnt7A (tabla 35). Para los genes Bax y Cflar involucrados en mecanismo de apoptosis, se observó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en los patrones de expresión detectados en tejido que repigmentó después de tratamiento y el que no repigmentó, respectivamente. En el caso de Bax, se observó diferencias entre el grupo de pacientes que presentaron vitiligo estable y una respuesta a tratamiento medio y el grupo con vitiligo activo con respuesta a tratamiento alto.

En cuanto al segundo, Cflar, se observó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en tejido que no repigmentó después de tratamiento, entre el grupo de pacientes que presentaron vitiligo estable y una respuesta a tratamiento baja y el grupo con vitiligo activo con respuesta a tratamiento baja.

Tabla 34: Estadísticos descriptivos para las variables que presentaron diferencias significativas para cada grupo de respuesta a tratamiento considerando tipo de vitiligo.

Variable	Grupo	N	Promedio	Desviación Est.	Mínimo	Máximo
PESO	Estable baja	8	98.69	14.53	80.50	124.00
	Estable media	8	79.73	25.22	63.00	140.00
	Estable alta	6	74.17	13.57	63.00	100.00
	Activo baja	7	81.00	13.71	67.00	102.00
	Activo media	7	66.57	12.55	40.00	78.00
	Activo alta	9	80.33	23.11	53.00	120.00
	Total	4	80.63	19.91	40.00	140.00
	5					
BAX_REP	Estable baja	8	1.05	0.75	0.00	1.89
	Estable media	8	1.16	0.57	0.00	1.89
	Estable alta	6	0.75	0.61	0.00	1.44
	Activo baja	7	0.46	0.80	0.00	1.85
	Activo media	7	0.54	0.72	0.00	1.65
	Activo alta	9	0.09	0.27	0.00	0.80
	Total	4	0.67	0.71	0.00	1.89
	5					
CFLAR_NOREP	Estable baja	8	2.88	0.29	2.26	3.20
	Estable media	8	2.76	0.34	2.46	3.34
	Estable alta	6	2.69	0.31	2.35	3.16
	Activo baja	7	2.17	0.73	0.58	2.70
	Activo media	7	2.64	0.20	2.37	2.94
	Activo alta	9	2.64	0.55	1.33	3.28
	Total	4	2.64	0.47	0.58	3.34
	5					
MC1R_NOR	Estable baja	8	1.47	0.44	0.86	2.18
	Estable media	8	1.94	0.62	0.83	2.68
	Estable alta	6	1.09	0.92	0.00	2.28
	Activo baja	7	0.31	0.45	0.00	1.10
	Activo media	7	1.01	0.79	0.00	1.88
	Activo alta	9	0.95	0.81	0.00	2.17
	Total	4	1.15	0.82	0.00	2.68
	5					
WNT7A_NOREP	Estable baja	8	2.11	0.32	1.47	2.54
	Estable media	8	1.55	1.03	0.00	2.61
	Estable alta	6	1.68	0.81	0.31	2.62
	Activo baja	7	0.59	0.93	0.00	2.09
	Activo media	7	0.79	0.92	0.00	2.44
	Activo alta	9	1.03	1.08	0.00	2.60
	Total	4	1.30	1.00	0.00	2.62
	5					

Además, para el gen MC1R que participa en el mecanismo de pigmentación, se observó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en tejido normal antes de tratamiento, entre el grupo de

pacientes que presentaron vitiligo estable y una respuesta a tratamiento baja y el grupo con vitiligo activo con respuesta a tratamiento baja, entre el grupo con vitiligo estable y respuesta a tratamiento media y los grupos con vitiligo activo con respuesta a tratamiento baja y alta (tabla 35).

Tabla 35: Diferencia de patrones de expresión de genes observados para cada uno de los 6 grupos de respuesta a tratamiento generados considerando el tipo de vitiligo.

Variable Dependiente	Grupos de mejoría I (Media ± Desv Est.)	Grupos de mejoría II (Media ± Desv Est.)	Sig.
BAX_REP	Estable medio (1.1591 ± 0.5694)	Activo alta (0.0892 ± 0.2675)	0.011*
CFLAR_NOREP	Estable baja (2.8789 ± 0.2871)	Activo baja (2.1739 ± 0.7313)	0.043*
MC1R_NOR	Estable baja (1.4670 ± 0.2871)	Activo baja (0.3143 ± 0.4544)	0.028*
	Estable medio (1.9427 ± 0.6179)	Activo baja (0.3143 ± 0.4544)	0.001*
		Activo alta (0.9479 ± 0.8108)	0.053*
WNT7A_NOREP	Estable Bbaja (2.1124 ± 0.3160)	Activo baja (0.5919 ± 0.9252)	0.024*
		Activo medio (0.7853 ± 0.9223)	0.066**

En sombreado son destacados los genes que no se consideran con valor predictivo, ya que los cambios de expresión son observados después de tratamiento.

(*) $p \leq 0.05$

(**) $p > 0.05$, $p < 0.1$

Finalmente, para el gen Wnt7A, involucrado en mecanismo de señalización se observó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en tejido que no repigmentó después de tratamiento, entre el grupo de pacientes que presentaron vitiligo estable y una respuesta a tratamiento baja y el grupo con vitiligo activo con

respuesta a tratamiento baja, y una tendencia entre el grupo estable con respuesta a tratamiento baja y el grupo activo con una respuesta a tratamiento medio ($p=0.066$).

A partir de los resultados del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos para los patrones de expresión de los genes involucrados en rutas claves que presentaron significancia estadística ($p < 0.05$) en piel de pacientes antes de tratamiento, fueron obtenidos **5 potenciales genes** con utilidad predictiva, siendo **DCT, CCBL2 y MC1R los mejores candidatos para predecir respuesta a tratamiento, y el último actividad del vitiligo** (tablas 36 y 37).

Tabla 36: Genes predictores de acuerdo al grado de repigmentación considerando tres grupos de respuesta a tratamiento.

			Grado de Repigmentación		
Ruta	Gen	Tejido origen	Bajo 10%	Entre 10.1-29.9%	Mayor igual a 30%
Pigmento	DCT	Vitiligo	↓	↑	
			↓	-	↑
	TYRP1	Vitiligo	↓	↑	-
Respuesta estrés Oxidativo	CCBL2	Normal	-	↑	↓
	GPD1	Vitiligo	↓	-	↑

Las flechas ↓↑ indican mayor o menor expresión respectivamente.

Como se puede observar en las tablas, los genes candidatos con potencial valor predictivo están involucrados en las rutas de Pigmentación tanto al considerar el grado de respuesta a tratamiento (tabla 36), así como al estratificar el grado de repigmentación de acuerdo al tipo de vitiligo (activo o estable) (tabla 37).

Tabla 37: Gen predictor de acuerdo al grado de repigmentación considerando seis grupos de respuesta a tratamiento.

Ruta	Gen	Tejido origen	Grado de Repigmentación					
			Bajo 10%		Entre 10.1-29.9%		Mayor igual a 30%	
			Activo	Estable	Activo	Estable	Activo	Estable
Pigmento	MC1R	Normal	↓	↑	-	-	-	-
			↓	-	-	↑	-	-
			-	-	-	↑	↓	-

Las flechas ↓↑ indican mayor o menor expresión respectivamente.

Por otra parte se puede ver la participación de respuesta al estrés oxidativo en el grado de repigmentación, al considerar los tres grupos principales de respuesta a tratamiento independiente del tipo de vitiligo presente en los pacientes (tabla 36).

4.6.3. Análisis de expresión y respuesta a tratamiento *BaseSpace de Illumina*

El análisis bioinformático de los resultados de expresión utilizando la aplicación *TruSeq Targeted RNA* disponible en *BaseSpace Illumina*, permitió detectar patrones de expresión diferencial de algunos de los genes seleccionados en este estudio en la muestras obtenidas antes de tratamiento, los cuales fueron agrupados para su análisis considerando nuevamente el tipo de vitiligo y el grado de respuesta experimentado frente al tratamiento UVB-nb (tabla 26).

En las tablas 38 a 43, se describe el tipo de comparación realizada, el o los genes que presentaron expresión diferencial ($p \leq 0.05$) y los conteos detectados de número de mensajeros para el gen en cuestión, entre los grupos comparados.

Para el análisis realizado en el grupo de sujetos con vitiligo estable se pudo observar que, al comparar el grupo que presentó una baja respuesta a tratamiento (conteo normalizado 1) contra el grupo que presentó una respuesta a tratamiento media (conteo normalizado 2), el gen *MLANA*, involucrado en la biogénesis del melanosoma se encuentra sobre expresado en el grupo que presentó una menor respuesta con respecto a su contraparte (tabla 38).

Tabla 38: Análisis de expresión en pacientes con vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs media)

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces de cambio	p-val	q-val
6725802	MLANA	2.5	0.3	1.10E-01	2.02E-05	5.87E-04

Una situación similar, en cuanto a patrones de expresión para los genes CSNK1G3, BAX, CFLAR y MAPK1, fue observada al comparar el grupo que presentó una respuesta a tratamiento baja (conteo normalizado 1) contra el grupo que presentó una respuesta a tratamiento alta (conteo normalizado 2). Como se puede apreciar en la tabla 39, los genes CSNK1G3, BAX, CFLAR y MAPK1 presentaron patrones de expresión mayor en el grupo de baja respuesta a tratamiento con respecto a su contraparte que presentó alta respuesta. Este grupo de genes participan principalmente en el control de la apoptosis y sobrevivencia de la célula, además de mecanismos de señalización celular.

Por otra parte, se observó una disfunción en la producción de pigmento en este tejido lo que se ve reflejado en bajos niveles de mensajeros detectados para TYRP1 y DCT, involucrados en la producción de la melanina (tabla 39).

Al realizar la comparación de los patrones de expresión de pacientes con vitiligo estable, que presentaron respuesta a tratamiento media (conteo normalizado 1) contra los que presentaron una respuesta alta (conteo normalizado 2) (tabla 40) nuevamente se observan patrones de expresión mayores en genes involucrados en sobre vida de la célula y apoptosis (CSNK1G3, BAX, BCL3 y CASP8) en el grupo que experimentó una menor respuesta a tratamiento y, a diferencia de lo observado para el grupo con respuesta a tratamiento baja (tabla 39), encontramos que la expresión del gen DCT involucrado en la generación del pigmento es mayor que su contraparte (tabla 40).

Tabla 39: Análisis de expresión en pacientes con vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs alta)

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces de cambio	p-val	q-val
6799676	TYRP1	58.7	103.5	1.80E+00	1.12E-03	3.40E-02
6626480	CSNK1G3	456.7	227.3	5.00E-01	4.18E-03	6.10E-02
6602880	DCT	0.3	23.3	8.12E+01	6.06E-03	6.10E-02
6728035	BAX	40.4	4.9	1.20E-01	1.90E-02	1.43E-01
6709279	CFLAR	755.6	489.1	6.50E-01	5.20E-02	2.35E-01
6638941	MAPK1	2546.7	1609.6	6.30E-01	5.60E-02	2.35E-01

Tabla 40: Análisis de expresión en pacientes con vitiligo estable de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (media vs alta)

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces de cambio	p-val	q-val
6626480	CSNK1G3	476.2	224.3	4.70E-01	4.48E-03	1.34E-01
6728035	BAX	42.2	4.8	1.10E-01	2.70E-02	1.86E-01
6793284	BCL3	416.8	235.6	5.70E-01	2.70E-02	1.86E-01
6847575	CASP8	718.2	366.5	5.10E-01	3.00E-02	1.86E-01
6602880	DCT	47.4	23	4.90E-01	3.10E-02	1.86E-01

En cuanto al análisis realizado en el grupo de sujetos con vitiligo activo se pudo observar que, al comparar el grupo que presentó una respuesta a tratamiento baja (conteo normalizado 1) contra el grupo que presentó una respuesta a tratamiento media (conteo normalizado 2), los patrones de expresión de los genes involucrados en la pigmentación de la piel TYRP1, DCT y MLANA, se encuentra sub expresados en el grupo que presentó una menor respuesta con respecto a su contraparte (tabla 41). Cabe recordar que dentro del grupo con respuesta baja nos encontramos con sujetos que no respondieron a tratamiento, dando cuenta del bajo nivel de expresión en los genes participantes en los mecanismos de pigmentación de la piel en estos pacientes.

En el caso de la comparación realizada entre los patrones de expresión de pacientes con vitiligo activo que presentaron respuesta a tratamiento media (conteo normalizado 1) contra los que presentaron una respuesta alta (conteo normalizado 2) se observó para este último grupo una tendencia a activación de la pigmentación, lo que se ve reflejado en conteos mayores de mensajeros de TYRP1, disminución de la activación de mecanismo de apoptosis (bajos conteos de Caspasas 7 y 8 en el grupo con alta respuesta a tratamiento), y un aumento en el patrón de expresión del gen GPD1, que puede estar relacionado con respuesta al estrés oxidativo experimentado por las células de la epidermis de estos pacientes, que incluso puede ser inducida por la fototerapia (tabla 42).

Tabla 41: Análisis de expresión en pacientes con Vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs media).

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces de cambio	p-val	q-val
6799676	TYRP1	9.3	751.1	8.04E+01	1.06E-05	3.19E-04
6602880	DCT	9.9	234.2	2.37E+01	8.39E-03	1.19E-01
6725802	MLANA	2.7	108.9	4.06E+01	1.20E-02	1.19E-01

Tabla 42: Análisis de expresión en pacientes con vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (baja vs alta).

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces d cambio	p-val	q-val
6847575	CASP8	641.8	265.3	4.10E-01	4.42E-03	1.33E-01
6829414	GPD1	909.1	1660.8	1.80E+00	2.00E-02	2.94E-01
6799676	TYRP1	9	68.1	7.60E+00	7.10E-02	4.06E-01
6688022	CASP7	136.4	31	2.30E-01	7.20E-02	4.06E-01

En el caso de los conteos detectados en los genes TYRP1 y CASP7 existe una tendencia a diferencia ($p \leq 0.07$) entre los grupos comparados.

Finalmente, al realizar la comparación de los patrones de expresión de pacientes con vitiligo activo que presentaron una respuesta a tratamiento media (conteo normalizado 1) contra los que presentaron una respuesta alta (conteo normalizado 2) (tabla 43) observamos que patrones de expresión son significativamente menores en los genes involucrados en la pigmentación (TYRP1 y DCT) en el grupo que experimentó una mayor respuesta a tratamiento y, a diferencia de lo observado para el grupo con respuesta a tratamiento medio (tabla 41), encontramos que la expresión del gen GPD1 involucrado en la respuesta ante el estrés oxidativo es mayor que su contraparte.

Tabla 43: Análisis de expresión en pacientes con vitiligo activo de acuerdo al grado de respuesta a tratamiento (media vs alta).

Id Ensayo	gen	Conteo Normalizado 1	Conteo Normalizado 2	Veces de cambio	p-val	q-val
6799676	TYRP1	676	63.9	9.50E-02	6.68E-04	2.00E-02
6602880	DCT	210.7	43.4	2.10E-01	9.19E-03	1.18E-01
6829414	GPD1	445.9	1558.1	3.50E+00	1.20E-02	1.18E-01

V. DISCUSIÓN

Considerando los resultados obtenidos producto de las investigaciones antes mencionadas y las de nuestro propio grupo de investigación, fueron seleccionados un grupo de genes involucrados en el mecanismo de pigmentación de la piel, proceso de apoptosis y sobrevivencia de la célula, estrés oxidativo y mecanismo de traducción de señales, con la finalidad de identificar en la piel de pacientes con vitiligo sometidos a tratamiento con fototerapia UVB-nb, cambios en los patrones de expresión de estos genes, con utilidad pronóstica de respuesta a tratamiento. Hasta el momento de realizado este proyecto de tesis no había sido estudiada la relación existente entre los patrones de expresión de un grupo de marcadores genéticos participantes en las principales rutas comprometidas en el vitiligo, presentes en la piel de pacientes afectados por esta patología y la respuesta experimentada frente a tratamientos estándar para esta enfermedad.

5.1. Respuesta a tratamiento UVB-nb experimentado por los pacientes

Para ello fue aplicado durante 6 meses tratamiento correspondiente a fototerapia UVB-nb, que ha sido considerado como el tratamiento de primera elección en los casos de vitiligo generalizado, y en particular del vitiligo (27).

Como se pudo observar en los pacientes sometidos a tratamiento la evaluación realizada por 2 dermatólogos reveló que, de los 45 sujetos incluidos en el análisis de expresión, 42 mostraron algún grado de respuesta a tratamiento (tabla 26 y 27). Los tres sujetos que no presentaron repigmentación luego de tratamiento presentaban vitiligo en su forma Activa (6.67%). En estos casos se

pudo observar que estos sujetos presentaron inicio de la enfermedad antes de los 18 años de edad y con más de 10 años de evolución de la enfermedad. Resultados similares han sido observados en los estudios realizados por Kumar Y *et al* (2009) y Chen G *et al* (2005) (90, 91), con un elevado porcentaje de respuesta con este tipo de tratamiento; no obstante en este último no describen el tipo de vitiligo o actividad de la enfermedad que presentaban los pacientes que mostraron una nula respuesta al tratamiento.

5.2. Análisis de expresión mediante secuenciación masiva de ARNm *TruSeq* de *Illumina*

Por otra parte, el análisis de expresión permitió determinar la existencia de cambios en los patrones de expresión existentes entre las muestras provenientes de piel pigmentada y con vitiligo antes de tratamiento, en la piel repigmentada y la que no repigmentó una vez concluido el tratamiento con fototerapia UVB-nb, y entre las muestras antes y después de tratamiento. Como se pudo apreciar en los mapas de calor generados a partir de los resultados de expresión obtenidos mediante secuenciación masiva de ARN *TruSeq* de *Illumina* (figs. 15 y 16), la piel que experimenta repigmentación una vez concluido el tratamiento presentó patrones de expresión similar a la piel con pigmento de los pacientes obtenida al inicio del protocolo de investigación. Una situación similar fue observada en los patrones de expresión de la piel afectada por vitiligo antes de tratamiento y la piel que no repigmentó una vez concluido los 6 meses de tratamiento. Al comparar los distintos tipos de piel, antes y después de tratamiento, se pudo observar en aquellas que no presenta pigmento mostraron patrones de expresión reducidos en los genes *MLANA*, *DCT* y

TYRP1, todos ellos involucrados en el proceso de pigmentación de la piel, en comparación con las presentes en sus contrapartes pigmentadas. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Salinas M en su tesis de Doctorado (2012) (35) y con los resultados descritos por Regazzetti C *et al* (2015)(92), quienes validaron un grupo de genes mediante PCR en tiempo real, encontrando bajos niveles de expresión de MLANA, DCT y TYRP1 en piel proveniente de lesiones de vitiligo, en comparación con piel perilesional y no lesionada (pigmentada) de pacientes.

5.3. Análisis estadístico

5.3.1. Prueba T de Student

En cuanto al análisis estadístico de los patrones de expresión obtenidos de las muestras de piel antes y después de tratamiento, se encontraron alteraciones en patrones de expresión en genes relacionados con pigmentación de la piel, apoptosis y sobre vida celular, estrés oxidativo y mecanismo de traducción de señales.

Con respecto al proceso de pigmentación de la piel, nuevamente se han observado patrones de expresión bajos en piel que no presentó pigmento en 5 de los 7 genes incluidos en este estudio, correspondientes a MLANA, DCT y TYRP1 como ya fue mencionado con anterioridad, además de bajos patrones de expresión en los genes MC1R y MC4R.

Estos últimos dos genes corresponden a los receptores de melanocortinas 1 y 4, que en conjunto con POMC en la piel forman parte del eje Hipotálamo-Hipófisiario-Adrenal, que opera como un coordinador y ejecutor de las respuestas al estrés.(32)

Kingo K *et al* (2007) publicaron los resultados del análisis de los patrones de expresión de genes participantes del sistema de la melanocortina, en biopsias de piel obtenidas de lesiones sin

pigmento y piel pigmentada de pacientes con vitiligo; estos fueron comparados con los patrones de expresión de muestras de piel de sujetos sanos, demostrando que la proopiomelanocortina y sus receptores están disminuidos en la piel lesionada comparados con la piel sana de pacientes con vitiligo y controles. (32) Recientemente Nagui NA *et al* (2015) observaron que los patrones de expresión para los genes de MC1R y POMC eran bajos en piel no pigmentada proveniente de la lesión de vitiligo, al analizar solamente los patrones de expresión de los receptores MC1R, MC4R y POMC. (88)

A diferencia de lo realizado por Kingo K *et al* en sus trabajos publicados en los años 2007 y 2008 (32, 33), en el cual su enfoque fue analizar los perfiles de expresión de genes involucrados en la pigmentación en biopsias de piel de pacientes que presentaban lesión de vitiligo y piel pigmentada, en comparación con los niveles de expresión observados en piel de sujetos control normales, sin mediar tratamiento, nuestros resultados corresponden al perfil de expresión de un grupo de genes participantes en 5 rutas de señalización celular en la que se incluye la de pigmentación, pero en biopsias de piel de pacientes obtenidas antes y después de tratamiento UVB-nb.

Al analizar el ARN total obtenido de cada una de las biopsias obtenidas de los pacientes, se observó cambios en los perfiles de expresión en la mayoría de los genes seleccionados para cada ruta incluida. En el caso de la pigmentación, los genes que presentaron perfiles de expresión diferentes en las biopsias analizadas antes y después de tratamiento fueron DCT, MC1R, MC4R, MLANA y TYRP1. Las diferencias fueron detectadas través de la comparación de medias de los perfiles de expresión, principalmente al comparar biopsias de piel con pigmento (piel

pigmentada antes de tratamiento y piel que repigmentó) vs biopsias sin pigmento (biopsia de piel con vitiligo y biopsias de piel que no repigmentó después de tratamiento). Además se pudo observar que en la mayoría de los casos no existían diferencias estadísticamente significativas entre las biopsias con pigmento incluidas, obtenidas antes y después de aplicar la fototerapia, mismo fenómeno que fue observado entre las biopsias sin pigmento, indicando que, una vez aplicado el tratamiento, el perfil de expresión de la piel experimentó cambios que favorecieron la manifestación del fenotipo final de esta. Principalmente se pudo observar que en la piel que recuperó la pigmentación, los patrones de expresión fueron similares o ligeramente superiores en los genes del pigmento.

Los resultados de expresión obtenidos en este trabajo en genes participantes en la pigmentación, reafirman lo obtenido por Kingo K et al (2007, 2008)(32, 33) en biopsias antes de tratamiento y concuerdan con lo previamente propuesto por Nagui NA et al (2015)(88) en las rutas de pigmento. Sin embargo descartamos la participación de POMC en el proceso, debido a que no fue encontrada diferencia estadísticamente significativa en el perfil de expresión de las diferentes biopsias analizadas.

A partir de estos resultados ratificamos su importante participación en el proceso de pigmentación, y destacamos la importancia de MC1R en la patogénesis del vitiligo.

En cuanto a los genes involucrados en el mecanismo de la apoptosis, dos de los once genes analizados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$): cistein proteasa 3 (CASP3) que es procesada por las caspasas 8, 9 y 10, y que participa en la ejecución de la cascada de señalización de la

apoptosis celular, activando las caspasas 6, 7 y 9; y el del gen del miembro 1A de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRS1A) que induce señal de muerte celular por caspasa 8 (tabla 17). En ambos casos, estos genes se encuentran ligeramente sobre expresados en piel con vitiligo, indicando la posibilidad de que la piel afectada por vitiligo se deba a la inducción de un mecanismo extrínseco de Apoptosis.

Kumar R *et al* (2011) en su estudio observaron un incremento en los niveles de CASP3 en melanocitos provenientes de muestras con vitiligo inestable que, a través de cultivo de melanocitos y utilizando técnicas de cultivo celular e inmunofluorescencia. (93)

Para el gen TNFRS1A no ha sido publicado hasta el momento alteraciones en los niveles de expresión en los distintos tipos de piel de pacientes con vitiligo.

Por otra parte, en los genes relacionados con la sobrevida celular sólo dos de los cuatro genes seleccionados mostraron algún patrón de expresión diferencial entre los tipos de piel analizados ($p < 0.05$). Entre ellos se observa que el gen CDC5L involucrado en el control del ciclo celular y el gen MITF que controla la expresión de genes relacionados con la síntesis de melanina y sobrevida del melanocito, presentaron patrones de expresión en promedio mayores para los tejidos pigmentados (normal y repigmentada) en comparación con los tejidos con vitiligo y no repigmentados después de tratamiento (tablas 20 y 21). Una observación similar fue publicada por Kingo K *et al* (2008) para el gen MITF mediante análisis de expresión por PCR en tiempo real. En su trabajo describe que este gen presenta patrones de expresión mayor en piel proveniente de controles sanos y piel pigmentada de pacientes con vitiligo, en comparación con la piel despigmentada

de lesiones de vitiligo. (33) En cuanto al gen CDC5L, se observó una disminución en su patrón de expresión en la piel que repigmentó después de tratamiento en comparación con sus contrapartes, sin embargo hasta el momento no había sido descrita su participación en vitiligo.

Para los genes participantes en respuesta al estrés oxidativo (tabla 22), se pudo observar que el gen GPD1 que participa en el metabolismo de oxido-reducción (redox) de la célula se encuentra sobre expresado en tejido no-repigmentado luego de tratamiento. En cuanto al gen TXN que participa en la inhibición del estrés oxidativo y la activación de la caspasa 3, se sobre expresa en tejido con vitiligo y no repigmentado, dando cuenta de la posible activación de mecanismo de respuesta frente a la apoptosis y al estrés oxidativo generado por los mecanismos de muerte celular.

Hasta la fecha sólo han sido publicados cambios en los niveles de la proteína TXN presentes en piel de pacientes (94), y su relación con el control de la producción de especies reactivas de oxígeno y daño UV. (95)

En cuanto al gen GPD1, hasta el momento no había sido explorada su participación en el control del estrés oxidativo en vitiligo.

Finalmente, en cuanto a los mecanismos de traducción de señales, ya ha sido descrita recientemente la participación de la vía WNT en el proceso de diferenciación de los melanocitos, y su participación en el desarrollo del vitiligo. (92) Sin embargo, en nuestro estudio sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los patrones de expresión observados para el gen CSNK1G3. El producto de este gen es una serina/treonina cinasa que fosforila una serie de proteínas involucradas en la vía WNT, participando en procesos celulares importantes como reparación

del ADN, división celular, localización nuclear y transporte a través de la membrana. Como se pudo observar en las tablas 24 y 25, el incremento en los niveles de expresión de piel con vitiligo puede deberse, entre otros procesos, a la activación de mecanismos de reparación del ADN en células dañadas melanocitos/queratinocitos. Por otra parte se observó una disminución de la expresión de este gen en la piel que no repigmentó luego de tratamiento, lo que puede dar cuenta de una disminución de los mecanismos celulares de diferenciación del melanocito y reparación del ADN en las células dañadas de piel afectada por vitiligo.

5.3.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de respuesta a tratamiento

5.3.2.1. Parámetros clínicos

El análisis de varianza realizado, considerando la respuesta a tratamiento experimentada por los pacientes, permitió observar que existe asociación entre los niveles de TSH y una baja respuesta a tratamiento (tablas 28 y 29). En este caso, en los sujetos presentaron una pobre respuesta a tratamiento los niveles de esta hormona se encontraron elevados (2.277 ± 0.688 ml U/L) en comparación con el grupo de pacientes que presentaron una respuesta a tratamiento alta (1.645 ± 0.767 ml U/L). Al respecto, es conocida la asociación entre problemas de la tiroides y desarrollo del vitiligo, principalmente en personas que presentan hipotiroidismo (96), apoyando la teoría de disfunción de la tiroides y participación de procesos autoinmunes en el desarrollo de esta patología.(97)

A través del mismo análisis, se encontró relación entre peso elevado de los pacientes y una baja respuesta a tratamiento (tabla 30). Una situación similar fue observada al utilizar el tipo de vitiligo (activo o estable) como parte de la variable de agrupación de respuesta a tratamiento, donde se generan 6 grupos de análisis de respuesta a tratamiento: bajo, medio y alto por vitiligo activo y vitiligo estable (tabla 26). Además de ser considerada la obesidad como una enfermedad inflamatoria, en la que ocurre la activación del sistema inmune en el tejido adiposo (98), en la actualidad es creciente la asociación entre los problemas de sobrepeso en la población y una serie de patologías de origen autoinmune como diabetes mellitus, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, problemas de autoinmunidad de la tiroides, entre otras enfermedades (99), muchas de las cuales ya han sido asociadas con el vitiligo (3, 22), aunque hasta la fecha no se ha descrito una asociación directa entre el desarrollo de vitiligo, su respuesta a tratamiento y el sobrepeso u obesidad, puede existir relación entre los factores nutricionales en los pacientes con sobrepeso que influyan en la manifestación del vitiligo y la respuesta a tratamiento que estos experimentan.

5.3.2.2. Perfiles de expresión

En cuanto al análisis de patrones de expresión, hasta el momento no se han publicado estudios que analicen cambios de expresión génicos en piel de pacientes con vitiligo después del tratamiento con fototerapia UVB-nb.

Al comparar los promedios de los patrones de expresión de los genes seleccionados en este estudio, en los distintos tipos de muestras de piel analizadas y considerando la respuesta a

tratamiento, se pudo detectar una interesante asociación estadística con los patrones de expresión de los genes:

- DCT y TYRP1 (en muestras de piel con vitiligo antes de tratamiento), ambos relacionados con el proceso de pigmentación de la piel, quienes presentaron patrones de expresión menores en el grupo que mostró una baja respuesta a tratamiento. Esto tiene una relación directa con bajos niveles en la producción de melanina y por ende una baja repigmentación en estos pacientes.
- CASP3 (en muestras de piel que no repigmentaron después de tratamiento) que participa en mecanismo de apoptosis, presentó en promedio patrones de expresión mayor en muestras provenientes de pacientes que presentaron una respuesta baja y media a tratamiento, en comparación con los que presentaron una alta respuesta al tratamiento UVB-nb (tablas 31 y 32), lo que puede dar cuenta una disminución en la activación de mecanismos de apoptosis en este grupo de sujetos, principalmente en los melanocitos y queratinocitos de la piel.
- CCBL2 (en muestra de piel normales antes de tratamiento) que participa en la respuesta al estrés oxidativo, se pudo observar que el grupo de pacientes que presentaron una respuesta a tratamiento media tuvieron patrones de expresión en promedio mayores para este gen en comparación con su contrapartes baja y alta respuesta (tablas 31 y 32), pudiendo reflejar un efecto de compensación frente al estrés en la piel de los pacientes

que experimentaron respuesta intermedia, el cual incluso puede ser inducido por el mismo tratamiento UVB-nb como ya ha sido publicado previamente. (100)

- GPD1 (en piel con vitiligo antes de tratamiento) involucrado en respuesta al estrés oxidativo, se observó tendencia de patrones de expresión diferencial ($p < 0.07$) entre los tres grupos de respuesta a tratamiento en estudio (tabla 32). Sin embargo, estos son en promedio mayores en los pacientes que presentaron una respuesta alta al tratamiento y, al igual que en el caso anterior puede reflejar un efecto de compensación frente al estrés en la piel de estos pacientes inducido por el mismo tratamiento UVB-nb como ya ha sido publicado previamente. (100)
- NFKB1 (en muestras de piel que repigmentaron después de tratamiento), gen involucrado en mecanismo de traducción de señales, se pudo observar patrones de expresión diferencial entre el grupo de pacientes que presentaron una respuesta a tratamiento bajo y el grupo con una alta respuesta (tabla 31 y 32). Sin embargo, el patrón de expresión para este gen fue mayor en el grupo con respuesta a tratamiento bajo; debido a la amplia participación de este gen en diferentes procesos celulares, podríamos suponer que su producto está actuando en la regulación de la apoptosis e inflamación, entre otros procesos, en el tejido de este grupo de sujetos.

De este grupo de genes, los que presentan una mayor relevancia estadística corresponden a DCT involucrado en el pigmento, y que

permite caracterizar los tres grupos de respuesta, y CCBL2 que participa en la respuesta al estrés oxidativo, permite caracterizar grupos de respuesta a tratamiento medio y alto.

5.3.2.3. Perfiles de expresión agrupados por actividad del vitiligo

En cuanto a los patrones de expresión obtenidos con diferencias estadísticamente significativas, al utilizar el tipo de actividad del vitiligo como parte de la variable de agrupación de la respuesta observada al tratamiento, sólo fueron observados patrones de expresión diferencial en los genes BAX, CFLAR, MC1R y WNT7A (tabla 32):

- BAX y CFLAR involucrados en mecanismo de apoptosis, se observó que los patrones de expresión medios detectados para el primero fueron altas en muestras de vitiligo estable que presentaron respuesta a tratamiento baja y media, detectados en tejido que repigmentó después de tratamiento, indicando la posibilidad de mecanismos de respuesta al estrés oxidativo en este tipo de piel. En el caso de CFLAR en piel que no repigmentó después de tratamiento, en paciente que presentaron vitiligo estable y una respuesta a tratamiento baja y media, mostraron patrones de expresión en promedio mayores que los restantes tipos de piel analizadas. Al igual que para BAX, esto puede dar cuenta de activación de mecanismo de respuesta al estrés en este tipo de piel.
- MC1R que participa en el mecanismo de pigmentación, en tejido normal antes de tratamiento, se observaron patrones de expresión en promedio elevados en pacientes con

vitiligo estable, en comparación con su contraparte activa cuya expresión fue menor. Esto puede ser relacionado con una mejor respuesta a tratamiento en los sujetos que presentan la forma estable de la enfermedad.

- Wnt7A, involucrado en mecanismo de señalización, se observó en piel que no repigmentó después de tratamiento diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en promedio mayores en el grupo de respuesta correspondiente a vitiligo estable. Esto pudiera dar cuenta de la activación de diferentes procesos celulares como diferenciación de melanocitos, o que su producto estén actuando en la regulación de procesos de apoptosis e inflamación, entre otros, en el tejido de este grupo de sujetos. También estos resultados correlacionan con la observación de incrementos en el patrón de expresión de CFLAR en este mismo tipo de piel y de pacientes, lo que implica una disminución del estrés oxidativo y un aumento de la expresión de WNT, como aportaron por Regazetti C *et al* (2015). (92)

Si bien fueron encontradas notorias diferencias en los patrones de expresión de los distintos tipos de piel analizadas, y contemplando biopsias obtenidas después de realizado el tratamiento UVB-nb, no obstante la finalidad de este estudio fue identificar genes con valor predictivo. Para ello sólo fueron considerados los patrones de expresión en la piel antes de aplicar tratamiento UVB-nb, a través de los cuales logramos observar que los genes con utilidad predictiva corresponden a (tablas 36 y 37):

- DCT y TYRP1, relacionados con la pigmentación.

- CCBL2 y GPD1, relacionados con la respuesta al estrés oxidativo

Y en el caso de contemplar el tipo de vitiligo como factor determinante en la respuesta a tratamiento se presenta como mejor candidato a:

- MC1R, relacionado con mecanismo de pigmentación de la piel.

5.3.3. Identificación de patrones de expresión con utilidad pronóstica mediante *TruSeq* de *Illumina*

Otro grupo de resultados fueron encontrados al analizar los patrones de expresión de la piel antes de tratamiento, utilizando la aplicación *TruSeq Targeted RNA* disponible en *BaseSpace Illumina*. Con esta fueron encontrados valores de expresión con utilidad pronostica en:

- Pacientes con vitiligo estable, en general presentaron patrones de expresión diferenciales en el grupo de baja respuesta, en comparación con su contraparte respuesta media en el gen *MLANA* relacionado con la biogénesis de los melanosomas, y con el grupo que presenta una respuesta alta con los genes *TYRP1* y *DCT* relacionados con el pigmento, los genes *CSNK1G3*, *BAX* y *CFLAR* relacionados con mecanismos de apoptosis, y el gen *MAPK1* relacionado con sobre vida de la célula, proliferación celular y diferenciación celular.
- Pacientes con vitiligo estable y una respuesta a tratamiento media en comparación con alta, se observa relación con genes de pigmentación (*DCT*) y algunos involucrados en

mecanismos de apoptosis (CSNK1G3, BAX, BCL3 y CASP8). En todos los casos los patrones de expresión fueron mayores en el grupo que presenta una respuesta media, indicando que en estos pacientes está operando el mecanismo de apoptosis, a la vez de una inducción de la pigmentación mediada por DCT.

En el caso de los genes participantes en los procesos de pigmentación DCT, MLANA y TYRP1, ya ha sido descrito alteraciones en los patrones de expresión en pacientes con vitiligo en los trabajos publicados por Kingo K *et al* (2008) y Regazzetti C *et al* (2015). Sin embargo en ambos estudios no es analizado el cambio de expresión de estos genes producido por tratamientos aplicados para esta enfermedad.

Con respecto a los genes implicados en el proceso de apoptosis celular BAX, BCL3, CASP8, CFLAR y CSNK1G3, y en el proceso de sobre vida de la célula MPAK1, no existen publicaciones previas que describan la existencia de cambios en sus patrones de expresión y su participación en el desarrollo de vitiligo estable, o su relación con la respuesta a tratamiento.

- Pacientes con vitiligo activo y respuestas a tratamiento baja y media, sólo se observa alteración de patrones de expresión en genes relacionados con el proceso de pigmentación. En el grupo de baja respuesta se observó que TYRP1, DCT y MLANA presentaron notoriamente patrones de expresión menor, lo que da cuenta de la falta de pigmentación y por lo tanto, de una pobre respuesta a tratamiento.

- Pacientes con vitiligo activo y respuesta a tratamiento baja y alta, se encuentra disminuido en el grupo de respuesta media el gen TYRP1, dando cuenta esto de la baja respuesta de pigmentación frente a su contraparte, además de observarse en este mismo tipo de piel un incremento en la expresión de los genes CASP7 y 8 que participan en el mecanismo de apoptosis. Además GPD1 se encuentra disminuido en este grupo, lo que puede dar cuenta de una pobre respuesta al estrés oxidativo, y por ende activación de la apoptosis.
- Pacientes con vitiligo activo con respuesta a tratamiento media y alta, se observa patrones de expresión en promedio mayores para los genes relacionados con la pigmentación de la piel DCT y TYRP1 en los pacientes que mostraron una respuesta media, posiblemente debido a un proceso de inducción de la pigmentación, pero, en el caso de la respuesta al estrés oxidativo, al igual que en la comparación con el grupo de respuesta bajo y alto, el patrón de GPD1 fue menor.

En cuanto a los genes participantes en el proceso de pigmentación de la piel, DCT, MLANA y TYRP1, en el caso del vitiligo activo fue observada una situación similar que lo descrito previamente para los pacientes con vitiligo estable. En general, los pacientes que presentan una respuesta pobre a tratamiento presentan patrones de expresión baja para estos genes, y hasta el momento no existen trabajos de otros grupos de investigación que mencionen este tipo de hallazgo.

Finalmente la alteración en los niveles de CASP8 (participante en mecanismo de apoptosis y que se encuentra sobre expresados en la

piel de pacientes que presentan una pobre respuesta al tratamiento), sólo ha sido descrita mediante análisis por *Western Blot* en el estudio realizado por Lee A *et al* (2004)(101) en epidermis despigmentada en comparación con epidermis normal de pacientes con vitiligo, y al igual que para los otros genes, no se analiza su relación con la respuesta a tratamiento.

En ambos análisis, los realizados mediante ANOVA y *TruSeq* de *Illumina*, se pudo observar patrones de expresión alterados en genes participantes en las rutas de pigmentación de la piel (DCT, TYRP1, MC1R y MLANA), regulación del estrés oxidativo (CCBL2 y GPD1), apoptosis (CSNK1G3, BAX, BCL3 CFLAR, CASP7 y CASP8) y la ruta de las MAP Cinasas (MAPK1) relacionada con la proliferación y diferenciación celular, en este caso de los melanocitos.

VI. CONCLUSIONES

1. La mayoría nuestros pacientes desarrollaron vitiligo antes de los 30 años, y el desarrollo de la enfermedad tuvo relación con antecedentes familiares de la patología u otras de naturaleza inmune.
2. Se confirmó que la fototerapia UVB-nb produjo cambios significativos en los patrones de expresión de ciertos genes analizados, relacionados principalmente con el proceso de repigmentación y apoptosis celular.
3. Se identificó que elevados niveles de TSH y un elevado peso en los pacientes puede conducir a una pobre respuesta al tratamiento UVB-nb,
4. El análisis de expresión permitió detectar mayoritariamente diferencias significativas en los patrones de expresión de los genes DCT, MLANA y TYRP1 en la piel con pigmento (normal y repigmentada), en comparación con piel despigmentada (piel con vitiligo y que no repigmentó después de tratamiento).
5. No se observan diferencias significativas claras entre los patrones de expresión de vitiligo activo vs vitiligo estable mediante análisis de expresión secuenciación masiva de ARNm *Truseq* de *Illumina*.
6. Fue obtenido un grupo de genes con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento, relacionados con la pigmentación (Dopacromo tautomerasa, DCT), y relacionados con la respuesta al estrés oxidativo (Cysteine Conjugate-Beta Lyase 2, CCBL2).

7. En el caso de considerar el tipo de vitiligo como factor determinante en la respuesta a tratamiento, el gen MC1R, puede ser de utilidad para diferenciar la respuesta entre grupos activos y estables.

8. El análisis utilizando la aplicación *TruSeq Targeted RNA* de *Illumina*, nos ha sugerido como potenciales genes con utilidad pronóstica de respuesta a tratamiento, a los participantes en las rutas de pigmentación de la piel (DCT, TYRP1 y MLANA), regulación del estrés oxidativo (GPD1), apoptosis (CSNK1G3, BAX, BCL3 CFLAR, CASP7 y CASP8) y la ruta de las MAP Cinasas (MAPK1) relacionada con la proliferación y diferenciación celular, en este caso de los melanocitos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sehgal VN, Srivastava G. Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features. Indian journal of dermatology, venereology and leprology. 2007 May-Jun; 73(3):149-56.
2. Njoo MD, Spuls PI, Bos JD, Westerhof W, Bossuyt PM. Nonsurgical repigmentation therapies in vitiligo. Meta-analysis of the literature. Archives of dermatology. 1998 Dec; 134(12):1532-40.
3. Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. Journal of dermatological science. 2006 Jan; 41(1):3-10.
4. Vázquez-Martínez OT, Velásquez-Arenas L, Méndez-Olvera N, Ocampo-Candiani J. Vitiligo. Overview and current therapeutics. . DCMQ 2006; 3.
5. Steiner D, Bedin V, Brito M, Tadeu R, Steiner T. Vitiligo. An bras Dermatol. 2004; 79(3):335-51.
6. Parsad D, Dogra S, Kanwar AJ. Quality of life in patients with vitiligo. Health and quality of life outcomes. 2003; 1:58.
7. Moretti S. Vitiligo. Orphanet Encyclopedia. 2003:6.
8. Lerner AB, Nordlund JJ. Vitiligo. What is it? Is it important? Jama. 1978 Mar 20; 239(12):1183-7.

9. Taieb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res.* 2007 Feb; 20(1):27-35.
10. Halder RM, Chappell JL. Vitiligo update. *Seminars in cutaneous medicine and surgery.* 2009 Jun; 28(2):86-92.
11. Nordlund JJ, Majumder PP. Recent investigations on vitiligo vulgaris. *Dermatologic clinics.* 1997 Jan; 15(1):69-78.
12. Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2010 Oct; 24(10):1144-50.
13. Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Archives of dermatology.* 1977 Jan; 113(1):47-52.
14. Canizares O. Geographic dermatology: Mexico and Central America. The influence of geographic factors on skin diseases. *Archives of dermatology.* 1960 Dec; 82:870-93.
15. Ruiz-Maldonado R. Epidemiología de las enfermedades de la piel en la ciudad de México (Doctoral dissertation. Tesis para Médico Cirujano UNAM). 1964.
16. Ruiz-Maldonado R, Tamayo Sanchez L, Velazquez E. [Epidemiology of skin diseases in 10,000 patients of pediatric age]. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* 1977 Jan-Feb; 34(1):137-61.

17. Ocampo-Candiani J, González-González S, Jaramillo Moreno G, Sobrevilla-Ondarza S, Luna-Gurrola C, Hernández-Báez A. Teledermatología universitaria en Nuevo León. *Dermatología Rev Mex.* 2007; 51(3):3.
18. Zhang XJ, Chen JJ, Liu JB. The genetic concept of vitiligo. *Journal of Dermatological Science.* 2005 Sep; 39(3):137-46.
19. Huggins RH, Janusz CA, Schwartz RA. Vitiligo: a sign of systemic disease. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.* 2006 Jan-Feb; 72(1):68-71.
20. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine.* 2007 Mar 22; 356(12):1216-25.
21. Allam M, Riad H. Concise review of recent studies in vitiligo. *Qatar Medical Journal.* 2013; 2013(2):1-19.
22. Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Research.* 2007 Aug; 20(4):271-8.
23. Tazi-Ahnini R, McDonagh AJ, Wengraf DA, Lovewell TR, Vasilopoulos Y, Messenger AG, et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. *The British Journal of Dermatology.* 2008 Sep; 159(3):591-6.
24. Shajil EM, Chatterjee S, Agrawal D, Bagchi T, Begum R. Vitiligo: pathomechanisms and genetic polymorphism of susceptible genes. *Indian J Exp Biol.* 2006 Jul; 44(7):526-39.

25. Hann SK, Lee HJ. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996 Nov; 35(5 Pt 1):671-4.
26. Attili VR, Attili SK. Segmental and generalized vitiligo: both forms demonstrate inflammatory histopathological features and clinical mosaicism. *Indian Journal of Dermatology*. 2013 Nov; 58(6):433-8.
27. Majid I. Vitiligo Management: An Update. *British Journal of Medical Practitioners*. 2010; 3(3):6.
28. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011 Sep; 65(3):473-91.
29. Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, Gani AR, Ansarullah M, Ramachandran AV, et al. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Experimental Dermatology*. 2013 Apr; 22(4):245-50.
30. Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, Hjalgrim H, Hoier-Madsen M. High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo. *Acta dermato-venereologica*. 1994 Mar; 74(2):120-3.
31. Zhang XJ, Liu JB, Gui JP, Li M, Xiong QG, Wu HB, et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004 Sep; 51(3):383-90.

32. Kingo K, Aunin E, Karelson M, Philips MA, Ratsep R, Silm H, et al. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. *Journal of dermatological science*. 2007 Nov; 48(2):113-22.
33. Kingo K, Aunin E, Karelson M, Ratsep R, Silm H, Vasar E, et al. Expressional changes in the intracellular melanogenesis pathways and their possible role in the pathogenesis of vitiligo. *Journal of Dermatological Science*. 2008 Oct; 52(1):39-46.
34. Stromberg S, Bjorklund MG, Asplund A, Rimini R, Lundeberg J, Nilsson P, et al. Transcriptional profiling of melanocytes from patients with vitiligo vulgaris. *Pigment cell & melanoma research*. 2008 Apr; 21(2):162-71.
35. Salinas-Santander M. Análisis del perfil de expresión de pacientes con vitiligo. (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). 2012.
36. Lee AY. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. *Annals of dermatology*. 2012 May; 24(2):115-25.
37. McCurdy HM. Enzyme localization during melanogenesis. *The Journal of cell biology*. 1969 Nov; 43(2):220-8.
38. Slominski A, Ermak G, Wortsman J. Modification of melanogenesis in cultured human melanoma cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*. 1999 Nov-Dec; 35(10):564-5.
39. Gillbro JM, Marles LK, Hibberts NA, Schallreuter KU. Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor

signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2004 Aug; 123(2):346-53.

40. Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL, Slominski A, et al. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB journal.* 2007 Jun; 21(8):1844-56.

41. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB journal.* 2007 Apr; 21(4):976-94.

42. Erb P, Ji J, Wernli M, Kump E, Glaser A, Buchner SA. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunol Lett.* 2005 Aug 15; 100(1):68-72.

43. Moretti S, Fabbri P, Baroni G, Berti S, Bani D, Berti E, et al. Keratinocyte dysfunction in vitiligo epidermis: cytokine microenvironment and correlation to keratinocyte apoptosis. *Histol Histopathol.* 2009 Jul; 24(7):849-57.

44. Zhang Y, Liu L, Jin L, Yi X, Dang E, Yang Y, et al. Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: new insights into the destruction of melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan; 134(1):183-91.

45. Ständer S, Schwarz T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer. *The American Journal of dermatopathology.* 2005 Apr; 27(2):116-21.

46. Ayatollahi SA, Ajami M, Reyhanfard H, Asadi Y, Nassiri-Kashani M, Rashighi Firoozabadi M, et al. BCL-2 and Bax Expression in Skin Flaps Treated with Finasteride or Azelaic Acid. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2012 Fall; 11(4):1285-90.
47. Baltadzhiev IG, Delchev SD. Changes of Bcl-2, Bax and Caspase-3 expression in the dermal microvascular endothelial cells and the epidermal layers of the eschar (tache noire) in patients with Mediterranean spotted fever. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2013; 51(2):121-6.
48. Garcia M, Vecino E. [Intracellular pathways leading to apoptosis of retinal cells]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. 2003 Jul; 78(7):351-64.
49. Cecconi F, Roth KA, Dolgov O, Munarriz E, Anokhin K, Gruss P, et al. Apaf1-dependent programmed cell death is required for inner ear morphogenesis and growth. *Development*. 2004 May; 131(9):2125-35.
50. Kalra N, Roy P, Prasad S, Shukla Y. Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis. *Life sciences*. 2008 Feb 13; 82(7-8):348-58.
51. Ahamad MS, Siddiqui S, Jafri A, Ahmad S, Afzal M, Arshad M. Induction of Apoptosis and Antiproliferative Activity of Naringenin in Human Epidermoid Carcinoma Cell through ROS Generation and Cell Cycle Arrest. *PloSone*. 2014; 9(10):e110003.
52. Nordlund JJ, Lerner AB. Vitiligo. It is important. *Archives of dermatology*. 1982 Jan; 118(1):5-8.

53. Koga M. Vitiligo: a new classification and therapy. *British journal of dermatology*. 1977 Sep; 97(3):255-61.
54. Koga M, Tango T. Clinical features and course of type A and type B vitiligo. *British journal of dermatology*. 1988 Feb; 118(2):223-8.
55. Hann SK, Chang JH, Lee HS, Kim SM. The classification of segmental vitiligo on the face. *Yonsei medical journal*. 2000 Apr; 41(2):209-12.
56. Njoo MD, Das PK, Bos JD, Westerhof W. Association of the Kobner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. *Archives of dermatology*. 1999 Apr; 135(4):407-13.
57. Norris DA, Horikawa T, Morelli JG. Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 1994 Aug; 7(4):193-203.
58. Sahni K, Parsad D. Stability in Vitiligo: Is there a Perfect Way to Predict it? *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2013 Apr; 6(2):75-82.
59. Carsberg CJ, Warenus HM, Friedmann PS. Ultraviolet radiation-induced melanogenesis in human melanocytes. Effects of modulating protein kinase C. *Journal of cell science*. 1994 Sep; 107 (Pt 9):2591-7.
60. Bulat V, Situm M, Dediol I, Ljubicić I, Bradić L. The mechanisms of action of phototherapy in the treatment of the most common dermatoses. *Coll Antropol*. 2011; 35(suppl 2):5.

61. El Mofty M, Bosseila M, Mashaly HM, Gawdat H, Makaly H. Broadband ultraviolet A vs. psoralen ultraviolet A in the treatment of vitiligo: a randomized controlled trial. *Clinical and experimental dermatology*. 2013 Dec; 38(8):830-5.
62. Czajkowski R. Comparison of melanocytes transplantation methods for the treatment of vitiligo. *Dermatologic surgery*. 2004 Nov; 30(11):1400-5.
63. Mulekar SV. Long-term follow-up study of 142 patients with vitiligo vulgaris treated by autologous, non-cultured melanocyte-keratinocyte cell transplantation. *International journal of dermatology*. 2005 Oct; 44(10):841-5.
64. Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L. Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A. *Archives of dermatology*. 1997 Dec; 133(12):1525-8.
65. Hartmann A, Lohberg L, Keikavoussi P, Eichner S, Schuler G. Treatment of generalised vitiligo with tacrolimus 0.1% ointment vs. UVB intense pulsed light phototherapy: a pilot study. *Acta dermato-venereologica*. 2014 Sep; 94(5):585-7.
66. Kang HY, Choi YM. FK506 increases pigmentation and migration of human melanocytes. *British journal of dermatology*. 2006 Nov; 155(5):1037-40.
67. Seirafi H, Farnaghi F, Firooz A, Vasheghani-Farahani A, Alirezaie NS, Dowlati Y. Pimecrolimus cream in repigmentation of vitiligo. *Dermatology*. 2007; 214(3):253-9.

68. Shahzad A, Shahzad M, Khurshid K. Topical calcipotriol in dermatology. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*. 2006; 16:4.
69. Gauthier Y, Anbar T, Lepreux S, Cario-Andre M, Benzekri L. Possible mechanisms by which topical 5-Fluorouracil and dermabrasion could induce pigment spread in vitiligo skin: an experimental study. *ISRN dermatology*. 2013; 2013:852497.
70. Vazquez-Martinez OT, Martinez-Rodriguez HG, Velasquez-Arenas L, Banos-Gonzalez D, Ortiz-Lopez R, Padilla-Rivas G, et al. Treatment of vitiligo with a melanocyte-keratinocyte cell suspension versus dermabrasion only: a pilot study with a 12-month follow up. *Journal of drugs in dermatology*. 2011 Sep; 10(9):1032-6.
71. Chen YF, Yang PY, Hu DN, Kuo FS, Hung CS, Hung CM. Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: analysis of 120 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004 Jul; 51(1):68-74.
72. Olsson MJ, Juhlin L. Long-term follow-up of leucoderma patients treated with transplants of autologous cultured melanocytes, ultrathin epidermal sheets and basal cell layer suspension. *British journal of dermatology*. 2002 Nov; 147(5):893-904.
73. Savant SS. Therapeutic spot and regional dermabrasion in stable vitiligo. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 1996 May-Jun; 62(3):139-45.

74. Andreassi L, Pianigiani E, Andreassi A, Taddeucci P, Biagioli M. A new model of epidermal culture for the surgical treatment of vitiligo. *International journal of dermatology*. 1998 Aug; 37(8):595-8.
75. Mutalik S, Ginzburg A. Surgical management of stable vitiligo: A review with personal experience. *Dermatologic surgery*. 2000 Mar; 26(3):248-54.
76. Kaufmann R, Greiner D, Kippenberger S, Bernd A. Grafting of in vitro cultured melanocytes onto laser-ablated lesions in vitiligo. *Acta dermato-venereologica*. 1998 Mar; 78(2):136-8.
77. Njoo MD, Nieuweboer-Krobotova L, Westerhof W. Repigmentation of leucodermic defects in piebaldism by dermabrasion and thin split-thickness skin grafting in combination with minigrafting. *British journal of dermatology*. 1998 Nov; 139(5):829-33.
78. Olsson MJ, Juhlin L. Leucoderma treated by transplantation of a basal cell layer enriched suspension. *British journal of dermatology*. 1998 Apr; 138(4):644-8.
79. Gauthier Y, Surleve-Bazeille JE. Autologous grafting with noncultured melanocytes: a simplified method for treatment of depigmented lesions. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1992 Feb; 26(2 Pt 1):191-4.
80. Tegta GR, Parsad D, Majumdar S, Kumar B. Efficacy of autologous transplantation of noncultured epidermal suspension in two different dilutions in the treatment of vitiligo. *International journal of dermatology*. 2006 Feb; 45(2):106-10.

81. Mulekar SV. Melanocyte-keratinocyte cell transplantation for stable vitiligo. *International journal of dermatology*. 2003 Feb; 42(2):132-6.
82. Lahiri K. Evolution and evaluation of autologous mini punch grafting in vitiligo. *Indian journal of dermatology*. 2009; 54(2):159-67.
83. Singh KG, Bajaj AK. Autologous miniature skin punch grafting in vitiligo. *Indian journal of dermatology, Venereology and Leprology*. 1995 Mar-Apr; 61(2):77-80.
84. Njoo MD, Westerhof W, Bos JD, Bossuyt PM. A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. *Archives of dermatology*. 1998 Dec; 134(12):1543-9.
85. Guerra L, Capurro S, Melchi F, Primavera G, Bondanza S, Cancedda R, et al. Treatment of "stable" vitiligo by Timedsurgery and transplantation of cultured epidermal autografts. *Archives of dermatology*. 2000 Nov; 136(11):1380-9.
86. Mosher DB, Parrish JA, Fitzpatrick TB. Monobenzylether of hydroquinone. A retrospective study of treatment of 18 vitiligo patients and a review of the literature. *British journal of dermatology*. 1977 Dec; 97(6):669-79.
87. Cucchi ML, Frattini P, Santagostino G, Orecchia G. Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of nonsegmental vitiligo. *Pigment cell research*. 2000 Feb; 13(1):28-32.
88. Nagui NA, Mahmoud SB, Abdel Hay RM, Hassieb MM, Rashed LA. Assessment of gene expression levels of

proopiomelanocortin (POMC) and melanocortin-1 receptor (MC1R) in vitiligo. *Australasian journal of dermatology*. 2015 Oct 6.

89. Santa Cruz FJ. Vitiligo. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 2003; Julio-Agosto:46(4):152-156.

90. Kumar YH, Rao GR, Gopal KV, Shanti G, Rao KV. Evaluation of narrow-band UVB phototherapy in 150 patients with vitiligo. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2009 Mar-Apr; 75(2):162-6.

91. Chen GY, Hsu MM, Tai HK, Chou TC, Tseng CL, Chang HY, et al. Narrow-band UVB treatment of vitiligo in Chinese. *The Journal of dermatology*. 2005 Oct; 32(10):793-800.

92. Regazzetti C, Joly F, Marty C, Rivier M, Mehul B, Reiniche P, et al. Transcriptional Analysis of Vitiligo Skin Reveals the Alteration of WNT Pathway: A Promising Target for Repigmenting Vitiligo Patients. *The Journal of investigative dermatology*. 2015 Dec; 135(12):3105-14.

93. Kumar R, Parsad D, Kanwar AJ. Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo. *The British journal of dermatology*. 2011 Jan; 164(1):187-91.

94. Schallreuter KU, Behrens-Williams S, Khaliq TP, Picksley SM, Peters EM, Marles LK, et al. Increased epidermal functioning wild-type p53 expression in vitiligo. *Experimental dermatology*. 2003 Jun; 12(3):268-77.

95. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Peters EM, Marles LK, et al. Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH₄) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH₄-dependent processes? *The Journal of investigative dermatology*. 2001 Jan; 116(1):167-74.
96. Gupta Y, Ammini AC. Vitiligo, hypothyroidism and cardiomyopathy. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012 May; 16(3):463-5.
97. Kasumagic-Halilovic E, Prohic A, Begovic B, Ovcina-Kurtovic N. Association between Vitiligo and Thyroid Autoimmunity. *Journal of Thyroid Research*. 2011; 2011.
98. Reyes J M. Características inflamatorias de la obesidad. *Revista chilena de nutrición*. 2010; 37:498-504.
99. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmunity reviews*. 2014 Sep; 13(9):981-1000.
100. Karsli N, Akcali C, Ozgoztasi O, Kirtak N, Inaloz S. Role of oxidative stress in the pathogenesis of vitiligo with special emphasis on the antioxidant action of narrowband ultraviolet B phototherapy. *The Journal of international medical research*. 2014 Jun; 42(3):799-805.
101. Lee AY, Youm YH, Kim NH, Yang H, Choi WI. Keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo are more vulnerable to trauma (suction) than keratinocytes in the normally

pigmented epidermis, resulting in their apoptosis. The British journal of dermatology. 2004 Nov; 151(5):995-1003.

VIII. RESUMEN

Introducción: El vitiligo pertenece a una familia de enfermedades cutáneas congénitas o adquiridas, caracterizadas por falta de pigmentación en la piel en forma de máculas bien definidas, acrómicas o hipocrómicas, en las cuales se ha observado el deterioro de la función del melanocito, la célula de la piel encargada de la producción de la melanina. Aunque se ha descrito que esta enfermedad afecta entre el 0.1 y el 2% de la población mundial, su prevalencia varía considerablemente entre la población o grupo étnico analizado.

Las causas del vitiligo son complejas y aún no se han comprendido en su totalidad. Varias hipótesis han sido desarrolladas para explicar el proceso de despigmentación, o incluso la destrucción del melanocito. Sin embargo, no dan cuenta del completo espectro de esta enfermedad.

Los estudios realizados a la fecha se han enfocado en estudiar la importancia del melanocito como productor de pigmento y describir cómo las alteraciones en el mismo tienen como consecuencia el desarrollo del vitiligo. Sin embargo, en su mayoría estos han sido realizados a través de métodos de cultivo celular, lo que puede alterar los patrones de expresión reales de la célula, en comparación con los presentes en su tejido de origen, por lo que el estudio del microambiente de la piel y el análisis del estado funcional de sus componentes celulares, pueden ayudar a determinar la mejor alternativa terapéutica en la repigmentación.

Objetivo: Identificar en la piel de pacientes con vitiligo antes y después de ser sometidos a tratamiento con fototerapia UVB-nb, cambios en patrones de expresión de genes con utilidad pronóstica.

Material y Método: Estudio comparativo, prospectivo, ciego con respecto al evaluador, experimental y longitudinal. Una vez obtenido el consentimiento informado, fueron incluidos cuarenta y cinco sujetos con Vitiligo Vulgar (21 sexo Femenino y 24 sexo Masculino; 23 con forma activa del vitiligo vulgar y 22 con su forma estable), provenientes del Estado de Nuevo León, México, que asistieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario José Eleuterio González (HUJEG), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey (MTY), Nuevo León, México. Previo al tratamiento se obtuvieron muestras de sangre para realizar pruebas bioquímicas en el Laboratorio Central y en el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario UANL. Además, se tomaron 2 biopsias de piel en sacabocado de 4 mm en cada paciente, correspondientes a piel lesionada y piel sana respectivamente. Posteriormente fue iniciado el tratamiento utilizando el equipo de fototerapia UVB-nb en cada paciente, 2 veces por semana, 48 sesiones totales. Al finalizar el protocolo se tomaron biopsias controles, una en tejido repigmentado y otra en el tejido que no experimentó respuesta al tratamiento.

Las biopsias de piel fueron utilizadas para extraer ARNm mediante RNaeasy MiniKit de QIAGEN, El cual fue cuantificado y utilizado para realizar el análisis de expresión mediante RNA-Seq (análisis de expresión mediante secuenciación masiva de ARN), en genes participantes en las rutas de pigmentación de la piel, apoptosis, estrés oxidativo, traducción de señal y sobrevivencia celular, con la

finalidad de identificar cambios asociados con el estado de la piel del paciente con utilidad pronóstica de tratamiento. Los análisis moleculares y perfiles de expresión de la biopsias de piel fueron realizados en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación (UBMGyS) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) UANL, MTY, México.

Los resultados clínicos de respuesta a tratamiento fueron evaluados por 2 investigadores independientes y cegados a los resultados de la secuenciación masiva de RNA mediante TruSeq de las muestras de piel.

Finalmente, el análisis estadístico de los niveles de expresión y su relación con los parámetros clínicos, bioquímicos y respuesta a tratamiento, fue realizado mediante R de Bioconductor, SPSS y BaseSpace de Illumina

Resultados: Se observó que la mayoría de los pacientes desarrollan la enfermedad antes de los 30 años, y que el desarrollo de la patología tenía relación con antecedentes heredofamiliares de la patología u otras de naturaleza inmune.

La correlación entre los resultados clínicos, bioquímicos y de expresión permitió identificar que elevados niveles de TSH, y un elevado peso en los pacientes puede conducir a una pobre respuesta al tratamiento UVB-nb. Por otra parte, el análisis de expresión permitió detectar diferencias significativas en los patrones de expresión de los genes DCT, MLANA y TYRP1 en la piel que presentó pigmento (normal y repigmentada), en

comparación con su contraparte despigmentada (piel con vitiligo y que no repigmentó después de tratamiento).

Además, se obtuvo un grupo de genes con utilidad predictiva para respuesta a tratamiento, relacionados con la pigmentación (DCT y TYRP1), y con la respuesta al estrés oxidativo (CCBL2 y GPD1); por otra parte, si se considera el tipo de vitiligo vulgar de acuerdo a su progresión de la enfermedad como factor determinante en la respuesta a tratamiento, el gen MC1R, puede ser de utilidad para diferenciar la respuesta entre grupos activos y estables.

Finalmente, el análisis utilizando la aplicación TruSeq Targeted RNA de Illumina sugiere a los genes participantes en la pigmentación de la piel (DCT, TYRP1 y MLANA), regulación del estrés oxidativo (GPD1), apoptosis (CSNK1G3, BAX, BCL3 CFLAR, CASP7 y CASP8) y la ruta de las MAP Cinasas (MAPK1) relacionada con la proliferación y diferenciación celular, como potenciales marcadores moleculares con utilidad pronóstica de respuesta a tratamiento.

Financiamiento: Este proyecto contó con financiamiento del “Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica” (PAICyT - UANL) con número CS879-11, y de recursos propios del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, UANL, MTY, Nuevo León México.

ANEXO 1: Forma de consentimiento informado

Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Información al paciente y formulario de consentimiento informado

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROAMBIENTE DE LA PIEL EN PACIENTES CON VITILIGO PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES INDICADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO

Centro de estudio: Departamento Dermatología

Facultad de Medicina y Hospital Universitario
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, Nuevo León
C.P. 64460
México
Teléfono: 83 48 14 65

Esta forma de consentimiento pudiera contener palabras que usted no comprenda. Por favor pida al doctor del estudio o a uno de los integrantes del personal del estudio que le expliquen cualquier palabra que usted no conozca, o cualquier información que no sea clara o que sea confusa.

INVESTIGADOR (MEDICO DEL ESTUDIO): Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani

ESTIMADO PARTICIPANTE DEL ESTUDIO:

A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar voluntariamente en un estudio de investigación clínica, que tiene como objetivo identificar cambios en los patrones de expresión de genes asociados con el estado de la piel del paciente, que permitan definir si el tratamiento a aplicar en un paciente es el idóneo para obtener una repigmentación adecuada y determinar las posibles causas involucradas en el éxito o fracaso del tratamiento de esta enfermedad.

Enmienda 1, Versión 1.0 del 9 de mayo 2014

Departamento de Dermatología



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Este ensayo clínico se realizará en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Doctor José E. González", Universidad Autónoma de Nuevo León, para el cual se prevé que participen aproximadamente 40 pacientes. Dado que su participación en este ensayo clínico es voluntaria, sólo se le incluirá en el ensayo si usted da su consentimiento por escrito. No tendrá ninguna desventaja si no desea participar en el ensayo clínico o si desea retirarse más adelante.

Antes de que usted acepte participar en este estudio, se le presenta este documento de nombre "Información al paciente y formulario de consentimiento informado", que tiene como objetivo darle información a fin de que usted pueda decidir si quiere proporcionar información de salud muestras biológicas adicionales para la investigación además de comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada.

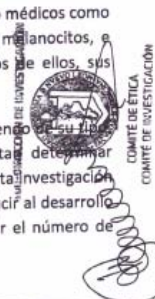
El doctor del estudio colectará la muestra y la información, con la finalidad de generar un Banco de Muestras y Datos, que serán mantenidos bajo estricta confidencialidad conjuntamente en el Departamento de Dermatología y el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

El vitiligo es una enfermedad en la cual se pierde progresivamente el color de la piel. Las causas del vitiligo son complejas y hasta el momento no se han comprendido en su totalidad. Tradicionalmente se han formulado una serie de teorías para explicar proceso de despigmentación en el vitiligo, sugiriéndose que es causada por una combinación de factores ambientales, autoinmunes y genéticos. La identificación de estos factores es de gran importancia tanto para la prevención así como para desarrollar mejores y orientadas terapias de este padecimiento. Gracias a investigaciones recientes se ha recopilado suficiente evidencia que sugiere la importancia de la regulación ejercida por el queratinocito y el melanocito, dos tipos de células muy importantes de la piel, en la generación del pigmento de este tejido, en su regeneración, y regulación de la homeostasis.

Dependiendo del tipo de vitiligo se han sugerido serie de tratamientos alternativos, tanto médicos como quirúrgicos (Tratamiento con corticoides tópicos y orales, Fototerapia, Trasplante de melanocitos, e incluso despigmentación en casos extremos, entre otros), observándose, para algunos de ellos, sus ventajas, desventajas y escasa recuperación de los pacientes.

Nosotros pretendemos descubrir y estudiar nuevos marcadores de vitiligo que, dependiendo de su tipo, sean muy sensibles y específicos para el diagnóstico de la enfermedad, y que nos permitan determinar si existe relación entre ellos, el curso clínico de ésta. Eventualmente los hallazgos de esta investigación nos permitirán tomar decisiones para el tratamiento de esta patología y pudieran conducir al desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento más personalizados, con la finalidad de disminuir el número de fallas observadas durante los procedimientos de repigmentación.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Para lograr esto, nosotros estudiaremos tejido dérmico (de la piel) y sangre, para identificar genes y proteínas que están presentes en niveles alterados (altos o bajos) en el vitiligo, e identificaremos aquellos que pueden presentar variaciones en el transcurso de la enfermedad.

Las células en el cuerpo humano, como las provenientes de tejido dérmico (de la piel) y sangre, contienen genes compuestos de ácido desoxirribonucleico (ADN), y proteínas, compuestos que median la función de un gen. Estas últimas también están presentes en los fluidos corporales, ya sea sangre, orina y saliva, entre otros.

Los genes contienen instrucciones clave para la función celular y ayudan a determinar las características de cada individuo. Por otra parte es importante comprender la función de las proteínas, ya que esto es fundamental para conocer el origen de un mal funcionamiento del organismo, pues si una proteína está mal, o se encuentra en niveles alterados, la función que ella desarrolla también lo puede estar. Por lo tanto, esta investigación utilizará las muestras biológicas (ácidos nucleicos y proteínas) de los individuos participantes para hacer lo siguiente:

- Estudiar las causas del vitiligo
- Ayudar a entender cómo responden diferentes individuos a las terapias y medicamentos.
- Obtener información para ayudar a desarrollar nuevos métodos para diagnosticar y tratar la enfermedad.

¿COMO PROCEDERÁ EL ESTUDIO? ¿QUÉ DEBO TENER EN CUENTA SI PARTICIPO?

Si se le incluye en este ensayo clínico, no se afectará de manera absoluta el tratamiento médico que se le recomiende o su elección de médico para realizar el tratamiento. Se registrarán los antecedentes médicos de sus enfermedades y se le someterá a un examen médico completo. En concreto, este examen consistirá en una exploración física dermatológica. Si se puede o no continuar participando en el ensayo clínico dependerá de los resultados de esta exploración.

Si participa en el estudio, deberá de dar su firma para confirmar (o reconocer) el consentimiento informado.

Nosotros obtendremos de usted la siguiente información y las siguientes muestras biológicas:

INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA: Se le solicitará la siguiente información: fecha de nacimiento, sexo, familiar de vitiligo u otras enfermedades, se le preguntará si ha estado sometido a situaciones estresantes o si ha sufrido algún trastorno psicológico, hábitos nutricionales, se tomarán medidas de su talla y peso.

INFORMACIÓN SOBRE LA ENFERMEDAD: Revisaremos su expediente clínico para obtener información sobre el tipo de Vitiligo que lo afecta y todos los exámenes de laboratorio que se le hayan realizado (por ejemplo Sangre, orina, etc).



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

MUESTRAS BIOLÓGICAS: El personal del estudio extraerá una muestra de sangre de una vena del brazo que será recolectada en dos tubos (aproximadamente 20 ml). Esta muestra de sangre será extraída para fines de su atención médica o para el ensayo clínico principal.

Procedimiento y obtención de muestras biológicas: Este estudio consta de un examen preliminar (selección) y una fase de tratamiento. En la primera visita se le tomará una muestra de sangre; una vez calificando para iniciar la fase de tratamiento se obtendrán 2 muestras de su piel mediante biopsias cutáneas (procedimiento quirúrgico en el que se extrae un fragmento de su piel con bisturí o sacabocado, para lo cual se inyecta previamente anestesia local; las muestras solicitadas serán una de su piel con vitiligo y otra de su piel normal). Iniciará la fase de tratamiento en la cámara de Fototerapia UVB iniciando con una dosis de 150 mJ/cm² con una frecuencia de 2 veces por semana hasta un máximo de 6 meses. Serán 6 visitas en total a la consulta, 1 cada mes (equivalente a 8 sesiones de fototerapia), durante 6 meses y se tomarán iconografías digitales (fotografías) de las áreas tratadas. Se le pedirá su opinión personal acerca de la mejoría de la pigmentación de las manchas de vitiligo y 2 médicos del estudio también evaluarán el cambio de la pigmentación. Al final de los 6 meses, se tomarán 2 biopsias de piel de las mismas áreas de las que se tomaron al inicio del estudio para realizar la comparación final.

Excepto en caso de emergencia, no deberá tomar ningún medicamento adicional (ni siquiera medicamentos de venta sin receta) sin hablar antes con el médico del estudio. Especialmente la piel con vitiligo no debe tratarse con ningún otro medicamento y/o producto cosmético. Si lo están tratando otros médicos, deberá informarles que está participando en este ensayo clínico. Asimismo, deberá informar al médico del estudio sobre cualquier tratamiento médico que reciba de cualquier otro médico durante el ensayo clínico.

ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los investigadores estamos solicitándole permiso para almacenar sus muestras biológicas, las cuales serán utilizadas en futuros estudios de investigación científica. Sus muestras estarán marcadas con una etiqueta de identificación única (código). Esta identificación permitirá reconocer que usted fue el donador de la muestra. Los bancos serán mantenidos conjuntamente en el Departamento de Dermatología y el Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la UANL. Los responsables de los bancos son el Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani y la Dra. Rocío Ortiz López en la UANL. Los investigadores ajenos a este proyecto que soliciten porciones de tejido del banco requerirán una aprobación de los dos supervisores de los Bancos de Muestras y Datos (Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani y la Dra. Rocío Ortiz López) y deberán justificar su solicitud en un protocolo de investigación que esté aprobado por el comité institucional de revisión de protocolos (IRB) o por el comité de ética médica de la institución de afiliación del investigador. Es probable que miembros de este tipo de comités busquen la aprobación de los investigadores para ponerse en contacto con usted.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

¿QUÉ BENEFICIOS PERSONALES OBTENDRÉ DE MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Obtendrá el tratamiento gratuito de Fototerapia por el tiempo estipulado así como una valoración dermatológica. La fototerapia consiste en el tratamiento de esta enfermedad de la piel mediante aplicación de luz ultravioleta por un determinado número de veces (según lo indicado por el médico tratante); éste procedimiento ayuda a estimular la producción de pigmento en la piel.

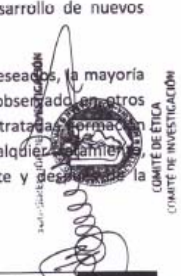
No habrá costo alguno que el paciente tenga que cubrir. Al recibir el tratamiento con Fototerapia es posible que mejoren todas sus lesiones no sólo las que se están evaluando. No obstante, como la eficacia del tratamiento puede diferir de una persona a otra, también es posible que no obtenga el beneficio que esperaba de su participación en el ensayo clínico.

- **RIESGO/BENEFICIO**

Usted puede sentir algunas inconveniencias razonables y algunos otros riesgos si decide participar en estos estudios. La introducción de una aguja en la vena para la obtención de sangre puede producir molestias. Puede haber una lesión pequeña y existe una remota posibilidad de infección en el sitio de la punción. Usted puede sentir mareo o desvanecimiento durante la toma de la muestra de sangre. Además, dado que para la extracción de la piel implica la realización de un procedimiento quirúrgico, aplicación de anestésico local (en la zona de la cual se extraerá la muestra de piel) y aplicación de puntos de sutura para cerrar la incisión, pudiera experimentar sangrado posterior al procedimiento por lo que debe comentarle al médico si tiene antecedentes de problemas hemorrágicos. Generalmente el sangrado es detenido aplicando presión en el área. Además pudieran presentarse infección en el área y quedar una cicatriz. Las biopsias se consideran un procedimiento seguro con riesgos mínimos. En la mayoría de los casos, no surgen complicaciones. En algunos casos, es posible que el paciente sienta molestias o dolor en el lugar de la biopsia durante uno o dos días. Con muy poca frecuencia, puede haber infecciones o hemorragias. En casos excepcionales, la anestesia puede provocar complicaciones (como frecuencia cardíaca irregular, problemas respiratorios y reacciones alérgicas a los medicamentos). Se recomienda informar al médico tratante si usted ha experimentado algún síntoma de los antes mencionados luego de la realización de un procedimiento quirúrgico previo.

Ninguno de los exámenes generará un beneficio directo e inmediato para usted, pero estos pueden ayudarnos a conseguir otras nuevas formas para identificar, prevenir y tratar el vitiligo en otros pacientes con la misma enfermedad que lo afecta. Es posible que su participación pudiera contribuir al conocimiento de las causas de las condiciones médicas o pudiera ayudar al desarrollo de nuevos medicamentos o métodos para detectar o tratar la enfermedad.

El tratamiento por medio de Fototerapia puede provocar efectos o síntomas no deseados, la mayoría de los cuales son transitorios. Los efectos o síntomas no deseados que se han observado en otros estudios incluyen: irritaciones cutáneas locales, enrojecimiento y ardor de las áreas tratadas, formación de ampollas o quemaduras y ligera inflamación en los sitios afectados. Como con cualquier tratamiento pueden producirse también efectos adversos nuevos y aún desconocidos durante y después de la Fototerapia.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Por favor, comunique al personal del centro del estudio todos los síntomas, las enfermedades o las lesiones que se produzcan durante el transcurso del ensayo clínico. Si son graves, comuníquelo inmediatamente al personal del centro del estudio, por teléfono si es necesario.

Participar en un estudio clínico puede provocar ciertos inconvenientes que, en algunos casos, pueden afectar su vida cotidiana, p.ej., visitas adicionales al centro del estudio. No está permitida la participación simultánea en otros estudios clínicos en los que sean suministrados fármacos de naturaleza esterooidal o en fase de prueba.

En el caso de que el estudio le provoque alguna lesión, que se descubra durante el estudio o en el periodo de vigilancia posterior, recibirá asistencia médica.

Existe el riesgo remoto de que la información de su registro de investigación pueda afectar aplicaciones para seguro de vida, y para trabajo, tanto personales como de otros miembros de su familia. Por estas razones, cualquier información personal que nos suministre será mantenida con la máxima privacidad.

COSTOS:

No se le cobrará por ninguno de los análisis requeridos ni por los procedimientos realizados durante su participación en esta investigación. La visita a la clínica y la extracción de muestras biológicas asociadas con la conducción de esta investigación se proporcionan sin costo si usted participa.

¿SE ME INFORMARÁ DE LOS NUEVOS HALLAZGOS DURANTE EL ENSAYO CLÍNICO?

Con respecto a este ensayo clínico, se le informará de los nuevos hallazgos que se conozcan que puedan afectar a su voluntad de continuar participando. Basándose en ellos, podrá entonces reconsiderar su decisión de continuar su participación en este ensayo clínico.

¿PUEDE FINALIZAR PREMATURAMENTE MI PARTICIPACIÓN EN EL ENSAYO CLÍNICO?

Usted puede finalizar su participación en cualquier momento, incluso sin dar el motivo, sin que esto suponga ningún perjuicio para su tratamiento médico.

No obstante, bajo ciertas circunstancias, también es posible que el médico del estudio decida finalizar su participación en el ensayo clínico de forma prematura sin que usted pueda influir en la decisión. Los motivos para ello pueden ser:

- Continuar su participación en el ensayo clínico ya no está médicamente justificado.
- Se suspende todo el ensayo clínico.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Si decide abandonar el ensayo clínico antes, o si su participación finaliza prematuramente por cualquiera de los anteriores motivos, es importante para su propia seguridad que se someta a una revisión final recomendada. El médico del estudio le preguntará acerca de los posibles cambios en su bienestar y las variaciones en los otros medicamentos y tratamientos que reciba.

El médico del estudio comentará con usted cómo y cuándo continuará su tratamiento.

¿QUÉ OTRAS OPCIONES DE TRATAMIENTO EXISTEN FUERA DEL ESTUDIO?

Si usted tiene vitiligo que afecta más del 10% de la superficie corporal, el tratamiento indicado es la Fototerapia como primera elección. Otras opciones que existen, sobretodo diseñadas para los pacientes que no responden al tratamiento con fototerapia, son la aplicación de mini-injertos, injertos de ampolla, injertos de espesor parcial y trasplante autólogo de melanocitos.

¿QUIÉN NO PUEDE PARTICIPAR EN ESTE ENSAYO CLÍNICO?

Es posible que no pueda participar en este ensayo clínico si está participando en otro ensayo clínico o proyecto de investigación clínica en el que sean suministrados fármacos de naturaleza esteroideal o en fase de prueba o lo ha hecho recientemente en los últimos 30 días anteriores a la vista de selección.

Hasta ahora, se desconoce si existe algún riesgo durante el embarazo y la lactancia por lo cual se evita tal situación.

Si tiene enfermedades autoinmunes como Diabetes, Lupus Eritematoso, Artritis Reumatoide o enfermedad de la Tiroides, tampoco es elegible para participar en este estudio.

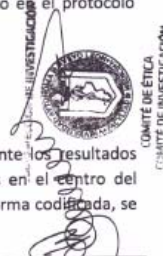
OPCIONES

Usted puede decidir no participar en este estudio.

Su participación en esta investigación es voluntaria. Si decidiera que no quiere participar en la investigación, esto NO AFECTARÁ de manera absoluta su participación y tratamiento en el protocolo clínico principal de vitiligo.

CONFIDENCIALIDAD

Durante el ensayo clínico, se recopilarán y anotarán o almacenarán electrónicamente los resultados médicos y la información personal referentes a usted en sus registros personales en el centro del estudio. Asimismo, los datos importantes para el ensayo clínico se almacenarán de forma codificada, se evaluará y se transferirán, si es necesario.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Cualquier cosa que sepamos sobre usted en este estudio se mantendrá de manera estrictamente confidencial. Si publicamos los resultados del estudio en un artículo de una revista médica o en un libro, nosotros no lo identificaremos a usted de ninguna manera. Tomaremos las medidas necesarias para mantener toda su información en privado.

Para cumplir con esto, tanto a la información clínica y de las muestras, se eliminará la identificación personal. En la práctica esto significa que los investigadores que utilicen la información clínica no tendrán acceso a datos personales como nombre, números de identificación relacionados con el hospital (número de expediente), dirección y números de teléfono. Los investigadores podrán recibir información clínica como la edad, presencia o ausencia de la enfermedad u otro tipo de información relevante a la muestra, pero no recibirán información sobre la identidad de la persona.

Además, es nuestra política no permitir que personas ajenas al grupo de investigación contacte a los pacientes que donaron las muestras por ninguna razón. Si este contacto es requerido, se le solicitará al Comité de Ética Médica que evalúe esa solicitud y el contacto solo se hará a través de su médico, después de haber recibido la aprobación del Comité de Ética Médica.

LOS DATOS SE PROTEGERÁN CONTRA EL ACCESO NO AUTORIZADO. LA DESCODIFICACIÓN SE PRODUCIRÁ SÓLO DE ACUERDO CON LOS REQUISITOS QUE EXIGE LA LEGISLACIÓN.

Los requisitos legales dan especificaciones completas sobre el grado de consentimiento necesario para la recopilación y el uso de los datos. Puede encontrar más detalles, especialmente de la posibilidad de retirar su consentimiento, en el formulario de consentimiento al final de esta hoja de información a la paciente.

Tiene derecho a inspeccionar los datos en el centro de estudio y que se corrija la información incorrecta, si es necesario.

Si usted retira su consentimiento para participar en el estudio, no se recopilarán más datos sobre usted.

Al finalizar el ensayo, las imágenes de la historia clínica se almacenarán de la siguiente forma: las fotografías codificadas de sus lesiones (manchas) se archivarán en su archivo de paciente y se destruirán después del periodo de tiempo legalmente estipulado de 15 años.

RETIRO DEL CONSENTIMIENTO Y DESTRUCCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Usted podría retirar este consentimiento y terminar su participación en la investigación **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROAMBIENTE DE LA PIEL EN PACIENTES CON VITILIGO PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES INDICADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO** arriba descrita sin afectar su participación en el ensayo clínico principal.

Para retirar su consentimiento, usted debe contactar al doctor del estudio al número telefónico indicado en la primera página del formato, ya que sólo él/ella tiene acceso a toda su información que le



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

identifica. El doctor del estudio conservará los registros que vinculan la información que le identifica (por ejemplo, su nombre y la información de contacto) con su muestra codificada de sangre y la información de salud, durante el período de tiempo requerido por la ley aplicable. Si usted retirara su consentimiento para la Investigación de Vitiligo durante este tiempo, usted podría solicitar que su muestra de sangre, tejido y el ADN obtenido con su muestra de sangre sean destruidos y que ya no se usen en y otras investigaciones relacionadas. El grupo de investigación tendrá el derecho de conservar y usar cualquiera de los resultados de la investigación que obtengamos antes del retiro de su consentimiento.

PREGUNTAS/ INFORMACIÓN: Si tuviera alguna pregunta respecto a esta colección de muestra o a la investigación o si sufriera alguna lesión causada por el procedimiento de colección de la muestra, o en caso de emergencia relacionada a los medicamentos en estudio o si considera que está presentando una reacción relacionada al medicamento en estudio usted deberá contactar al médico responsable del proyecto en el número telefónico indicado en la primera página.

Si tiene dudas en relación al estudio de investigación comunicarse con:

Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani, Servicio de Dermatología de la Facultad de Medicina, Hospital Universitario José Eleuterio González, Teléfonos 8348-14 65; 8348-0383.

Dudas sobre sus **derechos como paciente en investigación:**

Dr. José Gerardo Garza Leal Presidente del Comité de Ética, teléfono 8329-4050 ext.2870-74

Dudas en relación a sus **derechos como paciente:**

Lic. Antonio Zapata de la Riva, Teléfono 8329-4050 ext. 2870-74.

El consejo institucional de revisión o el comité de ética son grupos de médicos y de individuos no médicos que han revisado la información del estudio teniendo en mente la protección del sujeto.

Consentimiento: He leído la información anterior que describe la colección de las muestras biológicas y todas mis preguntas referentes a la colección de mi muestra y a la información médica/diagnóstica para la investigación relacionada han sido respondidas a mi satisfacción. Acepto proporcionar muestras biológicas y permitir que mi información de salud se use y se divulgue para la investigación de **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROAMBIENTE DE LA PIEL EN PACIENTES CON VITILIGO PARA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES INDICADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO** como se describe arriba. Entiendo que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.

Médico del estudio: Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani


COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Información al paciente y formulario de consentimiento informado

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROAMBIENTE DE LA PIEL EN PACIENTES CON VITILIGO PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES INDICADORES DE RESPUESTA A TRATAMIENTO".

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

.....
Nombre del paciente en letra de imprenta

Fecha de Nacimiento Número de paciente

.....
Nombre del doctor

Me explicó (con todo detalle y de forma comprensible para mí) acerca del producto en estudio y acerca de la naturaleza, la importancia, los riesgos y el alcance del ensayo clínico. También leí y comprendí el texto de la hoja de información al paciente y la declaración de protección de datos impresa a continuación. Tuve la oportunidad de hablar con el médico del estudio acerca de cómo se realizará el ensayo clínico. Se contestaron satisfactoriamente todas mis preguntas.

Tuve suficiente tiempo para tomar mi decisión.

Soy consciente de que puedo retirar mi consentimiento para participar en el estudio (verbalmente o por escrito) en cualquier momento y sin dar los motivos, si ningún perjuicio para mi tratamiento médico.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Protección de datos

Soy consciente en este ensayo clínico, se van a recopilar, almacenar y evaluar datos personales acerca de mí (especialmente resultados médicos). Los detalles sobre mi salud se utilizarán de acuerdo con los requisitos legales. Dicho uso exige que se otorgue el siguiente consentimiento informado voluntario antes de mi participación en el ensayo clínico, es decir, sin el siguiente consentimiento no puedo participar en el ensayo clínico.

1. Acepto que, como parte de este ensayo clínico, se recopilarán y registrarán datos personales acerca de mí (especialmente detalles sobre mi salud) en el papel o en formato electrónico en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario.

2. El consentimiento de recopilar y procesar mis datos personales, en particular los datos sobre mi salud, es irrevocable. Ya me explicaron que puedo finalizar mi participación en el ensayo clínico en cualquier momento. Si retiro mi consentimiento para participar en el estudio, acepto que los datos guardados hasta ese momento puedan continuar utilizándose si es necesario para:

- a) determinar los efectos del producto en investigación.
- b) garantizar que no se comprometen mis intereses protegibles.
- c) cumplir la obligación de presentar los documentos completos para autorización.

3. Acepto que mis datos se guarden durante al menos 15 años tras la finalización o la suspensión del ensayo, tal como lo establecen las normas referentes a ensayos clínicos de medicamentos. Tras este periodo, mis datos personales se eliminarán, salvo que exista algún periodo legal, estatutario o contractual que lo impida.

4. Me informaron de la siguiente norma legal: si retiro mi consentimiento para participar en el estudio, todas las entidades que tengan mis datos almacenados, en particular mis datos de salud, deberán comprobar inmediatamente qué grado los datos almacenados para las finalidades mencionadas en el apartado No. 2 incisos a, b y c

Los datos que ya no sean necesarios se eliminarán inmediatamente.

5. Los resultados del estudio pueden publicarse en forma de presentaciones en congresos, artículos de revistas o para fines de comercialización (información a los pacientes y a los médicos del estudio). No se podrá identificar ninguna fotografía de ningún paciente en estas publicaciones.



Información al paciente y formulario de consentimiento informado

Doy voluntariamente mi consentimiento para participar en el ensayo clínico descrito anteriormente.
Me entregaron una copia de la información al paciente y del formulario de consentimiento informado.
Una copia permanecerá en el centro del estudio.

.....
Nombre del paciente en letra imprenta Fecha

.....
Firma del paciente

.....
Nombre del Testigo (1) Firma del testigo (1) Fecha

.....
Dirección de testigo (1) Parentesco

.....
Nombre del Testigo (2) Firma del testigo (2) Fecha

.....
Dirección de testigo (2) Parentesco

Participe en la charla de consentimiento y obtuve el consentimiento del paciente.

.....
Nombre del Investigador Fecha

.....
Firma del Investigador.



ANEXO 2: Encuesta a pacientes

Servicio: Dermatología Hospital Universitario José Eleuterio González.

DATOS DEMOGRÁFICOS	
Nombre:	
Teléfono:	Celular:
Edad:	Sexo:
Nacionalidad: <input type="checkbox"/> Mexicana <input type="checkbox"/> Otra:	
Nacionalidad de los padres: <input type="checkbox"/> Mexicana <input type="checkbox"/> Otra:	
Nacionalidad de los abuelos: <input type="checkbox"/> Mexicana <input type="checkbox"/> Otra:	

ANTECEDENTES
Edad de aparición de la enfermedad:
Número de lesiones:
Causas atribuibles:
Tratamiento previo y duración:
Respuesta a tratamiento previo:
Familiares que presenten vitiligo:
Situaciones de estrés o trastornos psicológicos:

SOMATOMETRÍA	
Peso:	Talla:

EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD	
Clasificación de Fitzpatrick:	<input type="checkbox"/> Tipo I <input type="checkbox"/> Tipo II <input type="checkbox"/> Tipo III <input type="checkbox"/> Tipo IV <input type="checkbox"/> Tipo V <input type="checkbox"/> Tipo VI
Tipo de Vitiligo:	<input type="checkbox"/> Estable <input type="checkbox"/> Inestable
% de superficie corporal afectada:	

Firma del Evaluador: _____

ANEXO 3: Pruebas T Student perfiles de expresión biopsias de piel.

En las tablas se presentan los resultados del análisis estadístico mediante prueba T de Student de cada una de las comparaciones presentadas para cada gen. NOR corresponde a Piel Normal, VIT corresponde a piel con vitiligo, REPI corresponde a piel repigmentada después de tratamiento y NOREP a piel que no repigmentó después de tratamiento.

Paired Samples Test										
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)		
				Mean	Lower				Upper	
				Mean	Lower				Upper	
Pair 1	-7.34E-02	9.73E-01	1.45E-01	-3.66E-01	2.19E-01	-0.507	44	0.615		
Pair 2	-1.16E-01	1.14E+00	1.69E-01	-4.57E-01	2.26E-01	-0.683	44	0.498		
Pair 3	-3.94E-02	1.17E+00	1.75E-01	-3.91E-01	3.13E-01	-0.225	44	0.823		
Pair 4	-4.24E-02	8.98E-01	1.34E-01	-3.12E-01	2.27E-01	-0.317	44	0.753		
Pair 5	3.41E-02	1.14E+00	1.70E-01	-3.09E-01	3.77E-01	0.2	44	0.842		
Pair 6	7.64E-02	9.49E-01	1.41E-01	-2.09E-01	3.61E-01	0.541	44	0.592		
Paired Samples Test										
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)		
				Mean	Lower				Upper	
				Mean	Lower				Upper	
Pair 7	1.11E-01	7.52E-01	1.12E-01	-1.15E-01	3.37E-01	0.987	44	0.329		
Pair 8	3.69E-02	6.31E-01	9.41E-02	-1.53E-01	2.27E-01	0.392	44	0.697		
Pair 9	8.73E-02	1.05E+00	1.56E-01	-2.27E-01	4.02E-01	0.559	44	0.579		
Pair 10	-7.38E-02	9.46E-01	1.41E-01	-3.58E-01	2.10E-01	-0.523	44	0.603		
Pair 11	-2.34E-02	1.13E+00	1.68E-01	-3.62E-01	3.16E-01	-0.139	44	0.89		
Pair 12	5.04E-02	9.07E-01	1.35E-01	-2.22E-01	3.23E-01	0.373	44	0.711		

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 13	BCL3_NOR - BCL3_VIT	-6.37E-02	9.11E-01	1.36E-01	-3.37E-01	2.10E-01	-0.469	44	0.641
Pair 14	BCL3_NOR - BCL3_REP	-8.10E-02	9.39E-01	1.40E-01	-3.63E-01	2.01E-01	-0.578	44	0.566
Pair 15	BCL3_NOR - BCL3_NOREP	-8.93E-02	9.63E-01	1.44E-01	-3.79E-01	2.00E-01	-0.622	44	0.537
Pair 16	BCL3_VIT - BCL3_REP	-1.73E-02	8.32E-01	1.24E-01	-2.67E-01	2.33E-01	-0.139	44	0.89
Pair 17	BCL3_VIT - BCL3_NOREP	-2.56E-02	9.68E-01	1.44E-01	-3.17E-01	2.65E-01	-0.178	44	0.86
Pair 18	BCL3_REP - BCL3_NOREP	-8.37E-03	7.47E-01	1.11E-01	-2.33E-01	2.16E-01	-0.075	44	0.94
Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 19	CAPN3_NOR - CAPN3_VIT	6.00E-01	7.34E-01	1.09E-01	3.80E-01	8.21E-01	5.489	44	0
Pair 20	CAPN3_NOR - CAPN3_REP	2.11E-01	6.49E-01	9.67E-02	1.60E-02	4.06E-01	2.181	44	0.035
Pair 21	CAPN3_NOR - CAPN3_NOREP	4.21E-01	5.92E-01	8.82E-02	2.43E-01	5.98E-01	4.769	44	0
Pair 22	CAPN3_VIT - CAPN3_REP	-3.89E-01	7.28E-01	1.09E-01	-6.08E-01	-1.71E-01	-3.586	44	0.001
Pair 23	CAPN3_VIT - CAPN3_NOREP	-1.80E-01	6.16E-01	9.19E-02	-3.65E-01	5.45E-03	-1.956	44	0.057
Pair 24	CAPN3_REP - CAPN3_NOREP	2.10E-01	6.21E-01	9.26E-02	2.31E-02	3.96E-01	2.265	44	0.028

Paired Samples Test									
	Paired Differences	the Difference			t	df	Sig. (2-tailed)		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean				Lower	Upper
Pair 25	CASP10_NOR - CASP10_VIT	2.84E-02	1.13E+00	1.68E-01	0.169	44	0.867		
Pair 26	CASP10_NOR - CASP10_REP	-3.94E-02	5.70E-01	8.49E-02	-0.464	44	0.645		
Pair 27	CASP10_NOR - CASP10_NOREP	-1.48E-01	9.30E-01	1.39E-01	-1.069	44	0.291		
Pair 28	CASP10_VIT - CASP10_REP	-6.78E-02	1.02E+00	1.52E-01	-0.447	44	0.657		
Pair 29	CASP10_VIT - CASP10_NOREP	-1.77E-01	8.83E-01	1.32E-01	-1.341	44	0.187		
Pair 30	CASP10_REP - CASP10_NOREP	-1.09E-01	9.26E-01	1.38E-01	-0.788	44	0.435		
Paired Samples Test									
	Paired Differences	the Difference			t	df	Sig. (2-tailed)		
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean				Lower	Upper
Pair 31	CASP3_NOR - CASP3_VIT	-1.60E-01	7.25E-01	1.08E-01	-1.48	44	0.146		
Pair 32	CASP3_NOR - CASP3_REP	2.59E-02	8.85E-01	1.32E-01	0.196	44	0.845		
Pair 33	CASP3_NOR - CASP3_NOREP	9.36E-02	8.62E-01	1.28E-01	0.729	44	0.47		
Pair 34	CASP3_VIT - CASP3_REP	1.86E-01	6.24E-01	9.31E-02	1.996	44	0.052		
Pair 35	CASP3_VIT - CASP3_NOREP	2.54E-01	6.92E-01	1.03E-01	2.458	44	0.018		
Pair 36	CASP3_REP - CASP3_NOREP	6.77E-02	8.98E-01	1.34E-01	0.506	44	0.615		

Paired Samples Test										
Paired Differences										
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)		
				Lower	Upper					
Pair 37	CASP7_NOR - CASP7_VIT	-2.07E-01	9.70E-01	1.45E-01	-4.98E-01	8.46E-02	-1.431	44	0.16	
Pair 38	CASP7_NOR - CASP7_REP	-2.34E-01	9.16E-01	1.37E-01	-5.09E-01	4.09E-02	-1.716	44	0.093	
Pair 39	CASP7_NOR - CASP7_NOREP	-1.30E-02	1.14E+00	1.70E-01	-3.55E-01	3.29E-01	-0.076	44	0.939	
Pair 40	CASP7_VIT - CASP7_REP	-2.74E-02	1.08E+00	1.62E-01	-3.53E-01	2.98E-01	-0.17	44	0.866	
Pair 41	CASP7_VIT - CASP7_NOREP	1.94E-01	1.06E+00	1.58E-01	-1.25E-01	5.13E-01	1.226	44	0.227	
Pair 42	CASP7_REP - CASP7_NOREP	2.21E-01	1.23E+00	1.84E-01	-1.50E-01	5.92E-01	1.202	44	0.236	
Paired Samples Test										
Paired Differences										
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)		
				Lower	Upper					
Pair 43	CASP8_NOR - CASP8_VIT	-9.88E-02	8.76E-01	1.31E-01	-3.62E-01	1.84E-01	-0.757	44	0.453	
Pair 44	CASP8_NOR - CASP8_REP	-1.38E-01	8.28E-01	1.23E-01	-3.86E-01	1.11E-01	-1.115	44	0.271	
Pair 45	CASP8_NOR - CASP8_NOREP	4.42E-02	1.02E+00	1.51E-01	-2.61E-01	3.49E-01	0.292	44	0.772	
Pair 46	CASP8_VIT - CASP8_REP	-3.88E-02	6.88E-01	1.03E-01	-2.45E-01	1.68E-01	-0.378	44	0.707	
Pair 47	CASP8_VIT - CASP8_NOREP	1.43E-01	9.15E-01	1.36E-01	-1.32E-01	4.18E-01	1.049	44	0.3	
Pair 48	CASP8_REP - CASP8_NOREP	1.82E-01	6.95E-01	1.04E-01	-2.71E-02	3.91E-01	1.754	44	0.086	

Paired Samples Test										
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper					
Pair 49	CCBL2_NOR - CCBL2_VIT	4.16E-02	3.03E-01	4.51E-02	-4.93E-02	1.33E-01	0.923	44	0.361	
Pair 50	CCBL2_NOR - CCBL2_REP	3.08E-02	2.45E-01	3.65E-02	-4.28E-02	1.04E-01	0.843	44	0.404	
Pair 51	CCBL2_NOR - CCBL2_NOREP	-8.25E-03	2.37E-01	3.53E-02	-7.94E-02	6.29E-02	-0.234	44	0.816	
Pair 52	CCBL2_VIT - CCBL2_REP	-1.08E-02	2.74E-01	4.09E-02	-9.32E-02	7.17E-02	-0.264	44	0.793	
Pair 53	CCBL2_VIT - CCBL2_NOREP	-4.99E-02	2.82E-01	4.20E-02	-1.35E-01	3.49E-02	-1.186	44	0.242	
Pair 54	CCBL2_REP - CCBL2_NOREP	-3.91E-02	2.16E-01	3.21E-02	-1.04E-01	2.57E-02	-1.216	44	0.23	
Paired Samples Test										
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)		
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper					
Pair 55	CDC5L_NOR - CDC5L_VIT	4.36E-03	2.59E-01	3.86E-02	-7.34E-02	8.22E-02	0.113	44	0.911	
Pair 56	CDC5L_NOR - CDC5L_REP	8.64E-02	2.53E-01	3.78E-02	1.02E-02	1.63E-01	2.286	44	0.027	
Pair 57	CDC5L_NOR - CDC5L_NOREP	1.84E-02	2.96E-01	4.41E-02	-7.06E-02	1.07E-01	0.417	44	0.679	
Pair 58	CDC5L_VIT - CDC5L_REP	8.20E-02	2.33E-01	3.47E-02	1.22E-02	1.52E-01	2.366	44	0.022	
Pair 59	CDC5L_VIT - CDC5L_NOREP	1.40E-02	3.43E-01	5.11E-02	-8.89E-02	1.17E-01	0.275	44	0.785	
Pair 60	CDC5L_REP - CDC5L_NOREP	-6.80E-02	2.66E-01	3.96E-02	-1.48E-01	1.18E-02	-1.718	44	0.093	

Paired Samples Test									
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 61	CFLAR_NOR - CFLAR_VIT	-8.29E-02	5.81E-01	8.66E-02	-2.58E-01	9.17E-02	-0.957	44	0.344
Pair 62	CFLAR_NOR - CFLAR_REP	-3.28E-02	6.42E-01	9.57E-02	-2.26E-01	1.60E-01	-0.343	44	0.733
Pair 63	CFLAR_NOR - CFLAR_NOREP	-4.85E-02	7.41E-01	1.10E-01	-2.71E-01	1.74E-01	-0.439	44	0.663
Pair 64	CFLAR_VIT - CFLAR_REP	5.01E-02	5.61E-01	8.36E-02	-1.18E-01	2.19E-01	0.599	44	0.552
Pair 65	CFLAR_VIT - CFLAR_NOREP	3.44E-02	6.60E-01	9.84E-02	-1.64E-01	2.33E-01	0.35	44	0.728
Pair 66	CFLAR_REP - CFLAR_NOREP	-1.57E-02	6.47E-01	9.64E-02	-2.10E-01	1.79E-01	-0.163	44	0.872
Paired Samples Test									
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 67	CSNK1G3_NOR - CSNK1G3_VIT	-1.56E-01	6.37E-01	9.49E-02	-3.47E-01	3.52E-02	-1.645	44	0.107
Pair 68	CSNK1G3_NOR - CSNK1G3_REP	1.32E-02	1.05E+00	1.57E-01	-3.03E-01	3.29E-01	0.084	44	0.933
Pair 69	CSNK1G3_NOR - CSNK1G3_NOREP	2.71E-01	1.22E+00	1.82E-01	-9.60E-02	6.37E-01	1.488	44	0.144
Pair 70	CSNK1G3_VIT - CSNK1G3_REP	1.69E-01	8.19E-01	1.22E-01	-7.67E-02	4.15E-01	1.387	44	0.172
Pair 71	CSNK1G3_VIT - CSNK1G3_NOREP	4.27E-01	9.65E-01	1.44E-01	1.37E-01	7.17E-01	2.967	44	0.005
Pair 72	CSNK1G3_REP - CSNK1G3_NOREP	2.57E-01	1.03E+00	1.54E-01	-5.26E-02	5.68E-01	1.673	44	0.101

Paired Samples Test									
		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference Lower Upper				
Pair 73	DCT_NOR - DCT_VIT	2.25E+00	9.37E-01	1.40E-01	1.97E+00	2.53E+00	16.114	44	0
Pair 74	DCT_NOR - DCT_REP	2.37E-01	8.29E-01	1.24E-01	-1.21E-02	4.86E-01	1.917	44	0.062
Pair 75	DCT_NOR - DCT_NOREP	2.38E+00	1.04E+00	1.55E-01	2.06E+00	2.69E+00	15.322	44	0
Pair 76	DCT_VIT - DCT_REP	-2.01E+00	1.22E+00	1.82E-01	-2.38E+00	-1.65E+00	-11.078	44	0
Pair 77	DCT_VIT - DCT_NOREP	1.24E-01	1.15E+00	1.71E-01	-2.20E-01	4.69E-01	0.727	44	0.471
Pair 78	DCT_REP - DCT_NOREP	2.14E+00	1.29E+00	1.93E-01	1.75E+00	2.53E+00	11.081	44	0
Paired Samples Test									
		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference Lower Upper				
Pair 79	FASLG_NOR - FASLG_VIT	5.42E-02	5.59E-01	8.33E-02	-1.14E-01	2.22E-01	0.651	44	0.519
Pair 80	FASLG_NOR - FASLG_REP	2.59E-02	6.19E-01	9.22E-02	-1.60E-01	2.12E-01	0.281	44	0.78
Pair 81	FASLG_NOR - FASLG_NOREP	3.75E-02	5.93E-01	8.84E-02	-1.41E-01	2.16E-01	0.424	44	0.673
Pair 82	FASLG_VIT - FASLG_REP	-2.82E-02	6.12E-01	9.12E-02	-2.12E-01	1.56E-01	-0.31	44	0.758
Pair 83	FASLG_VIT - FASLG_NOREP	-1.67E-02	5.21E-01	7.77E-02	-1.73E-01	1.40E-01	-0.215	44	0.831
Pair 84	FASLG_REP - FASLG_NOREP	1.16E-02	6.12E-01	9.12E-02	-1.72E-01	1.95E-01	0.127	44	0.9

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 85	GAPDH_NOR - GAPDH_VIT	4.96E-02	2.02E-01	3.01E-02	-1.11E-02	1.10E-01	1.646	44	0.107
Pair 86	GAPDH_NOR - GAPDH_REP	7.32E-02	1.89E-01	2.81E-02	1.65E-02	1.30E-01	2.6	44	0.013
Pair 87	GAPDH_NOR - GAPDH_NOREP	4.96E-02	1.82E-01	2.71E-02	-4.96E-03	1.04E-01	1.832	44	0.074
Pair 88	GAPDH_VIT - GAPDH_REP	2.36E-02	1.85E-01	2.76E-02	-3.20E-02	7.92E-02	0.855	44	0.397
Pair 89	GAPDH_VIT - GAPDH_NOREP	-1.59E-06	2.07E-01	3.09E-02	-6.23E-02	6.23E-02	0	44	1
Pair 90	GAPDH_REP - GAPDH_NOREP	-2.36E-02	1.42E-01	2.11E-02	-6.62E-02	1.90E-02	-1.116	44	0.27
Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 91	GGT1_NOR - GGT1_VIT	2.01E-02	8.11E-01	1.21E-01	-2.24E-01	2.64E-01	0.166	44	0.869
Pair 92	GGT1_NOR - GGT1_REP	8.56E-02	7.75E-01	1.15E-01	-1.47E-01	3.18E-01	0.742	44	0.462
Pair 93	GGT1_NOR - GGT1_NOREP	1.67E-01	7.92E-01	1.18E-01	-7.08E-02	4.05E-01	1.415	44	0.164
Pair 94	GGT1_VIT - GGT1_REP	6.56E-02	7.43E-01	1.11E-01	-1.58E-01	2.89E-01	0.592	44	0.557
Pair 95	GGT1_VIT - GGT1_NOREP	1.47E-01	6.47E-01	9.65E-02	-4.74E-02	3.42E-01	1.524	44	0.135
Pair 96	GGT1_REP - GGT1_NOREP	8.15E-02	7.44E-01	1.11E-01	-1.42E-01	3.05E-01	0.735	44	0.466

Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 97	GPD1_NOR - GPD1_VIT	-4.46E-02	7.82E-01	1.17E-01	-2.80E-01	1.90E-01	-0.383	44	0.704	
Pair 98	GPD1_NOR - GPD1_REP	-1.81E-01	9.03E-01	1.35E-01	-4.53E-01	9.03E-02	-1.345	44	0.185	
Pair 99	GPD1_NOR - GPD1_NOREP	2.88E-01	1.02E+00	1.52E-01	-1.74E-02	5.94E-01	1.9	44	0.064	
Pair 100	GPD1_VIT - GPD1_REP	-1.37E-01	8.36E-01	1.25E-01	-3.88E-01	1.15E-01	-1.096	44	0.279	
Pair 101	GPD1_VIT - GPD1_NOREP	3.33E-01	9.88E-01	1.47E-01	3.60E-02	6.30E-01	2.26	44	0.029	
Pair 102	GPD1_REP - GPD1_NOREP	4.69E-01	1.05E+00	1.56E-01	1.55E-01	7.83E-01	3.011	44	0.004	
Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 103	MAPK1_NOR - MAPK1_VIT	-2.51E-03	2.89E-01	4.31E-02	-8.94E-02	8.44E-02	-0.058	44	0.954	
Pair 104	MAPK1_NOR - MAPK1_REP	6.66E-02	2.94E-01	4.38E-02	-2.17E-02	1.55E-01	1.52	44	0.136	
Pair 105	MAPK1_NOR - MAPK1_NOREP	-8.02E-03	2.51E-01	3.74E-02	-8.35E-02	6.75E-02	-0.214	44	0.831	
Pair 106	MAPK1_VIT - MAPK1_REP	6.91E-02	2.61E-01	3.89E-02	-9.36E-03	1.48E-01	1.775	44	0.083	
Pair 107	MAPK1_VIT - MAPK1_NOREP	-5.51E-03	3.06E-01	4.55E-02	-9.73E-02	8.63E-02	-0.121	44	0.904	
Pair 108	MAPK1_REP - MAPK1_NOREP	-7.46E-02	2.56E-01	3.82E-02	-1.52E-01	2.32E-03	-1.954	44	0.057	

Paired Samples Test										
		Paired Differences						t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference					
					Lower	Upper				
Pair 109	MC1R_NOR - MC1R_VIT	5.46E-01	1.13E+00	1.68E-01	2.07E-01	8.84E-01	3.251	44	0.002	
Pair 110	MC1R_NOR - MC1R_REP	1.35E-01	9.56E-01	1.42E-01	-1.52E-01	4.22E-01	0.949	44	0.348	
Pair 111	MC1R_NOR - MC1R_NOREP	6.19E-01	1.06E+00	1.58E-01	3.01E-01	9.37E-01	3.927	44	0	
Pair 112	MC1R_VIT - MC1R_REP	-4.10E-01	9.62E-01	1.43E-01	-6.99E-01	-1.21E-01	-2.861	44	0.006	
Pair 113	MC1R_VIT - MC1R_NOREP	7.36E-02	8.81E-01	1.31E-01	-1.91E-01	3.38E-01	0.561	44	0.578	
Pair 114	MC1R_REP - MC1R_NOREP	4.84E-01	9.29E-01	1.38E-01	2.05E-01	7.63E-01	3.497	44	0.001	
Paired Samples Test										
		Paired Differences						t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference					
					Lower	Upper				
Pair 115	MC4R_NOR - MC4R_VIT	1.13E-01	3.87E-01	5.76E-02	-3.56E-03	2.29E-01	1.954	44	0.057	
Pair 116	MC4R_NOR - MC4R_REP	2.93E-02	4.80E-01	7.15E-02	-1.15E-01	1.73E-01	0.409	44	0.684	
Pair 117	MC4R_NOR - MC4R_NOREP	3.71E-02	4.45E-01	6.63E-02	-9.65E-02	1.71E-01	0.559	44	0.579	
Pair 118	MC4R_VIT - MC4R_REP	-8.33E-02	3.16E-01	4.71E-02	-1.78E-01	1.16E-02	-1.77	44	0.084	
Pair 119	MC4R_VIT - MC4R_NOREP	-7.55E-02	2.52E-01	3.75E-02	-1.51E-01	1.90E-05	-2.015	44	0.05	
Pair 120	MC4R_REP - MC4R_NOREP	7.79E-03	2.60E-01	3.88E-02	-7.05E-02	8.60E-02	0.201	44	0.842	

Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 121	MITF_NOR - MITF_VIT	1.52E-01	6.34E-01	9.46E-02	-3.89E-02	3.42E-01	1.604	44	0.116	
Pair 122	MITF_NOR - MITF_REP	3.43E-02	5.99E-01	8.93E-02	-1.46E-01	2.14E-01	0.383	44	0.703	
Pair 123	MITF_NOR - MITF_NOREP	3.71E-01	7.89E-01	1.18E-01	1.34E-01	6.08E-01	3.154	44	0.003	
Pair 124	MITF_VIT - MITF_REP	-1.17E-01	3.18E-01	4.74E-02	-2.13E-01	-2.19E-02	-2.477	44	0.017	
Pair 125	MITF_VIT - MITF_NOREP	2.19E-01	7.17E-01	1.07E-01	3.57E-03	4.35E-01	2.049	44	0.046	
Pair 126	MITF_REP - MITF_NOREP	3.37E-01	6.40E-01	9.53E-02	1.44E-01	5.29E-01	3.53	44	0.001	
Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 127	MLANA_NOR - MLANA_VIT	2.32E+00	8.96E-01	1.34E-01	2.05E+00	2.59E+00	17.337	44	0	
Pair 128	MLANA_NOR - MLANA_REP	3.04E-01	8.56E-01	1.28E-01	4.73E-02	5.62E-01	2.386	44	0.021	
Pair 129	MLANA_NOR - MLANA_NOREP	2.34E+00	8.70E-01	1.30E-01	2.08E+00	2.60E+00	18.041	44	0	
Pair 130	MLANA_VIT - MLANA_REP	-2.01E+00	9.41E-01	1.40E-01	-2.30E+00	-1.73E+00	-14.345	44	0	
Pair 131	MLANA_VIT - MLANA_NOREP	2.23E-02	7.96E-01	1.19E-01	-2.17E-01	2.62E-01	0.188	44	0.852	
Pair 132	MLANA_REP - MLANA_NOREP	2.03E+00	9.79E-01	1.46E-01	1.74E+00	2.33E+00	13.943	44	0	

Paired Samples Test										
		Paired Differences								
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)	
					Lower	Upper				
Pair 133	NFKB1_NOR - NFKB1_VIT	-1.59E-01	6.51E-01	9.71E-02	-3.54E-01	3.71E-02	-1.633	44	0.11	
Pair 134	NFKB1_NOR - NFKB1_REP	-1.03E-01	5.68E-01	8.47E-02	-2.74E-01	6.77E-02	-1.216	44	0.231	
Pair 135	NFKB1_NOR - NFKB1_NOREP	-1.46E-01	6.18E-01	9.21E-02	-3.31E-01	3.98E-02	-1.584	44	0.12	
Pair 136	NFKB1_VIT - NFKB1_REP	5.55E-02	4.77E-01	7.10E-02	-8.76E-02	1.99E-01	0.782	44	0.439	
Pair 137	NFKB1_VIT - NFKB1_NOREP	1.27E-02	5.64E-01	8.41E-02	-1.57E-01	1.82E-01	0.151	44	0.88	
Pair 138	NFKB1_REP - NFKB1_NOREP	-4.28E-02	3.69E-01	5.50E-02	-1.54E-01	6.81E-02	-0.778	44	0.441	
Paired Samples Test										
		Paired Differences								
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)	
					Lower	Upper				
Pair 139	PHACTR2_NOR - PHACTR2_VIT	-7.21E-02	4.78E-01	7.13E-02	-2.16E-01	7.16E-02	-1.011	44	0.317	
Pair 140	PHACTR2_NOR - PHACTR2_REP	-2.62E-02	4.68E-01	6.98E-02	-1.67E-01	1.14E-01	-0.375	44	0.709	
Pair 141	PHACTR2_NOR - PHACTR2_NOREP	-5.72E-02	5.30E-01	7.90E-02	-2.16E-01	1.02E-01	-0.724	44	0.473	
Pair 142	PHACTR2_VIT - PHACTR2_REP	4.59E-02	3.12E-01	4.65E-02	-4.78E-02	1.40E-01	0.987	44	0.329	
Pair 143	PHACTR2_VIT - PHACTR2_NOREP	1.49E-02	5.50E-01	8.19E-02	-1.50E-01	1.80E-01	0.182	44	0.857	
Pair 144	PHACTR2_REP - PHACTR2_NOREP	-3.10E-02	5.21E-01	7.76E-02	-1.87E-01	1.25E-01	-0.4	44	0.691	

Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 145	POMC_NOR - POMC_VIT	-4.61E-03	1.01E+00	1.51E-01	-3.09E-01	3.00E-01	-0.031	44	0.976	
Pair 146	POMC_NOR - POMC_REP	1.79E-01	8.57E-01	1.28E-01	-7.87E-02	4.36E-01	1.399	44	0.169	
Pair 147	POMC_NOR - POMC_NOREP	1.58E-01	9.48E-01	1.41E-01	-1.27E-01	4.43E-01	1.118	44	0.27	
Pair 148	POMC_VIT - POMC_REP	1.83E-01	8.14E-01	1.21E-01	-6.13E-02	4.28E-01	1.51	44	0.138	
Pair 149	POMC_VIT - POMC_NOREP	1.63E-01	9.21E-01	1.37E-01	-1.14E-01	4.39E-01	1.185	44	0.242	
Pair 150	POMC_REP - POMC_NOREP	-2.07E-02	8.91E-01	1.33E-01	-2.88E-01	2.47E-01	-0.156	44	0.877	
Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 151	TNF_NOR - TNF_VIT	4.59E-02	9.58E-01	1.43E-01	-2.42E-01	3.34E-01	0.322	44	0.749	
Pair 152	TNF_NOR - TNF_REP	-1.65E-01	1.08E+00	1.60E-01	-4.88E-01	1.58E-01	-1.028	44	0.309	
Pair 153	TNF_NOR - TNF_NOREP	-1.02E-01	1.06E+00	1.58E-01	-4.20E-01	2.16E-01	-0.646	44	0.521	
Pair 154	TNF_VIT - TNF_REP	-2.11E-01	1.02E+00	1.52E-01	-5.18E-01	9.62E-02	-1.384	44	0.173	
Pair 155	TNF_VIT - TNF_NOREP	-1.48E-01	9.83E-01	1.47E-01	-4.43E-01	1.47E-01	-1.01	44	0.318	
Pair 156	TNF_REP - TNF_NOREP	6.28E-02	8.30E-01	1.24E-01	-1.86E-01	3.12E-01	0.508	44	0.614	

Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 157	TNFRSF1A_NOR - TNFRSF1A_VIT	-2.14E-02	3.26E-01	4.86E-02	-1.19E-01	7.66E-02	-0.44	44	0.662	
Pair 158	TNFRSF1A_NOR - TNFRSF1A_REP	1.05E-01	3.52E-01	5.25E-02	-1.25E-03	2.10E-01	1.992	44	0.053	
Pair 159	TNFRSF1A_NOR - TNFRSF1A_NOREP	2.24E-02	2.85E-01	4.26E-02	-6.34E-02	1.08E-01	0.526	44	0.602	
Pair 160	TNFRSF1A_VIT - TNFRSF1A_REP	1.26E-01	2.85E-01	4.25E-02	4.04E-02	2.12E-01	2.966	44	0.005	
Pair 161	TNFRSF1A_VIT - TNFRSF1A_NOREP	4.38E-02	3.07E-01	4.58E-02	-4.85E-02	1.36E-01	0.956	44	0.344	
Pair 162	TNFRSF1A_REP - TNFRSF1A_NOREP	-8.22E-02	2.81E-01	4.20E-02	-1.67E-01	2.40E-03	-1.958	44	0.057	
Paired Samples Test										
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper				
Pair 163	TPT1_NOR - TPT1_VIT	-5.15E-02	1.35E-01	2.02E-02	-9.22E-02	-1.08E-02	-2.551	44	0.014	
Pair 164	TPT1_NOR - TPT1_REP	-3.84E-02	1.33E-01	1.99E-02	-7.85E-02	1.67E-03	-1.931	44	0.06	
Pair 165	TPT1_NOR - TPT1_NOREP	-5.43E-02	1.12E-01	1.66E-02	-8.78E-02	-2.08E-02	-3.264	44	0.002	
Pair 166	TPT1_VIT - TPT1_REP	1.31E-02	7.07E-02	1.05E-02	-8.16E-03	3.43E-02	1.242	44	0.221	
Pair 167	TPT1_VIT - TPT1_NOREP	-2.76E-03	7.09E-02	1.06E-02	-2.40E-02	1.85E-02	-0.261	44	0.795	
Pair 168	TPT1_REP - TPT1_NOREP	-1.59E-02	6.55E-02	9.77E-03	-3.55E-02	3.84E-03	-1.623	44	0.112	

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 169	TXN_NOR - TXN_VIT	-1.08E-01	2.35E-01	3.50E-02	-1.78E-01	-3.69E-02	-3.069	44	0.004
Pair 170	TXN_NOR - TXN_REP	-8.67E-02	2.58E-01	3.85E-02	-1.64E-01	-9.00E-03	-2.249	44	0.03
Pair 171	TXN_NOR - TXN_NOREP	-1.12E-01	2.50E-01	3.73E-02	-1.87E-01	-3.68E-02	-3.002	44	0.004
Pair 172	TXN_VIT - TXN_REP	2.08E-02	1.33E-01	1.98E-02	-1.91E-02	6.08E-02	1.052	44	0.299
Pair 173	TXN_VIT - TXN_NOREP	-4.46E-03	1.50E-01	2.24E-02	-4.95E-02	4.06E-02	-0.199	44	0.843
Pair 174	TXN_REP - TXN_NOREP	-2.53E-02	1.29E-01	1.92E-02	-6.40E-02	1.34E-02	-1.318	44	0.194
Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 175	TYRP1_NOR - TYRP1_VIT	2.33E+00	8.45E-01	1.26E-01	2.08E+00	2.58E+00	18.501	44	0
Pair 176	TYRP1_NOR - TYRP1_REP	9.26E-02	5.39E-01	8.04E-02	-6.95E-02	2.55E-01	1.151	44	0.256
Pair 177	TYRP1_NOR - TYRP1_NOREP	2.31E+00	1.04E+00	1.55E-01	2.00E+00	2.63E+00	14.971	44	0
Pair 178	TYRP1_VIT - TYRP1_REP	-2.24E+00	1.01E+00	1.51E-01	-2.54E+00	-1.93E+00	-14.79	44	0
Pair 179	TYRP1_VIT - TYRP1_NOREP	-1.55E-02	1.18E+00	1.76E-01	-3.71E-01	3.40E-01	-0.088	44	0.93
Pair 180	TYRP1_REP - TYRP1_NOREP	2.22E+00	1.14E+00	1.69E-01	1.88E+00	2.56E+00	13.109	44	0

Paired Samples Test										
		Paired Differences								
		Mean	Std. Deviation	Std. Error	the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)	
					Lower	Upper				
Pair 181	WN17A_NOR - WN17A_VIT	-1.02E-01	1.15E+00	1.71E-01	-4.47E-01	2.43E-01	-0.597	44	0.554	
Pair 182	WN17A_NOR - WN17A_REP	-2.11E-01	1.16E+00	1.73E-01	-5.60E-01	1.38E-01	-1.217	44	0.23	
Pair 183	WN17A_NOR - WN17A_NOREP	-2.31E-01	1.23E+00	1.84E-01	-6.02E-01	1.39E-01	-1.258	44	0.215	
Pair 184	WN17A_VIT - WN17A_REP	-1.09E-01	1.32E+00	1.96E-01	-5.04E-01	2.87E-01	-0.553	44	0.583	
Pair 185	WN17A_VIT - WN17A_NOREP	-1.29E-01	1.34E+00	1.99E-01	-5.31E-01	2.73E-01	-0.648	44	0.521	
Pair 186	WN17A_REP - WN17A_NOREP	-2.04E-02	1.23E+00	1.84E-01	-3.91E-01	3.50E-01	-0.111	44	0.912	

