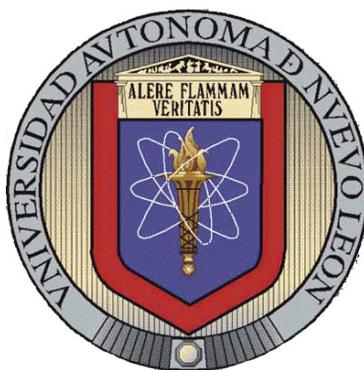


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN
DE PACIENTES CON VITILIGO**

Por

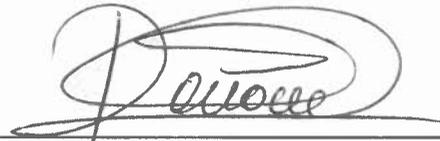
M.C. MAURICIO ANDRES SALINAS SANTANDER

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

ENERO, 2012

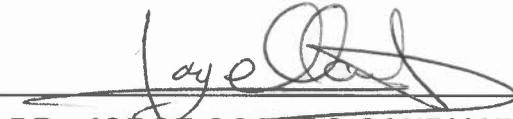
ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PACIENTES CON VITILIGO

Aprobación de la Tesis:



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

Directora de Tesis



DR. JORGE OCAMPO CANDIANI

Co-Director de Tesis



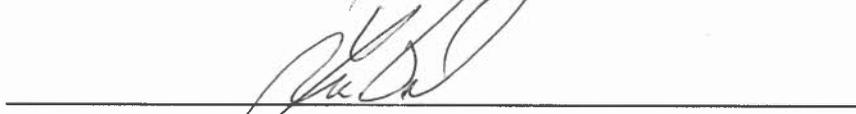
DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Co-Director de Tesis



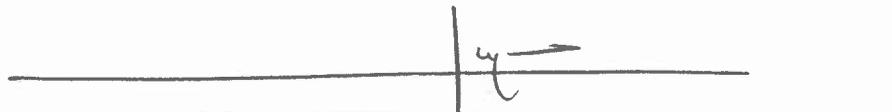
DR. med. OLIVERIO WELSH LOZANO

Comisión de Tesis



DR. C. LUCIO VERA CABRERA

Comisión de Tesis



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud (CIDCS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Vo.Bo.

Dra. Rocío Ortiz López
Directora de Tesis

"Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber."

Albert Einstein

A MI FAMILIA
ARACELY, KAREN y LAURA

A MIS PADRES
RAFAEL y GLORIA

Gracias por regalarme esta oportunidad, por su apoyo incondicional y por permitir realizar este sueño.

A ustedes que cerraron sus ojos mientras me acompañaban.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a mi directora de tesis. Dra. Rocío Ortiz López, por sus enseñanzas, sugerencias y la confianza depositada durante estos años.

A los Doctores Jorge Ocampo Candiani, Augusto Rojas Martínez, Oliverio Welsh Lozano y Lucio Vera Cabrera, por su apoyo, consejos y sugerencias que contribuyeron en el enriquecimiento de esta tesis.

A mis maestros, por sus enseñanzas y guía profesional durante esta jornada.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Dra. Celia Sanchez, Rafael León, Armando Lagos, Geovana Calvo, Cristina Cantú y Don Lalo, quienes me ayudaron en todo momento, me hicieron sonreír muchas veces cuando algo salía mal alentándome a seguir. Por sus aportes, sugerencias y por el apoyo incondicional brindado todo este tiempo.

A mis amigos Daniel, Juan, Norma y Benito por animarme a seguir, siempre regalarme una sonrisa y formar parte de mi familia.

A Juany y Vicky por su apoyo en todo momento.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y al Servicio de Dermatología de la UANL que colaboró en la realización de la presente tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que me apoyó económicamente durante mi estudio de Doctorado.

INDICE

	Página
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Clasificación	2
1.4 Etiología	3
1.5 Diagnóstico	4
1.6 Curso y pronóstico	4
1.7 Tratamiento del vitiligo	5
1.8 Melanocito y su participación en el vitiligo	5
1.8.1 Mecanismo de melanogénesis	6
1.9 Fisiopatología del vitiligo	8
1.9.1 Teoría Neural del vitiligo	9
1.9.2 Teoría Autoinmune	10
1.9.3 La Teoría genética	11
1.9.4 Teoría autocitotóxica	15
1.9.5 Hipótesis bioquímica	16
1.9.6 Cambios en los perfiles de expresión observados en pacientes con vitiligo	17
2. JUSTIFICACION	20
3. OBJETIVOS	22
3.1.1 Objetivo General:	22
3.1.2 Objetivos Específicos	22
4. ESTRATEGIA GENERAL	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1 Selección de Pacientes	24
5.1A Criterios de inclusión considerados para casos	24
5.1B Criterios de exclusión	24
5.1C Criterio de eliminación	25
5.1D Criterios de Inclusión considerados para controles	25
5.2 Material biológico	25
5.3 Origen de los reactivos	25
5.4 Equipos empleados	26
5.5 Procesamiento de muestras	27
5.5.1 Determinación de perfil tiroideo completo.	27
5.5.2 Biometría hemática completa.	28
5.5.3 Extracción de ADN genómico	28
5.5.4. Extracción de ARN total de biopsias de piel	29
5.5.5. Verificación de la Calidad del RNA	30
5.5.5.1 Temperatura de equilibrado	30

	Página
5.5.5.2 Limpieza de los electrodos.	30
5.5.5.3 Preparación del gel y solución de tinción del gel.	30
5.5.5.4 Preparación de muestras y escalera de RNA	31
5.5.5.5 Preparación de los chips.	31
5.5.5.6 Carga de muestras y escalera de RNA en el chip.	31
5.5.5.7 Corrida y análisis de RNA	32
5.6. Marcaje de muestras e hibridación con microarreglos.	33
5.6.1. Dilución de controles de RNA Poly-A	33
5.6.2. Síntesis de la primera hebra de cDNA	34
5.6.3. Síntesis de la segunda hebra de cDNA	34
5.6.4. Transcripción <i>in vitro</i> y síntesis de aRNA marcado	35
5.6.5. Purificación de aRNA	36
5.6.6. Elución de aRNA	37
5.6.7. Evaluación y fragmentación de aRNA	37
5.6.8. Fragmentación de aRNA marcado	38
5.6.9. Hibridación de las muestras	39
5.6.10. Lavado, tinción y escaneo del microarreglo.	40
5.7. Procesamiento y análisis de expresión de los resultados de microarreglos HGU 133 plus.	40
5.7.1. Análisis de vías de genes diferencialmente expresados.	42
5.8. Validación por qPCR de genes diferencialmente expresados.	42
5.8.1. Preparación de cDNA:	42
5.8.2. PCR cuantitativa con SYBR Green.	43
5.8.2.1 Estandarización de condiciones de qPCR	43
5.8.2.2 Curva de eficiencia	44
5.8.2.3 Determinación de concentración utilizando LightCycler® 480 Real-Time PCR System	45
5.8.2.4 Cuantificación relativa	45
5.9. Identificación de mutaciones y polimorfismos.	46
5.9.1.a. Genotipificación del polimorfismo TNF- α -308.	46
5.9.1.b Detección de nivel de TNF- α en suero.	47
5.9.2. Genotipificación del polimorfismo FOXD3 -639.	47
5.9.3. Genotipificación del polimorfismo AIRE 961.	47
5.9.4. Genotipificación del polimorfismo IL-8 -251.	48
5.10. Análisis de variación del número de copias por microarreglos de genotipificación Genome-Wide Human SNP Array 6.0	48
5.10.1 Preparación del DNA genómico	49
5.10.2 Digestión con <i>StyI</i>	49
5.10.3 Ligación de productos digeridos con <i>StyI</i>	50
5.10.4 PCR de productos ligados <i>StyI</i>	51
5.10.5 Digestión con <i>Nspl</i>	52
5.10.6 Ligación de productos digeridos con <i>Nspl</i>	53
5.10.7 PCR de productos ligados <i>Nsp</i>	54

	Página
5.10.8 Calidad y purificación de productos de PCR (<i>Sty-Nsp</i>)	55
5.10.9 Fragmentación de productos purificados	57
5.10.10 Marcaje de productos fragmentados	58
5.10.11 Hibridación	58
5.10.12 Lavado y tinción de chips	59
6. RESULTADOS	61
6.1. RESULTADOS OBJETIVO 1	61
6.1.1 Análisis demográficos	61
6.1.2. Resultados de análisis clínicos	64
6.2. RESULTADOS OBJETIVO 2	66
6.2.1. Selección de muestras para la realización de perfiles de expresión génica.	66
6.2.2. Marcaje e hibridación de muestras, escaneado de microarreglos	69
6.2.3. Normalización de datos de microarreglos	69
6.2.4. Selección de genes diferencialmente expresados	72
6.2.5. Perfiles de expresión muestras con vitiligo activo vs estable	74
6.2.6. Perfiles de expresión muestras sin lesión de pacientes con Vitiligo activo vs estable	74
6.2.7. Perfiles de expresión muestras con vitiligo vulgar vs sin lesión de pacientes	74
6.2.8. Perfiles de expresión muestras con vitiligo vulgar vs muestras control	74
6.2.9. Perfiles de expresión muestras pigmentadas vitiligo vulgar vs muestras control	75
6.2.10. Análisis de vías	76
6.3. Validación por qPCR de genes diferencialmente expresados.	81
6.3.1. Validación por tiempo real del gen Tiorredoxina (TXN)	83
6.3.2. Validación por tiempo real del gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	84
6.3.3. Validación por tiempo real del gen Catepsina L2 (CTSL2)	85
6.3.5. Validación por tiempo real de CTSB, DCT, RAB1A, TYRP1 e YWHAB	86
6.4. RESULTADOS OBJETIVO 4	86
6.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE CAMBIOS EN GENES EN VITILIGO	86
6.4.1.1A Genotipificación del polimorfismo TNF- α -308	86
6.4.1.1B Detección de niveles de TNF- α en suero	87
6.4.1.2 Genotipificación del polimorfismo FOXD3 -639	87
6.4.1.3 Genotipificación del polimorfismo AIRE 961.	87
6.4.1.4 Genotipificación del polimorfismo IL-8 -251.	87
6.4.2. Análisis de variación del número de copias por microarreglos de genotipificación Genome-Wide Human SNP Array 6.0	90

6.5. RESULTADOS OBJETIVO 5	Página
6.5.1. Integración de datos e identificación de rutas de señalización	97
7. DISCUSIÓN	102
8. CONCLUSIONES	108
9. PERSPECTIVAS	110
BIBLIOGRAFIA	111
ANEXO 1	Forma de Consentimiento Informado
ANEXO 2	Encuesta clínica de Pacientes

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Patrones de incidencia de vitiligo	2
Cuadro 2. Clasificaciones clínicas del vitiligo.	3
Cuadro 3. Lista de genes candidatos para vitiligo.	14
Cuadro 4: programas para amplificación de RNA en termociclador.	33
Cuadro 5. Programa de qPCR.	44
Cuadro 6: Historia familiar de vitiligo.	63
Cuadro 7: Historia personal de patologías tiroideas.	65
Cuadro 8: Biopsias obtenidas de pacientes con vitiligo vulgar.	66
Cuadro 9: Biopsias obtenidas de donadores controles.	66
Cuadro 10: Características de las muestras de controles y pacientes seleccionadas para el análisis de perfil de expresión génica mediante microarreglos	68
Cuadro 11: Genes alterados vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan.	77-78
Cuadro 12: Genes alterados en muestras sin lesión de vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan.	79-80
Cuadro 13. Listado de primers para amplificación por tiempo real.	82
Cuadro12. Distribución de genotipos y frecuencias de alelos TNF- α -308 en pacientes con vitiligo y muestras control.	86
Cuadro 14. Distribución de genotipos y frecuencias de alelos TNF- α -308 en pacientes con formas activas de vitiligo (AVV)[12A] y estables (SVV) [12B].	88
Cuadro 15: Distribución por frecuencias genotípicas y alélicas en casos y controles para AIRE 961 y para el gen IL8 -251.	89
Cuadro 16: Alteraciones identificadas por Microarreglos de SNP-CNVs que involucra regiones amplias.	95
Cuadro 17: Agrupaciones funcionales iniciales identificadas por DAVID data base para piel sin lesión de pacientes con vitiligo.	98
Cuadro18: Agrupaciones funcionales iniciales identificadas por DAVID data base para lesiones de pacientes con vitiligo.	99

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema resumido de la ruta melanogénica a partir de fenilalanina	6
Figura 2: Esquema de las rutas de señalización melanogénicas activadas.	7
Figura 3: Esquema de la ruta melanogénica.	8
Figura 4: Principales teorías propuestas para explicar el proceso de despigmentación observado en el vitiligo.	9
Figura 5. Representación de loci de susceptibilidad y genes candidatos para vitiligo.	12
Figura 6: Esquema de la Teoría de Convergencia de los factores asociados a Vitiligo.	17
Figura 7: Estrategia general.	23
Figura 8. Electroferograma de ARN total de una muestra.	32
Figura 9. Electroferograma de aRNA.	38
Figura 10. Electroferograma de aRNA.	39
Figura 11: Noreste de México.	61
Figura 12: Edad de inicio del vitiligo por grupos.	62
Figura 13: Tipos clínicos de vitiligo en pacientes del Noréste de México.	63
Figura 14: Edad de inicio vs historia familiar de la enfermedad.	64
Figura 15: Enfermedades asociadas a vitiligo.	65
Figura 16: Electroforesis capilar de RNA total de muestras de biopsias.	67
Figura 17. Detección de pixeles mediante Expresión Console.	69
Figura 18. Distribución de datos después de aplicar el método “Quantile Normalization”.	70
Figura 19. Distribución de datos después de aplicar el método de Loess de normalización global.	71

	Página
Figura 20. Heatmap de Correlación de Pearson y Spearman (señal) de los datos 72 analizados mediante el arreglo 3'IVT.	72
Figura 21. Esquema de análisis de expresión en muestras de pacientes y Controles.	73
Figura 22. Interacción entre genes diferencialmente expresados asociados a la ruta del pigmento.	81
Figura 23. Ejemplo de grafica de amplificación Ct vs Fluorescencia obtenida para el gen TXN en muestras de pacientes con vitiligo y controles.	83
Figura 24. Gráfica expresión relativa de TXN.	84
Figura 25. Gráfica expresión relativa de TNF- α	85
Figura 26. Gráfica expresión relativa de CTSL2.	85
Figura 27. Árboles genealógicos de familias analizadas para variaciones en número de copias.	90
Figura 28: Imagen obtenida del análisis de intensidades de hibridación.	91
Figura 29: Imagen obtenida del análisis por cariotipo obtenido mediante Genotyping console.	92
Figura 30. Alteraciones encontradas en las familias analizadas con microarreglos de SNP-CNV.	93
Figura 31. Semejanzas entre resultados de expresión y SNP-CNV.	100
Figura 32. Procesos involucrados en el desarrollo de vitiligo.	102

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
°C	Grado celsius
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
CNV	Variación de número de copia
Ct	Ciclo critic del ingles Threshold cycle
DCT	Dopacromo tautomerasa
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacetico
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
hrs	Horas
g	Gravedades
IC	Intervalo de confianza
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
M	Concentración molar
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
O.R.	Razón de posibilidades del inglés Odds ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
qPCR	PCR cuantitativa

RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RQI	Índice de integridad del RNA
seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
T°	Temperatura
TE	Amortiguador Tris-EDTA
Tm	Temperatura de fusión o disociación del ADN del inglés melting
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides
TSNT	Solución de lisis Tritón-SDS
TYR	Tirosinasa
TYRP1	Proteína relacionada 1 con TYR
UV	Ultra violeta
VV	Vitiligo vulgar
VVA	vitiligo vulgar activo
VVE	vitiligo vulgar estable
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMEN

M.C. Mauricio Andrés Salinas Santander

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Fecha de graduación

Área de estudio: Genética Molecular

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 116

Título del estudio: Análisis del perfil de expresión de Pacientes con Vitiligo

Introducción: El vitiligo es un desorden congénito o adquirido específico de la piel, que afecta a los melanocitos, y que se caracteriza por originar máculas o manchas bien definidas acrómicas o hipocrómicas en las cuales hay pérdida de melanocitos funcionales, o estos se encuentran indiferenciados. La prevalencia de ésta enfermedad se encuentra entre el 0.1 y el 2% de la población mundial.

De los diferentes tipos de vitiligo descritos, el diseminado o vulgar (VV) es el más común, siendo la principal causa de consulta por esta patología en los servicios de Dermatología. Este tipo de vitiligo se caracteriza por la presencia de máculas diseminadas, a menudo distribuidas de forma bilateral, pudiendo ser o no simétricas. Además, se ha clasificado en Activo (VVA) y Estable (VVE), considerando para dicho efecto tiempo de manifestación de nuevas áreas despigmentadas y crecimiento de lesiones.

Las causas del vitiligo son complejas y aún no se han comprendido en su totalidad, siendo necesario formular una serie de teorías para explicar su origen, sugiriéndose que es causada por una combinación de factores ambientales, autoinmunes y genéticos. Se ha propuesto que un componente genético multifactorial predispone a ciertos individuos a desarrollar esta patología, lo cual sería también responsable de la compleja presentación clínica de la enfermedad.

En la actualidad, no se cuenta con estudios de expresión globales que permitan discriminar, de manera significativa, entre grupos de vitiligo o definir a ciencia cierta cuál o cuáles son las causas de esta patología, e incluso predecir el curso de la enfermedad. Además no se cuenta con datos epidemiológicos y estadísticos actuales para la población Mexicana (4% descrito en la década de 60').

Objetivo: Seleccionar perfiles de expresión que permitan discriminar un vitiligo vulgar estable (VVE) de uno activo (VVA), e identificar genes que participan en el desarrollo/origen de la enfermedad.

Estrategia experimental: 1) Estratificación de los pacientes de acuerdo a sus características clínicas, bioquímicas, inmunológicas y familiares, y establecimiento de un banco de muestras. 2) Análisis de expresión, realizado utilizando la tecnología de microarreglos (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix) en biopsias de 5 pacientes con VVA, biopsias de 5 pacientes con VDE (obtenidas tanto del área despigmentada como pigmentada) sin antecedentes familiares y enfermedades relacionadas. La comparación con los resultados obtenidos de 8 muestras controles, permitió identificar genes involucrados en el mecanismo patológico de la enfermedad. 3) Selección de genes diferencialmente expresados a partir de los resultados de expresión, que posteriormente serán validados mediante RT-PCR cuantitativa en otro grupo mayor de biopsias provenientes de sujetos con VV. 4) Estudio de asociación mediante análisis genético amplio en dos familias afectadas por vitiligo, empleando la tecnología de microarreglos (GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0 Affymetrix), con la finalidad de identificar nuevos cambios en genes relacionados con la enfermedad. A partir de los resultados obtenidos serán propuestos y/o confirmados blancos moleculares asociados al desarrollo de la enfermedad y definidos si los eventos en la

región despigmentada son diferentes o no entre los tipos de vitiligo analizados. Finalmente nos permitirá identificar posibles firmas genómicas, rutas de señalización y blancos terapéuticos para el vitiligo.

Resultados: Fueron recolectadas muestras, datos epidemiológicos y clínicos provenientes de 218 pacientes con vitiligo, en la Consulta de Dermatología HU, de los cuales se incluyeron en este estudio 198 pertenecientes al Noreste de México.

A partir del análisis de la Historia Clínica y diagnóstico médico de cada paciente, se identificó al VV como el tipo más común de vitiligo en la población en estudio (88.8%). En cuanto a la edad de presentación, un 60.6% desarrolla la enfermedad antes de los 30 años, observándose también que, en aquellos pacientes que presentaron antecedentes familiares de la enfermedad, hay un aumento en el riesgo de padecerla a una edad temprana. Además, se observa que las enfermedades autoinmunes asociadas mayoritariamente a vitiligo corresponden a las de naturaleza tiroidea (22.2%). Por otra parte, 73.2% de los pacientes identificaron un factor estresante asociado al inicio de la enfermedad. Estos resultados no distan de los reportados en otras poblaciones.

En cuanto al análisis de expresión, fueron observados diferencias entre los patrones obtenidos para las biopsias de piel de tejido sano y afectado por vitiligo de pacientes, al compararlos con las muestra de piel control. De estos, 482 genes en las lesiones de vitiligo y 338 genes de tejido sano de pacientes presentaron valores de expresión alterados ($p < 0.05$), compartiendo entre ellos 286 genes, lo que nos indica que la piel sana de estos pacientes ya presenta algún grado de daño. De acuerdo a la agrupación funcional de los genes identificados, se observa que las rutas mayoritariamente comprometidas en vitiligo son las de fosforilación oxidativa, pigmento, melanosomas, transporte de vesículas y, en particular entre los tejidos provenientes de cada paciente la del pigmento, con una disminución significativa de la expresión en el gen TYRP1 involucrado en la biosíntesis de melanina. Teniendo en cuenta estos resultados, fueron seleccionados para su posterior análisis por tiempo real los genes CathepsinL2, RAB1A, Thioredoxin, CathepsinB, Dopacromotautomerasa, TYRP1, YWHAB y Stomatin, todos involucrados en rutas comunes de transporte, pigmento, gránulos de pigmento, melanosoma, unión de vesículas a la membrana, inflamación y lisosomas.

Finalmente, el análisis genómico amplio realizado en dos familias afectadas por vitiligo permitió identificar una serie de SNPs, deleciones y duplicaciones en regiones cromosómicas en la que se encuentran presentes genes relacionados con enfermedades de naturaleza autoinmune, e involucrados con la pigmentación. En particular, se puede destacar un gran número de SNPs presentes en el gen Solute carrier family 45, member 2 (Slc45a2), cuyos alelos han sido descritos como relacionados en la pigmentación del pelo, piel y ojos, y presentes en una serie de alteraciones en el pigmento descritas en diferentes poblaciones en estudio, posiblemente debido a que su producto participa en la melanogénesis, en conjunto con DCT, TYR, TYRP1 y otros.

Conclusión: La piel sana de pacientes con vitiligo, presenta alteraciones en sus patrones de expresión, los cuales son un indicador del daño ya presente en el tejido y que pueden conducir al desarrollo de la patología. Por otra parte, se refuerza la importancia de las rutas involucradas en la melanogénesis y que la compleja interacción posiblemente existente entre los genes asociados con pigmento, transporte, generación de melanosomas, óxido reducción y otros, dan cuenta de la compleja presentación clínica de esta enfermedad.

CAPITULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

El vitiligo pertenece a una familia de enfermedades cutáneas congénitas o adquiridas caracterizadas por falta de pigmentación en la piel, conocidas también como leucodermas, y que son causadas por ausencia de melanocitos o por inhabilidad de éstos para generar melanina.

Esta afección se caracteriza por originar máculas o manchas bien definidas, acrómicas o hipocrómicas en las cuales se ha observado el deterioro de la función del melanocito, células de la piel encargadas de la producción de la melanina. Para estos se ha distinguible histoquímicamente su destrucción selectiva, y si están presentes se encuentran en un estado indiferenciado sin actividad melanogénica.¹

La enfermedad comienza en la forma de una o varias máculas asintomáticas y de límites precisos, que gradualmente aumentan de tamaño, de forma y distribución variada, que puede afectar cualquier región corporal, principalmente a la piel, y con frecuencia en cara, cuello, axilas, dorso de las manos, alrededor de los orificios naturales como la boca, los ojos, nariz, el ombligo y los genitales. También se ha observado la formación de máculas en las membranas mucosas, aunque predominan en algunas áreas como superficies extensoras y salientes óseas (rodillas, nudillos y tobillos). Además se ha descrito que puede comprometer el pigmento de otros lugares, incluidos los ojos y el cabello^{2,3,4}.

1.2 Epidemiología

Esta enfermedad afecta entre el 0.1 y el 2% de la población mundial. Sin embargo su prevalencia varía considerablemente entre la población o grupo étnico analizado, estimándose un 0.14% en Rusia, entre 1% a 2.5% en Estados Unidos y Japón⁵, pero la mayor incidencia se ha descrito en México (4%) y en la India (8.8%)^{1,6} (Cuadro 1). Afecta por igual a ambos sexos y a todas las razas⁷, siendo particularmente importante en pacientes morenos, negros o blancos que se broncean intensamente, debido al drástico contraste entre zonas pigmentas y despigmentadas de la piel, causando que más de dos terceras partes de estos

pacientes sufren un intenso estrés psicosocial, por lo que es de gran importancia el tratamiento de esta patología².

Cuadro1. Patrones de incidencia de vitiligo.

Porcentaje Incidencia	Lugar	Autor	Año publicación
0.5-2%	Mundial	Lerner ⁸	1978
1-4%	Mundial	Parsad y cols. ⁹	2003
0.5-1%	Mundial	Taïeb y Picardo ¹⁰	2007
0.1 - 2%	Mundial	Halder y cols. ¹¹	2009
1%	USA, estimación	Nordlund ¹²	1997
1%	USA, estimación	Halder y cols. ¹³	2009
2%	Japón, estimación	Nordlund ¹⁴	1997
0.15-0.32%	Turquía	Akay y cols. ¹⁵	2010
0.38%	Dinamarca, población representativa	Howitz y cols. ¹⁶	1977
4%	México, clínicas dermatológicas	Canizares ¹⁷	1960
4%	México, clínicas dermatológicas	Ruiz-Maldonado ¹⁸	1964
2.6%	México, clínicas dermatológicas (p. pediátricos)	Ruiz-Maldonado ¹⁹	1977
3.3%	México, N.L., clínica dermatológica	Ocampo y Cols. ²⁰	2007
1.64%	Japón	Arakawa ²¹	1944
1.25-8.8%	India	Sehgal y Srivastava ²²	2007

1.3 Clasificación

En cuanto a la clasificación del vitiligo, han sido propuestos diversos esquemas basados en la localización, distribución y extensión de las lesiones despigmentadas. De acuerdo a la localización de las lesiones, el vitiligo ha sido clasificado en vitiligo localizado, generalizado y universal. Esta clasificación fue propuesta por Nordlund ^{1, 7,23}. Una segunda clasificación, basada en los tipos clínicos determinados mediante un ensayo de estimulación de secreción del sudor fue determinada en 1977 por Koga. En esta última el vitiligo se subdivide en dos tipos, que pueden presentar un mecanismo patogénico probablemente diferente: vitiligo no segmentario (o tipo A) y vitiligo segmentario (o tipo B)^{1,7,24,25}. En el cuadro 2 se presenta 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 Progresivo 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 de Koebner)²⁶. En el caso del vitiligo estable el tamaño y número de las lesiones se presenta en estado estacionario por varios años, y no se ha descrito el desarrollo del fenómeno de Koebner en este caso²⁶. Además, en este último caso, se ha propuesto que eventualmente está ocurriendo la destrucción de los melanocitos²⁷.

Cuadro 2. Clasificaciones clínicas del vitiligo.

Clasificación	Nordlund ⁸			Koga ²⁴	
	Tipo	Localizado	Generalizado	Universal	Tipo A
Subtipos / características	Focal: una o más manchas en un área, pero no en un patrón segmental.	Acrofacial: Sólo afecta a cara y extremidades distales.	Universalis: Involucra a más de un 80% de despigmentación en el cuerpo	(no segmentario) 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.	(segmentario) 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
	Segmental: una o más máculas en la distribución dermatomal	Vulgar: Distribución simétrica de las lesiones en zonas típicas, por todo el cuerpo. Es la forma más común.			
	Mucosal: sólo afecta a mucosas	Mixto: Segmental / vulgar o acrofacial			

1.4 Etiología

El vitiligo se puede presentar a cualquier edad. Se ha observado que la mayoría de los casos comienzan entre los 10 y los 30 años y se manifiestan por las manchas blancas que resultan de la ausencia del pigmento en la piel²⁸. Se ha descrito que casi la mitad de los casos se presentan durante la etapa de crecimiento activo, antes de los 20 años, y entre un 70% a 80% antes de los 30 años¹.

Además, el vitiligo puede estar asociado con enfermedades autoinmunes tales como tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus, enfermedad de Addison, alopecia y con anomalías oftálmicas como la iritis, entre otras^{4,29,30}. La presencia de linfocitos en la dermis de lesiones tempranas, así como la presencia de autoanticuerpos contra melanocitos y antígenos del sistema melanogénico en la circulación de muchos pacientes que presentan la enfermedad activa y la respuesta al tratamiento con agentes inmunomoduladores como corticoesteroides y fototerapia apoyan esta asociación. Por lo general ha sido descrito que los anticuerpos presentan un limitado acceso con los antígenos blanco expresados dentro de células viables. Por otra

parte se ha propuesto que los anticuerpos contra antígenos intracelulares probablemente son generados en respuesta al daño del melanocito. También ha sido reportada la asociación de vitiligo con la presencia de antígenos leucocitarios humanos HLA-DR4, con DW7, DR1, B13, A2, B21, CW6, DR53, A19 y DR52⁵.

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la obtención de la historia clínica completa del paciente junto con la realización de un exhaustivo examen físico y un detenido examen de la piel. El interrogatorio debe incluir datos importantes como la edad de comienzo y curso de la enfermedad, los posibles factores precipitantes (consumo de fármacos, lesión reciente, estado infeccioso) ¹, además del estado emocional del paciente, entre otros.

En ciertos casos de dificultad diagnóstica, el examen con la lámpara de Wood es necesario para evaluar las máculas en los pacientes con piel blanca y para identificar máculas en las áreas protegidas del sol. Por otra parte, para confirmar el diagnóstico, puede llevarse a cabo una biopsia cutánea³¹.

Una vez establecido el diagnóstico de vitiligo, se debe descartar enfermedades asociadas, para lo cual se solicitarán los exámenes de laboratorio necesarios: T4, TSH, (por radioinmunoensayo), glucemia en ayunas, hemograma, test de estimulación de ACTH y otras para descartar enfermedades asociadas³².

Puesto que se cuenta con pruebas de que las personas con vitiligo corren un mayor riesgo de presentar enfermedades autoinmunes, en particular de la glándula tiroides, se hace necesario someter a revisiones periódicas al paciente, tratando de detectar estas enfermedades³¹.

El diagnóstico diferencial del vitiligo comprende: Lupus eritematoso, pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, leucodermias químicas, lepra, piebaldismo, síndrome de Waardenburg, hipomelanosis post inflamatoria, liquen escleroso y atrófico, morfea, esclerosis tuberosa, nevo despigmentoso, nevo anémico, esclerosis tuberosa, hipomelanosis idiopática, entre otros ^{7,32}.

1.6 Curso y pronóstico

El vitiligo es una enfermedad crónica, lenta y progresiva. La evolución natural del vitiligo generalizado es impredecible, es más característica una progresión lenta

marcada por periodos de evolución y estabilidad que muestran relación con algún evento desencadenante. En el caso de observarse repigmentación, esta se inicia como una pigmentación macular marginal o perifolicular siendo más frecuente en las áreas expuestas al sol. En cuanto al vitiligo segmentario, ha sido descrito que usualmente presenta una evolución muy estable. La repigmentación espontánea ocurre en un pequeño porcentaje de los pacientes, reportándose en la literatura porcentajes de 5%-8% hasta un 20% de los casos, sin embargo esta repigmentación rara vez es cosméticamente aceptable⁷.

1.7 Tratamiento del vitiligo

Dependiendo del tipo de vitiligo, se han sugerido una serie de tratamientos alternativos, tanto médicos como quirúrgicos. El uso intralesional de corticosteroides puede ser una posibilidad que, hasta ahora es poco usado debido a complicaciones experimentadas por el paciente como son el dolor y los posibles efectos secundarios inherentes de la medicación, como por ejemplo atrofia de la piel, telangiectasia y hemorragias intradérmicas. El tratamiento sistémico con corticoides tópicos y orales ha sido utilizado con la finalidad de bloquear el sistema inmune en la áreas despigmentadas, disminuyendo así el daño a los melanocitos⁵. La Fototerapia, empleando luz UV o Laser se ha empleado con la finalidad de estimular la melanogénesis³³. La terapia quirúrgica, envuelve el trasplante de un parche de melanocitos o melanocitos crecidos en cultivo probenientes de piel normal, ha sido apropiado para el tratamiento de ciertos vitiligos focales. En algunos casos, el tratamiento óptimo de pacientes con vitiligo requiere la combinación de las terapias antes mencionadas.

En casos extremos, en aquellos pacientes que presentan más de un 80% de la piel afectada, se ha empleado la despigmentación de la melanina como terapia. Para cada tipo de terapia ha sido observada tanto sus ventajas así como también sus desventajas y escasa recuperación de los pacientes^{2,7,34,46}.

1.8 Melanocito y su participación en el vitiligo

El melanocito es una célula dendrítica que deriva de la cresta neural y que migra hacia la epidermis y al folículo piloso durante la etapa de embriogénesis. El proceso que da origen a la pigmentación en vertebrados ocurre en el melanocito³⁵. El color

de la piel depende de la actividad de estas células, particularmente de su capacidad de producir y almacenar melanina en vesículas especializadas conocidas como melanosomas, un tipo particular de organelo membranosos que contiene las enzimas necesarias para que se desarrolle la melanogénesis, especialmente tirosinasa, proceso que es finamente regulado mediante estímulo hormonal de MSH. Estos organelos son transportados desde los melanocitos hasta los queratinocitos adyacentes en la piel. Ha sido descrito que los melanocitos son las células comprometidas en el caso de pacientes con vitiligo, reportándose pérdida de actividad o destrucción selectiva de ellas.

1.8.1 Mecanismo de melanogénesis

La producción de melanina se lleva a cabo a partir de L-tirosina, o a partir de hidroxilación de L-fenilalanina que produce el amino ácido antes mencionado³⁶ (figura 1), la cual es acumulada en melanosomas dentro de los melanocitos. La hidroxilación de L-tirosina produce L-hidroxifenilalanina, también conocida como L-DOPA, la cual sirve como precursor de melanina y catecolaminas, productos generados a partir de dos rutas separadas.

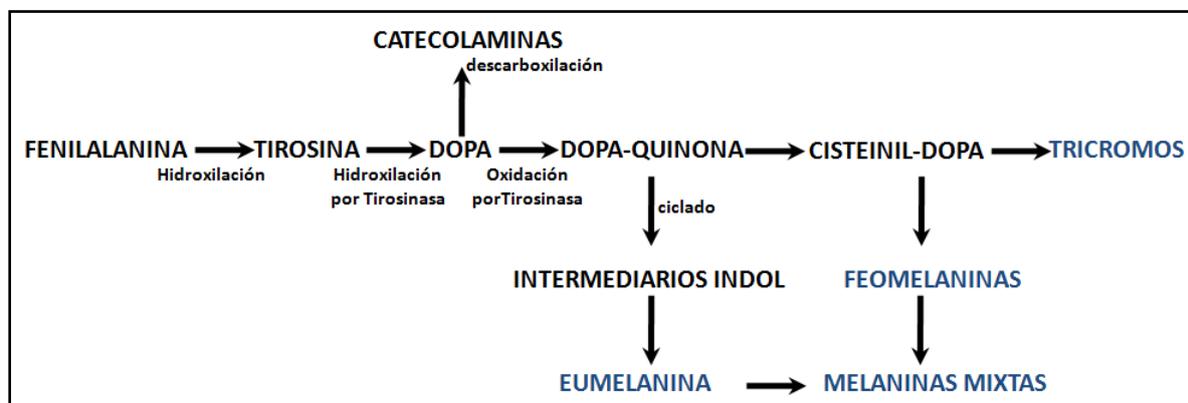


Figura 1. Esquema resumido de la ruta melanogénica a partir de fenilalanina. En la figura se indican sólo algunos de los productos e intermediarios de la ruta, así como las reacciones involucradas.

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 proceso³⁹. Se ha descrito que algunas de las hormonas y productos producidos por el eje

Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, además de sus respectivos receptores y 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, están relacionados con el proceso de melanogénesis^{20,37,38} (figura 2). 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 melanina y otras funciones de los melanocitos diferenciados³⁹.

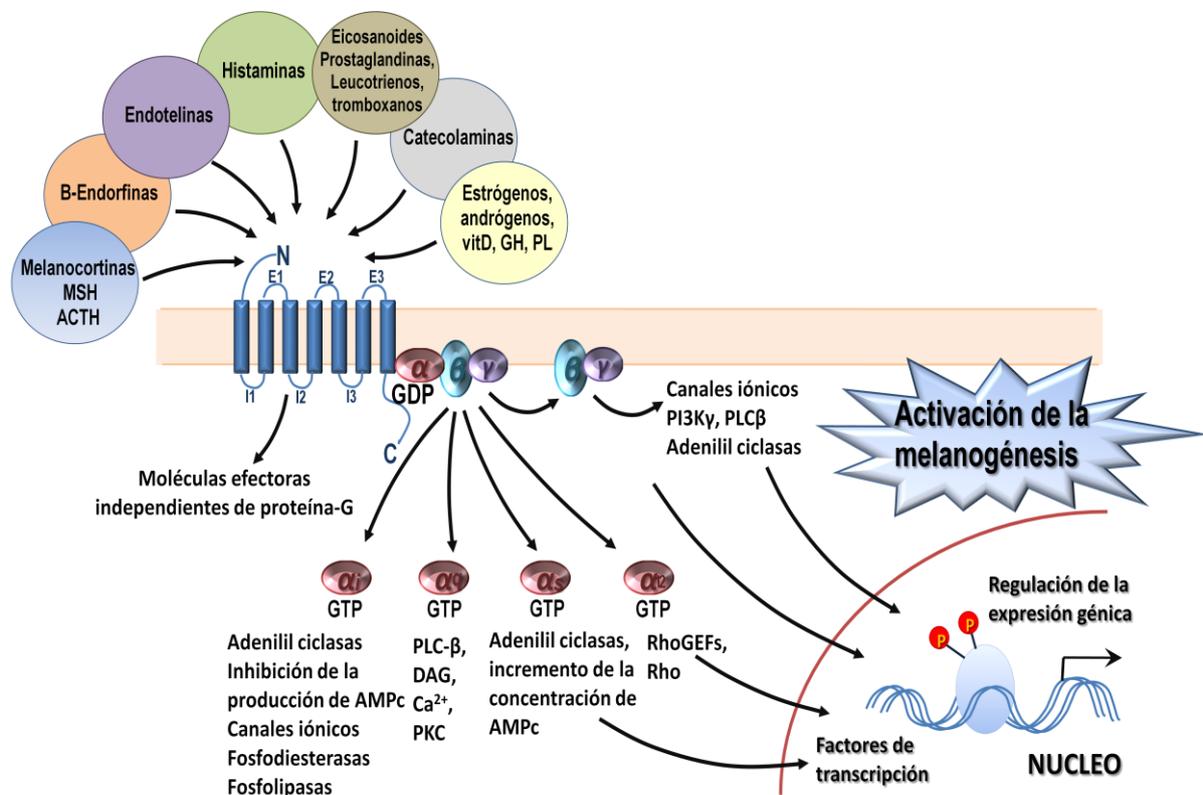


Figura 2. Esquema de las rutas de señalización melanogénicas activadas. En la figura se indican algunas de las hormonas que activan la cascada de señalización intracelular y ejemplos de los intermediarios de la ruta de señalización que conducen a la activación a nivel nuclear de la ruta melanogénica.

Además ha sido reportado el papel de la luz UV en la melanogénesis⁴⁰. En este caso, la pigmentación es inducida por proliferación de melanocitos, seguido por la síntesis y activación de la tirosinasa y, finalmente por la transferencia de los melanosomas a los queratinocitos. Se ha descrito, de la misma forma, que en la activación de la ruta de melanogénesis participa la radiación UV a través de señalización mediada por óxido nítrico (NO) y GMPc^{33,41}. Cabe mencionar que

muchas de las hormonas activadas en este proceso son detectadas con niveles alterados en estados depresivos, alteraciones de la Tiroides, en una serie de síndromes y enfermedades inmunes relacionados con la patología^{3,42}.

El efecto de esta desregulación puede conducir a una sobre producción y acumulación de radicales libres, así como especies reactivas de oxígeno, que en conjunto conducen a la alteración de la homeostasis y daño celular. En este caso, el estrés oxidativo es el evento patogénico que desencadena la degeneración del melanocito⁴³, con acumulación de H₂O₂ en la epidermis de los pacientes con la enfermedad activa. Por otra parte, la acumulación de intermediarios de la biosíntesis de la melanina, así como las enzimas involucradas pueden actuar como agentes inmunógenos, desencadenando respuesta autoinmune tanto celular como humoral contra los antígenos del sistema melanogénico⁵ (figura 3).

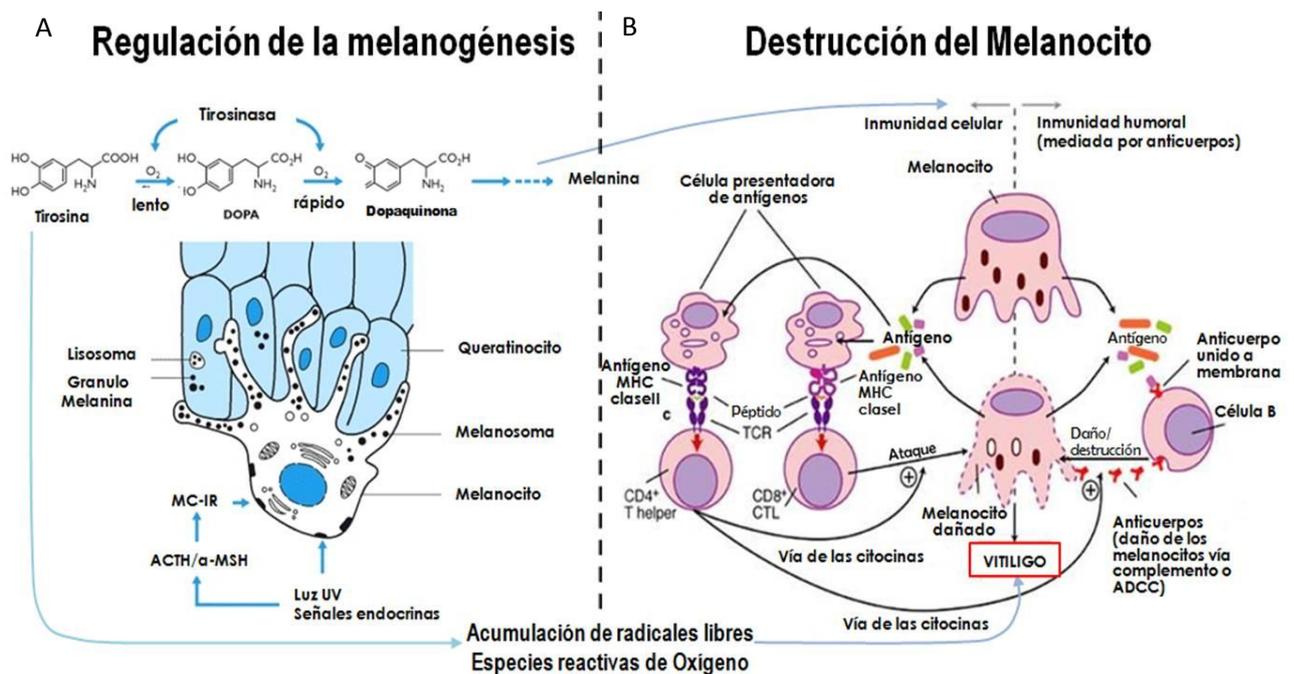


Figura 3. Esquema de la ruta melanogénica. A) Regulación de la melanogénesis a nivel de melanocito, producción de la melanina, intermediarios de la ruta melanogénica y acumulación de especies reactivas de oxígeno. B) Se describe la destrucción del melanocito por activación de la respuesta inmune celular y humoral, así como el efecto desencadenante de la vía de citocinas a partir de especies reactivas de oxígeno y sobreproducción de intermediarios tóxicos, desencadenando vitiligo.

1.9 Fisiopatología del vitiligo

Las causas del vitiligo son complejas y aún no se han comprendido 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 patogénesis. 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, 44, 45} (figura 4).

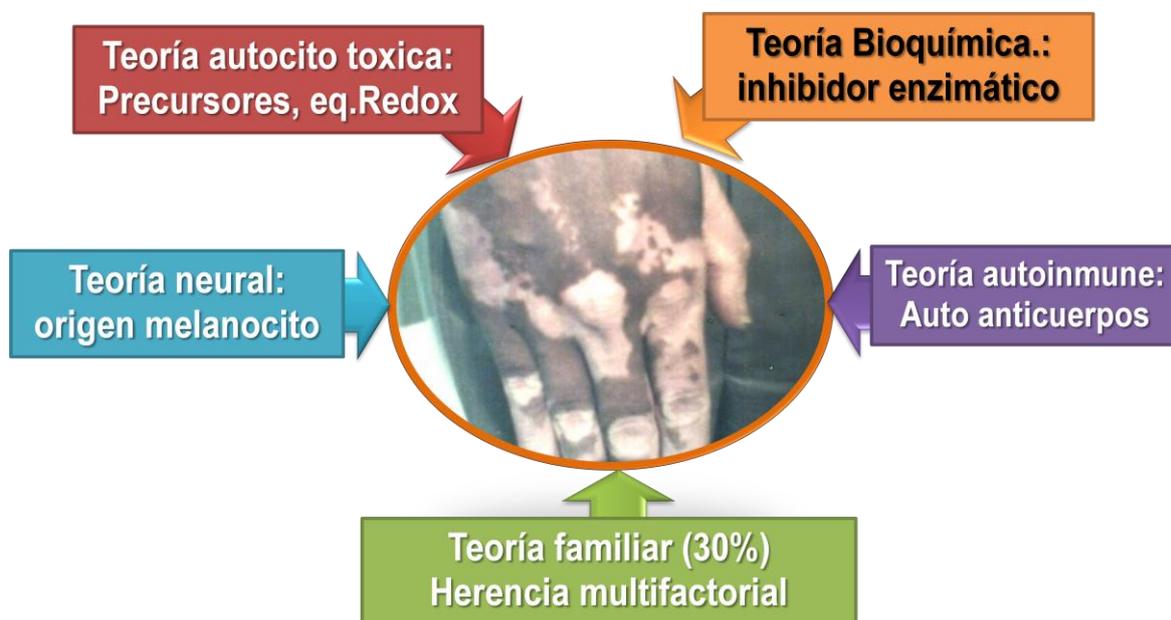


Figura 4. Principales teorías propuestas para explicar el proceso de despigmentación observado en el vitiligo. En la figura se presentan las 5 teorías y la causa a que se atribuye la falta de pigmento en la piel.

1.9.1 Teoría Neural del vitiligo

Se basa principalmente en la observación clínica de la variante segmentaria de la enfermedad. El origen embrionario del melanocito a partir de la cresta neural y su morfología dendrítica similar a las células nerviosas, además de la existencia en la hipófisis de una hormona estimulante del melanocito apoya esta teoría. Esta hipótesis sugiere que algunos mediadores neuroquímicos, posiblemente secretados por las proximidades de las terminaciones nerviosas, sean citotóxicos para las células encargadas de la pigmentación, provocando su destrucción o la inhibición de la reacción tirosina-tirosinasa. Esta teoría es apoyada por la existencia de variante

segmentaria de vitiligo, variante que aparece tempranamente en la niñez o juventud y se extiende rápidamente dentro de un dermatomo. Éste afecta a una parte del cuerpo deteniéndose la despigmentación en la línea media corporal (patrón dermatomal) después de un período de tensión emocional severa, y por el inicio de enfermedad en pacientes con trastornos neurológicos o con lesión del nervio periférica⁷ y el aumento en la síntesis o descarga de catecolaminas se asocia con la actividad de la enfermedad, esto sugiere que las catecolaminas participan en el proceso de despigmentación. Esto se evidencia por la comunicación morfológica y funcional entre los melanocitos epidérmicos y el sistema nervios^{45, 46}.

En el caso específico de este proyecto, esta variante de vitiligo no será analizada, ya que se incluirán solamente pacientes que han presentado la forma de vitiligo generalizada (no segmentaria).

1.9.2 Teoría Autoinmune

La hipótesis autoinmune propone que un trastorno del sistema inmunológico causa la destrucción de los melanocitos. Primero, la observación frecuente de que varios desórdenes autoinmunes (enfermedades de latiroides, nevos de Sutton, diabetes mellitus juvenil, anemia perniciosa y la enfermedad de Addison) son asociadas con vitiligo. Por otra parte también ha sido demostrada particularmente una significativa asociación del vitiligo con el mal funcionamiento de la tiroides y/o con anticuerpos anti tiroides⁴⁷.

Concerniente a la inmunidad humoral, los anticuerpos de superficie, principalmente pertenecientes a la clase IgG, y las antígenos citoplasmáticos de melanocitos se han encontrado presentes en pacientes con vitiligo. Los autoantígenos más frecuentemente identificados son los antígenos relacionadas con las moléculas HLA clase I, Tirosinasa, la proteína relacionada a tirosinasa TRP-1 y TRP-2 (siendo los últimos tres antígenos específicos de melanocito⁴⁸). Sin embargo, el papel patogénico de los anticuerpos anti-melanocito aún permanece confuso. Los niveles de suero de anticuerpos contra antígenos melanocíticos parecen tener correlación con la actividad y la extensión de la enfermedad y con la presencia de otros trastornos inmunes, y con la disminución de los pacientes con vitiligo que responden a la terapia⁴⁷. Parece ser que tanto la inmunidad humoral como celular cooperan en la destrucción de melanocitos.

Con relación a la inmunidad celular, se han detectado células CD4 y CD8 positivas en infiltrado de la piel pigmentada subyacente a la lesión de vitiligo⁴⁹. Un número sustancial de células T infiltrantes expresa el antígeno de linfocito cutáneo (CLA) típico de células de T buscadoras de piel⁴⁷. También se localizó células T citotóxicas CLA positivas en contraposición a la desaparición de melanocitos en la piel perilesional⁵⁰. En pacientes con vitiligo, las altas frecuencias de Melan-A/Mart1 (un antígeno melanosomal) de células T específicas CD8 positivas, fueron descubiertas en sangre periférica⁵¹. De modo interesante, linfocitos T Melan-A/Mart1 específicos CD8 positivos, fueron identificados en las lesiones inflamatorias de destrucción melanocítica seguido de la infusión clones de Célula T Melan-A/Mart1 específicas CD8 positivas en pacientes que presentan melanoma⁵²: éste descubrimiento se ha postulado como la evidencia directa de que las células T median el desencadenamiento y progresión del vitiligo. Sin embargo, estudios recientes sugieren también que el proceso autoinmune puede ser secundario; como consecuencia a una respuesta contra el melanocito con función alterada⁵³.

1.9.3 La 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, sin embargo estos últimos no son comunes, y su prevalencia varía dependiendo de la población analizada. 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^{5,7,28}. Existen varios reportes 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^{3,54}(cuadro3), además de estudios de ligamiento y asociación que han proporcionado fuerte evidencia de la participación de diferentes genes ha susceptibilidad de vitiligo, localizado en diferentes cromosomas²⁸ (figura 5).

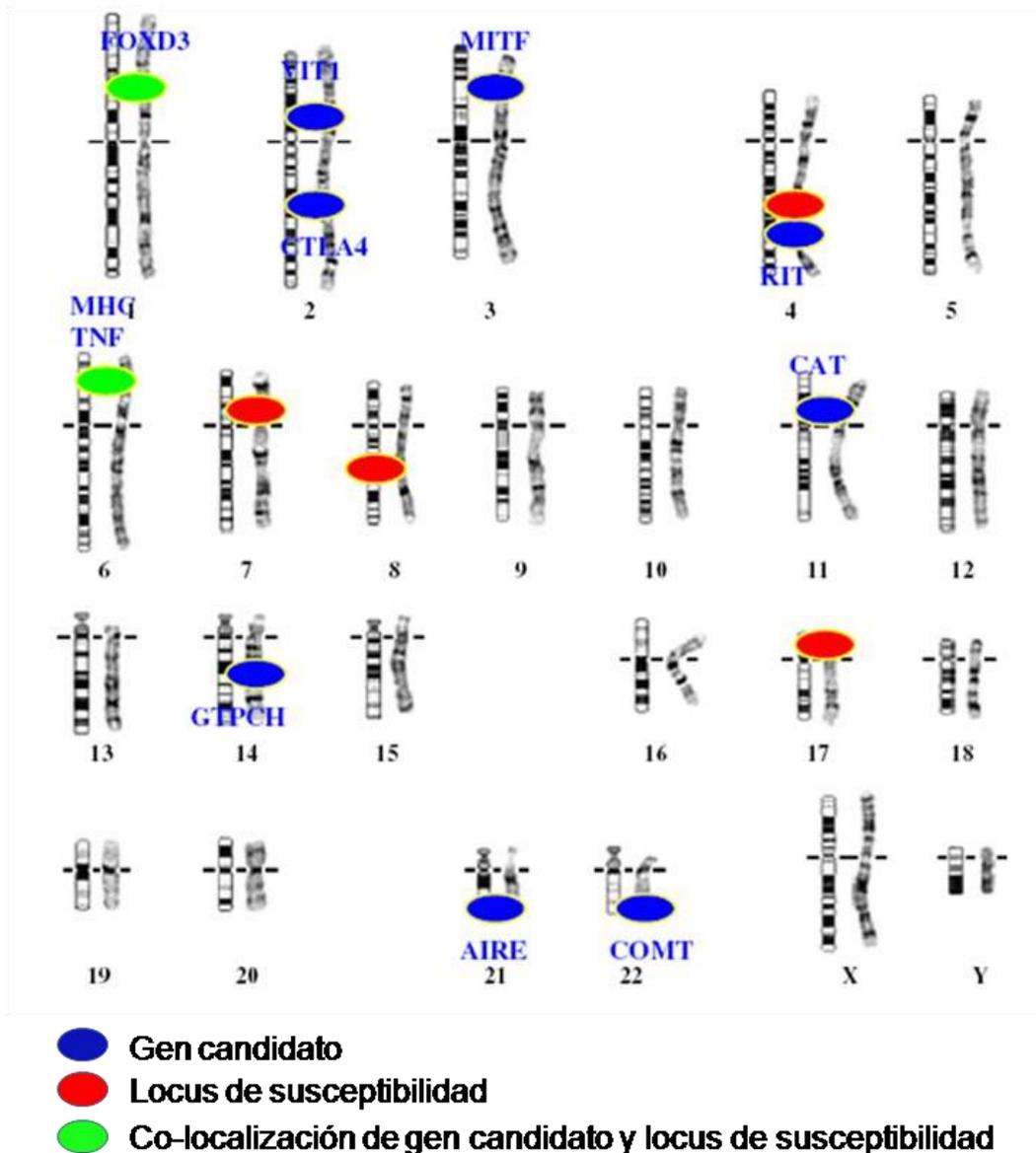


Figura 5. Representación de loci de susceptibilidad y genes candidatos para vitiligo. Ovalo azul: genes candidatos, ovalo rojo: locus de susceptibilidad y ovalo verde colocación de genes candidatos y locus de susceptibilidad indicando que FOXD3, TNF y MHC serían los más fuertemente candidatos asociados a susceptibilidad de vitiligo.

En general, se han realizado dos grandes estudios de ligamiento para vitiligo generalizado sobre familias que presentan la patología en muchas generaciones, y otras enfermedades autoinmunes asociadas. En el primero muestran un locus de susceptibilidad autoinmune denominado AIS1 1p31.3-p32.2^{55,56}. Y en un estudio extendido, con una cohorte de 102 familias, se confirmó la localización del locus AIS1 y se identificaron dos nuevos *loci* adicionales: AIS2 que se localiza sobre el cromosoma 7 y AIS3 sobre el cromosoma 8. Adicionalmente el locus SLEV1 también fue confirmado sobre el cromosoma 17⁵⁷. Por otra parte se identificó un

quinto locus, AIS4, localizado sobre el cromosoma 4 (4q13-q21), obtenido a partir de un estudio de ligamiento realizado en población china⁵⁸. Por otro lado, un estudio de ligamiento realizado sobre familias que presentan numerosos miembros afectados por vitiligo reveló un nuevo *loci* de susceptibilidad en 6p21.3-21.4⁵⁹, región en la que se encuentran mapeados los genes para HLA y TNF. Con respecto a este último se ha observado que la expresión de TNF- α se encuentra aumentada significativamente en la región periférica a la lesión en comparación con tejido sano⁶⁰.

Es interesante observar que de los *loci* propuestos como de susceptibilidad a vitiligo, excepto el AIS3, derivan principalmente de grupos de familias asociadas con otras patologías autoinmunes, y fuertemente asociados a diabetes autoinmune. En particular, ha sido descrita tanto la asociación de vitiligo y patologías autoinmunes entre las que encontramos artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, hepatitis autoinmune, entre otras, así como también con anomalías presentes en los locus que codifica a los antígenos de superficie (HLA), sugiriendo que algunos de los factores genéticos están compartidos entre vitiligo y otras enfermedades autoinmunes⁶¹. Algunos de los cambios reportados en los pacientes con vitiligo han sido descritos en Dr4, Dr6, B13, BW35, DQw3, DRW6, DRW52, A2 y A30^{62, 63}.

En cuanto a los genes que pueden mediar susceptibilidad a vitiligo, se han descrito, a parte del ligamiento genético, mediante otras aproximaciones que pueden ser empleadas para lograr su identificación. Por ejemplo, pueden ser realizados análisis de expresión génica con la finalidad de identificar aquellos genes que se encuentran diferencialmente expresados en tejidos o células provenientes de pacientes con vitiligo en comparación con controles sanos, o preferentemente de tejido afectado por la enfermedad en comparación con tejido sano proveniente del mismo paciente. Sin embargo, este tipo de estudio puede generar una enorme lista de genes candidatos de los cuales es dificultoso poder identificar cuáles son los principales causales y cuáles son regulados de manera alterada como consecuencia secundaria del desarrollo de la patología.

Otra aproximación empleada para identificar genes relacionados con la patología corresponde a Estudios de Asociación Genética. En ella se han realizado pruebas sobre genes candidatos específicos, los cuales han sido considerados como

probables implicados en la susceptibilidad sobre la base de una hipótesis biológica previa. A partir de ellas muchos genes han sido descritos como asociados a vitiligo, algunos de los cuales no corresponden a las posiciones identificadas en los estudios de ligamiento y, a pesar de estudios exhaustivos, ninguno de estos genes ha logrado asociarse contundentemente con alguna de las formas de vitiligo⁶⁰.

Cuadro 3. Lista de genes candidatos para vitiligo^{3,44}

Localización	Gen	Función
1p32-p31	FOXD3	Factor de transcripción envuelto en diferenciación de los melanoblastos
1p13	PTPN22	Tirosina fosfatasa intracelular
2p21	VIT 1 (FBXO11)	Protein Arginina N-metil transferasa; puede regular la expresión MSH6 (mismatch repair)
2q33	CTLA4	Transmisión de señal inhibitoria de linfocitos T
3p14.1-p12.3	MITF	Factor de transcripción
4q12	KIT	Tirosín cinasa transmembranal
6p21.3	TNF	Codifica citocinas proinflamatorias secretadas principalmente por macrófagos.
6q25.1	ESR	Receptor e estrógenos, factor de transcripción activado por ligando
10q24.1	FAS	Factor de superficie celular, miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral.
11p13	CAT	Catalasa
12q12-q14	VDR	Receptor de vitamina D
12q13	MYG1	Expresión aumentada en melanocitos de vitiligo
17p13	NALP 1	Actúa sobre genes que regulan inflamación (caspasas 1 y 5) y muerte celular
17q23	ACE	Cinasa
18q21.3	BCL2	Suprime la apoptosis en una variedad de células
21q22.3	AIRE	Factor de transcripción
22q11.2	COMT	Catecolamina-O-metil transferasa

De entre los genes descritos, KIT representa a un gen con un potencial importante en la patogénesis de vitiligo ya que codifica para un receptor de tirocina cinasa denominado c-kit, que se expresa sobre la superficie de los melanocitos, células germinales y células madre hematopoyéticas. Algo muy interesante también a considerar es que varios casos de despigmentación y vitiligo ocurren después de tratamientos con inhibidores de tirosinasa (STI-571 and SU 11428). Por otra parte el ligando de c-kit es SCF (del inglés stem cell factor), está involucrado en la proliferación y supervivencia del melanoblasto.

BCL2 es un blanco transcripcional dependiente de KIT en melanocitos. La disminución de la expresión de BCL2 en melanocitos aumenta la susceptibilidad de estas células a apoptosis, e interesantemente SCF protege fuertemente al melanocito de apoptosis asociada a TNF (TRAIL). Por lo anterior, la ruta de señalización que involucra a SCF/c-KIT pudiera ser un blanco importante de estudio para dilucidar la patogénesis de vitiligo⁶⁰.

En un estudio comparativo realizado en familias con y sin vitiligo, se reportó un fuerte ligamiento en el gen NALP1 localizado en el cromosoma 17 en 17p13⁶⁴. NALP1 participa en una cascada de señalización que regula inflamación y muerte celular. Se expresa en concentraciones elevadas en células T y en células de Langerhans, que están involucradas en autoinmunidad de la piel. Entre los productos inflamatorios de NALP1 se encuentran las caspasas 1 y 5, las cuales a su vez activan citocinas inflamatorias como IL-1 β . Y se ha reportado que IL-1 β se encuentra anormalmente sobre-expresado en pacientes con vitiligo. El análisis de la secuencia nucleotídica del gen en pacientes y controles reveló la presencia de varias mutaciones que pudieran contribuir a la enfermedad. Estos datos deben aún ser validados con ensayos de funcionalidad de la proteína mutada.

Finalmente, otro de los genes candidatos que se encuentra en proceso de estudio por algunos grupos de investigación es FOXD3 ("Forkhead box" D3). FOXD3 está localizado sobre el cromosoma 1 (1p32ep31) y es un factor de transcripción que suprime el desarrollo de los melanocitos de la cresta neural⁶⁵. Por lo tanto, la desregulación (sobre-expresión) de FOXD3 pudiera dañar el desarrollo del melanocito e inducirlo a una muerte celular masiva, anticipada. Más aún, FOXD3 también regula la diferenciación endodérmica incluyendo tiroides, páncreas, adrenales e intestino; y otros factores de transcripción afectando a FOX están involucrados en diferentes síndromes autoinmunes. Las mutaciones en FOXD3 conllevan a niveles elevados de FOXD3 lo cual ya ha sido reportado en una de las familias ligadas a AIS1⁶⁰.

1.9.4 Teoría autocitotóxica

La destrucción de los melanocitos que se produce en el vitiligo ha sido atribuida a la citotoxicidad de algunos precursores de la melanina.

Durante síntesis bioquímica de melanina, son generados como intermediarios quinonas (dopaquinona) e índoles específicos (indol-5,6-quinona, a partir del cual

se polimeriza la melanina). Estos intermediarios metabólicos pueden ser citotóxicos para los melanocitos^{66,67}. Por lo tanto, el elevado estrés oxidativo, resultante del incremento de estos intermedios sobre el umbral que puede ser combatido por los genéticamente susceptible melanocitos de pacientes con vitiligo, produce citotoxicidad y, por consiguiente es inducida la muerte celular. Finalmente, se puede iniciar una respuesta autoinmune que facilita la remoción de los melanocitos, perpetuando la enfermedad⁶⁸.

1.9.5 Hipótesis bioquímica

Se ha propuesto que la epidermis tiene un defecto bioquímico en la actividad de la enzima 4-alfa-hidroxitetrahidrobiopterina deshidratasa que da por resultado vitiligo. Este factor es un inhibidor competitivo para la fenilalanina hidroxilasa. Su presencia excesiva en la epidermis bloquea la producción de L-tirosina desde la fenilalanina y también la transcripción del gen de la tirosinasa. Es también causante de la producción exagerada de catecolaminas por los queratinocitos, que finalmente podrían participar en el mecanismo de lesión de los melanocitos. Esta teoría sugiere que los melanocitos no son destruidos, sino que son funcionalmente inactivados⁶⁹.

El conjunto de los factores en los cuales se sustenta cada una de las teorías antes mencionadas, presumiblemente involucrados en la patogénesis del vitiligo, sin embargo no son suficientes para explicare el mecanismo que da origen a esta patología. Por esta razón se ha llegado a la formulación de la **Teoría de Convergencia**⁷⁰, en la cual los diferentes elementos causales pueden actuar sinérgicamente o por separado provocando la desaparición de los melanocitos. Factores genéticos, estrés oxidativo, autoinmunidad, mutaciones, cambios en el ambiente celular, todo puede contribuir al desarrollo de la enfermedad en sujetos genéticamente predispuestos (figura 6).

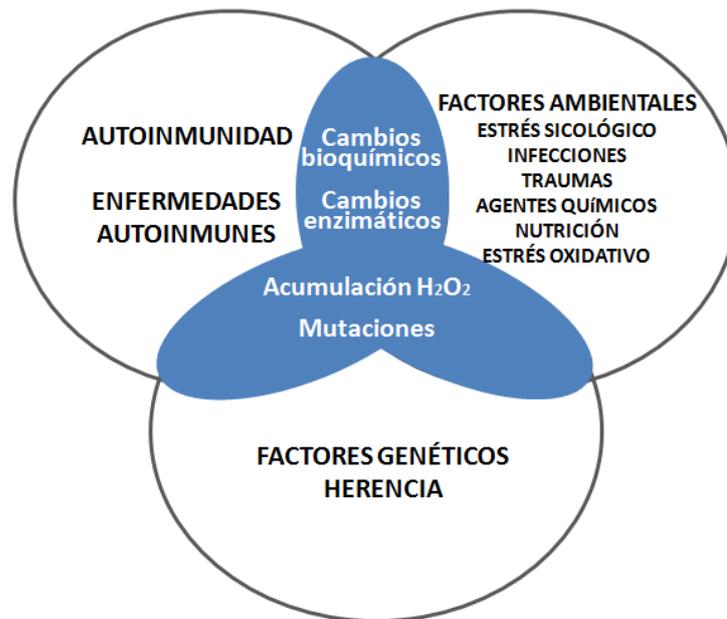


Figura 6. Esquema de la Teoría de Convergencia de los factores asociados a Vitiligo. En ella se representa como pueden actuar los factores de manera independiente o en conjunto para el desarrollo de la patología.

1.9.6 Cambios en los perfiles de expresión observados en pacientes con vitiligo

En un trabajo reciente fue analizado el perfil transcripcional de melanocitos de pacientes con vitiligo vulgaris⁵³. Para ello fueron utilizados microarreglos de oligonucleótidos con los cuales fue posible identificar 859 genes diferencialmente expresados en melanocitos de 5 pacientes con vitiligo en comparación con respectivos controles sanos, los cuales están relacionados principalmente con el desarrollo del melanocito, procesamiento intracelular y transporte de tirosinasa, empaquetamiento y transporte de melanosomas, adhesión celular y presentación de antígenos. Además en este estudio se sugiere que la autoinmunidad desarrollada contra los melanocitos puede ser un acontecimiento secundario causado por el funcionamiento anormal de éste tipo de células en el vitiligo antes mencionado.

A pesar de ser este el estudio más relevante sobre posibles mecanismos moleculares en la patogénesis de la enfermedad, el trabajo presenta varios inconvenientes en el diseño del estudio:

a) El primero de ellos es que para el análisis de expresión realizado, el RNA que se utilizó no provenía directamente de las biopsias obtenidas de los pacientes con

vitiligo o de los controles, debido a que las biopsias primero se disgregaron y las células obtenidas se mantuvieron por más de 20 días en cultivo con un medio específico de diferenciación de melanocito, y posteriormente a partir de los cultivos, se realizó la extracción del RNA que se utilizó para el análisis de expresión. Esta manipulación en cultivo de los melanocitos puede alterar notablemente los patrones de expresión con respecto a lo que ocurre cuando se analiza la expresión de las células obtenidas directa e inmediatamente de la biopsia del paciente. b) El segundo inconveniente es el limitado número de pacientes analizados, pues solo incluyeron a 5 sujetos con vitiligo y 5 sujetos controles; y finalmente, c) el tercer inconveniente de este análisis fue el uso de microarreglos con número limitado de genes, que no cubrían todo el genoma.

Para confirmar estos hallazgos tan interesantes, es importante reproducir el estudio de expresión utilizando mayor número de pacientes, idealmente muestras con un mismo background ambiental y genético y utilizando arreglos que cubran todo el genoma.

Por otra parte, a partir del análisis de expresión de genes involucrados en el sistema de melanocortinas⁷¹ y de genes participantes en las rutas de señalización de la melanogénesis⁷² previamente definidos, mediante el empleo de sondas TaqMan fue posible observar alteraciones en los niveles de expresión de tejido afectado por vitiligo, en comparación con los patrones obtenidos a partir de tejido sano proveniente de pacientes con vitiligo y los observados en piel normal de controles. En ambos trabajos, no fue encontrada diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de distintos grupos de vitiligo. Sin embargo el resultado obtenido pudo ser debido a: (a) el número de muestras consideradas en cada caso no es el suficiente para emitir alguna conclusión. (b) Sólo son analizados genes que previamente se ha establecido su participación en rutas melanogénicas, y por ende no proporcionan un nuevo aporte en cuanto a blancos moleculares y a elucidar el mecanismo del vitiligo.

Por otro lado se han iniciado algunos análisis proteómicos en muestras de suero de pacientes con vitiligo en el afán de definir el repertorio de anticuerpos circulantes en estos pacientes, para identificar los blancos proteicos que éstos están reconociendo y el compartimiento subcelular donde éstos se encuentran localizados^{73,74}. Hasta la

fecha, estos trabajos son muy preliminares y aún no se han definidos blancos proteicos asociados a vitiligo.

CAPITULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

Las causas del vitiligo son complejas y aún no se han comprendido en su totalidad. De ahí la gran inquietud por dilucidar los mecanismos moleculares que lo desencadenan.

A pesar del progreso logrado a nivel clínico, no existe cura efectiva o un protocolo de prevención para esta enfermedad.

No hay un parámetro biológico/químico para determinar el tipo/etapa del vitiligo (hace que la experiencia clínica y la historia del paciente sean el medio disponible para la predicción y pronóstico del vitiligo).

Los estudios en vitiligo describen los parámetros que se encuentran alterados en estos pacientes, no se han enfocado a encontrar la etiología molecular y los factores genéticos que intervienen en la aparición y desarrollo de la enfermedad.

Gracias a las herramientas moleculares se han podido postular a un grupo de genes candidatos asociados a la enfermedad como son: TNF, HLA, COMT, CTL4, KIT, FOXD3, NALP1, etc, siendo FOXD3 y NALP1 los que pudieran estar más estrechamente relacionados con el daño primario al melanocito, lo cual aún está siendo corroborado por varios investigadores.

Algunos genes asociados a vitiligo, aun no han sido validados por otros grupos.

A la fecha se cuenta con un solo trabajo en el que se realiza análisis de expresión global en 5 pacientes mediante el empleo de microarreglos³⁸ en el que se reportan genes potencialmente involucrados en:

- i) el desarrollo de melanocitos,
- ii) el proceso de transporte intracelular de proteínas cinasas de tirosina y
- iii) empaquetamiento y transporte de melanocitos.

sugiriéndose que el proceso autoinmune no es el evento causal de la enfermedad sino mas bien la consecuencia a una respuesta contra el melanocito con función y estructura alterada.

Estos resultados obligan entonces a diseñar y desarrollar un estudio más sistematizado y con mayor número de pacientes que permita confirmar o desechar esta serie de teorías postuladas, para homogenizar finalmente los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

CAPITULO III

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo General

Seleccionar perfiles de expresión que permitan discriminar un vitiligo vulgar estable (VVE) de uno diseminado activo (VVA), e identificar genes que participan en el desarrollo/origen de la enfermedad.

3.1.2 Objetivos Específicos

1. Estratificar a los pacientes de acuerdo a las características clínicas, bioquímicas, inmunológicos y familiares.
2. Realizar el análisis de expresión (mediante microarreglos) en biopsias de pacientes con VVA, de pacientes con VVE y sujetos sin vitiligo.
3. A partir de los resultados de expresión, seleccionar y validar un grupo de genes cuya expresión diferencial permita diferenciar VVA de VVE, y/o identificar nuevos genes que participen en el desarrollo del vitiligo.
4. Identificar o confirmar cambios en genes que expliquen su participación en la enfermedad.
5. Relacionar e integrar los datos clínicos, inmunológicos, bioquímicos y genéticos para seleccionar aquéllos que permitan diferenciar entre cada uno de los tipos de vitiligo vulgar (firmas genómicas potenciales) y proponer los genes o vías de señalización involucrados en el desarrollo de este tipo de vitiligo.

CAPÍTULO IV

4.1 ESTRATEGIA GENERAL



Figura 7. Estrategia general. Se esquematiza el flujo de trabajo realizado en esta investigación. A partir de las muestras biológicas obtenidas de los pacientes con vitiligo (sangre y piel) se obtuvo DNA genómico, RNA total, plasma y suero, empleados en ensayo de de expresión, identificación de mutaciones y/o polimorfismos, perfil tiroideo y biometría hemática, además de la detección de interleucinas mediante ensayos tipo elisa.

Estudio de tipo:

- Observacional
- Transversal
- De casos y controles
- Experimental

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOS

5.1 Selección de Pacientes

En este estudio se incluyeron 218 pacientes que acudieron al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José E. González”, Monterrey, México, durante el periodo comprendido entre Noviembre del 2009 a Mayo del 2010. Este estudio fue aprobado y registrado con Clave DE08-008 por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México. Después de firmar el consentimiento informado (anexo1), los pacientes fueron entrevistados por médicos generales (anexo 2) y evaluados por residentes en dermatología para confirmar el diagnóstico de vitiligo. La información recabada de los pacientes incluyó: edad, género, lugar de nacimiento, antecedentes médicos patológicos y no patológicos, antecedentes heredofamiliares, edad de inicio del vitiligo, tratamientos previos, fenómeno de Koebner, nivel de estrés relacionado al inicio (como lo percibe el paciente: ninguno, leve, moderado, severo), clasificación y distribución del vitiligo, y genealogía del vitiligo. En éste estudio los subtipos clásicos de vitiligo se subclasificaron en focal (una o más máculas en un área, sin patrón segmentario), segmentario (una o más máculas en la distribución de un dermatoma o zosteriforme), vulgaris (distribución simétrica o asimétrica en dos o más áreas) y universal (despigmentación mayor al 80%). Además, se especificó si se encontraba en estado activo (inicio o aparición de nuevas maculas en los últimos 6 meses) o estable (sin aparición de nuevas lesiones en los últimos 6 meses).

5.1A Criterios de inclusión considerados para casos:

- Pacientes con vitiligo diseminado estable o activo, de nacionalidad mexicana, mayores de 18 años, que al momento del estudio no estén recibiendo algún tratamiento hormonal (especialmente en el caso de pacientes de sexo femenino) y terapia para vitiligo, no emparentados con otros sujetos de estudio.

5.1B Criterios de exclusión:

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes que abandonaron el estudio.

5.1C Criterio de eliminación:

- Cantidad de muestra insuficiente.
- Calidad de muestra deficiente.

5.1D Criterios de Inclusión considerados para controles:

- Personas sanas pertenecientes a población general, mayores de 18 años, pareados por edad y sexo con los controles.

5.2 Material biológico

Se obtuvieron 2 muestras de sangre venosa periférica de 3-5 mL, en tubos con EDTA para biometría hemática completa, y sin anticoagulante para estudios de perfil tiroideo completo, con la finalidad de realizar detección de alteraciones tiroideas. Por otro lado, el DNA genómico se extrajo a partir de estas muestras mediante la técnica de TSNT y Salting Out.

Finalmente se obtuvo una biopsia tanto del tejido sano (sin lesión) como afectado de no más de 1 cm de diámetro de los pacientes con vitiligo diseminado, la cual se almacenó en RNA^{later}® durante 24 horas en refrigeración a 4°C y posteriormente congeladas a -80°C hasta el momento de ser procesadas. Un proceso idéntico se realizó para las biopsias obtenidas de controles. En el caso de los controles y el tejido sin lesión de personas afectadas por vitiligo, la biopsia se obtuvo de una zona no expuesta a la luz solar.

5.3 Origen de los reactivos

Los reactivos empleados para emplear las soluciones amortiguadores necesarios para realizar la extracción de ADN mediante TSNT se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St. Luis Missouri, EUA), Merk (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) y United States Biochemical (Cleveland, Ohio, EUA).

La extracción de RNA fue realizada utilizando MagNa Pure compact RNA Isolation Kit y MagNA Lyser Green Beads de la casa comercial Roche (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind. USA).

Los reactivos empleados para el análisis de la calidad del RNA mediante electroforesis capilar provienen de Bio-Rad Laboratories, Inc (Benicia, CA, EUA).

Los Microarreglos de expresión génica GeneChip® Human Genome U133 Plus 2, los reactivos para realizar la síntesis de primera y segunda hebra, fragmentación y marcaje provienen de la casa comercial Affymetrix (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, EUA).

La síntesis de cDNA para la reacción de qPCR fue realizada empleando el estuche SuperScrip™ III First-Strand Synthesis Supermix de la casa comercial Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

La reacción de qPCR para validar los resultados de expresión por microarreglos fue realizada con LighCycler® 480 Probes Master de la casa comercial Roche (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind. USA) y SYBR® Green I nucleic acid gel stain de la casa comercial SIGMA- ALDRICH (St. Luis Missouri, EUA),

Los reactivos empleados para realizar la PCR de punto final, Taq Polimerasa, MgCl₂ y dNTP's provienen de la casa comercial Promega (Promega corporation, Madison, WI, EUA)

Las enzimas de restricción *NcoI*, *DdeI*, *NlaIV*, y *MfeI* utilizadas en la genotipificación de polimorfismos fueron obtenidos de la casa comercial New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

Para la detección de los niveles séricos de TNF- α se empleó el kit Quantikine® R&D SYSTEMS (Minneapolis, MN, EUA)

El estudio de asociación mediante análisis genético amplio se realizó utilizando la tecnología de microarreglos GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0 de Affymetrix (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, EUA).

5.4 Equipos empleados

Los ADNs y ARNs extraídos fueron cuantificados en el espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop (Wilmington, Delaware, EUA)

La calidad del ADN genómico extraído, el tamaño de los productos de PCR y de digestión enzimática fue analizada en cámaras de electroforesis horizontal MiniSingle Cell electrophoresis chamber FOTODYNE Incorporated (Hartland, WI, USA) y empleando fuente de poder Power/Pack 1000 de Bio-Rad (Hércules, CA, EUA).

El procesamiento de ADNs para reacciones de PCR fue realizado utilizando termociclador modelo PT-100 de MJ Research (Wattertown, MA, EUA), micropipetas de 0.1-2µl, 0.5-10µl, 20-200µl, 200-1000µl y multicanal de 0.5-10µl de la marca Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania), microcentrífuga Eppendorf modelo 5417C (Camibh Göttingen, Alemania).

Para fotodocumentar los geles se utilizó un Transiluminador modelo M-26 UVP (Upland, CA, USA).

Los Microarreglos de expresión génica GeneChip® Human Genome U133 Plus 2 y GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 6.0 fueron analizados utilizando GeneChip® system compuesto por un GeneChip® Scanner 3000, horno de hibridación GeneChip® Hybridization oven 640, estación de fluidos GeneChip® Fluidics Station 450 y software GeneChip® Command Console (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, EUA).

La integridad del ARN fue analizada en Experion™ System 7000 Bio-Rad (Hércules, CA, EUA).

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en LighCycler® 480 Roche (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind. USA)

5.5 Procesamiento de muestras

5.5.1 Determinación de perfil tiroideo completo.

Una muestra de sangre sin anticoagulante de cada paciente participante en el estudio fue enviada inmediatamente colectada al Servicio de Endocrinología

Hospital Universitario “José E. González”, Monterrey, México, para la determinación del perfil tiroideo completo, en el cual se reporta los valores de T3, T4 y TSH.

5.5.2 Biometría hemática completa.

Una muestra de sangre anticoagulada con EDTA de cada paciente participante en el estudio fue enviada inmediatamente colectada al Laboratorio Central del Hospital Universitario “José E. González”, Monterrey, México, para la determinación de la biometría hemática completa.

5.5.3 Extracción de ADN genómico

Muestras de sangre periférica, anticoagulada con EDTA fueron empleadas para obtener ADN genómico mediante la técnica de lisis alcalina.

A partir de 3 a 5 ml de sangre, centrifugado a 4,000 rpm por 5 min., fue recuperado 500µL de la interfase, correspondiente al paquete de leucocitos, en un microtubo de 2 ml. La lisis se realizó agregando 200µL de buffer TSNT (2% Triton X100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) y mezclando durante 30 seg. con vortex. Inmediatamente se agregó 500µl de fenol saturado, mezclando nuevamente con vortex durante 30 seg. Posteriormente se adicionó 100µl de la sevag (cloroformo alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló durante 5 min. con vortex. Transcurrido este tiempo fue agregado 100µl de TE 1X y mezclado nuevamente con vortex durante 30 segundos. El tubo fue centrifugado durante 8 min. a 14,000 rpm. La fase acuosa superior fue transferida a un microtubo de 1,5 ml donde el DNA genómico fue precipitado con 2 volúmenes de etanol al 100 % y mezclado por inversión. Después de centrifugar 8 min. a 14,000 rpm, fue descartado el sobrenadante y lavada la pastilla con 500µl de etanol al 70 % frío. Finalmente fue

centrifugado 8 min. a 14,000 rpm, eliminado el sobrenadante y secada la pastilla de DNA a temperatura ambiente durante 2 a 4 hrs. para posteriormente resuspender en 200µl de TE 1x y almacenar en refrigeración hasta el momento de su utilización.

5.5.4. Extracción de ARN total de biopsias de piel

Se realizó siguiendo las instrucciones descritas por el estuche MagNa Pure compact de la casa comercial Roche.

Brevemente los pasos realizados fueron los siguientes:

1. Se realizó la disrupción y homogenización de 10 a 30 mg de piel en MagNa Lyser, agregando las muestras previamente descongeladas y fragmentadas a cartuchos MagNA Lyser Green Beads con 600µl de buffer de lisis.
2. Se realizaron 2 ciclos de 50 segundos de disrupción a 6,500 rpm.
3. El tubo fue centrifugado a 14,000 rpm durante 2 min. y 350 µl del lisado fue transferido al un tubo nuevo para introducirlo dentro del Rack de muestras del equipo.
4. Se equilibraron las muestras y el cartucho de reactivos de extracción a temperatura ambiente durante 15 a 30 min.
5. Se introdujeron en el equipo los tubos de muestras, tubo de tratamiento con DNasa al cual se agrega 20 µl de DNasa, tubo de recolección (identificado con código de barras) y cartucho de reactivos, estos últimos escaneados por el equipo.
6. Se configuró en modo de extracción de ARN total.
7. Las muestras de ARN son obtenidas luego de aproximadamente 30 min. y almacenadas a -70°C.

5.5.5. Verificación de la Calidad del ARN

Para realizar la verificación de la calidad del ARN se utiliza Experión siguiendo las instrucciones del fabricante. Inicialmente Se mezclan los reactivos para preparar la matriz de gel necesarios para realizar la electroforesis capilar. Los ARNs son descongelados y mantenidos a 4°C en hielo. Se prepara el un baño termo regulado a 70°C. Luego se siguieron los siguientes pasos:

5.5.5.1 Temperatura de equilibrado: Se saca un tubo de cada reactivo de equipo del almacenaje. Se coloca la escalera de ARN (tapa roja) en hielo y los restantes reactivos a temperatura ambiente (~15 min). Brevemente son mezclados por vortex y luego centrifugados para colectar en el fondo del tubo.

Los reactivos de tinción fueron protegidos de la luz en todo momento.

5.5.5.2 Limpieza de los electrodos: Se limpian los electrodos antes de emplear el equipo, colocando en la estación de electroforesis el Chip de limpieza de electrodos con 800 µl de solución de limpieza. Luego se cierra la tapa durante 2 minuto; posteriormente se quita el chip de limpieza.

Se coloca otro chip de limpieza lleno de 800 µl de agua tratada con DEPC en la estación de electroforesis, se cierra la tapa para 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se sustituyó el agua en el chip de limpieza y se repitió el paso.

Se remueve el chip de limpieza y se abre la tapa de la estación de electroforesis durante 60 seg. para permitir que los electrodos se sequen completamente.

5.5.5.3 Preparación del gel y solución de tinción del gel: Son centrifugados 600 µl de gel de RNA (tapa verde) en una columna- filtro a 1500x g

por 10 min. Se pipetea 65 μ l de gel filtrado en un micro tubo libre de RNasas, y se agrega 1 μ l de tinción de RNA (tapa azul).

Opcional: Centrifugar la mezcla de gel y solución de tinción a 13,000 x g por 10 min.

5.5.5.4 Preparación de muestras y escalera de ARN: Se pipetean al menos 2 μ l de escalera de ARN (tapa roja) y 2 μ l de cada muestra de ARN en microtubos libres de RNasas. Se desnaturalizan las muestras y la escalera durante 2 min a 70°C.

Inmediatamente colocar las muestras y la escalera en hielo durante 5 min.

Brevemente bajar las muestra de los tubos y mezclar.

Luego de esto, las muestras fuero almacenar en hielo hasta el momento de realizar la electroforesis.

5.5.5.5 Preparación de los chips: Se removió un chip ARN StdSens de su paquete y fue colocado en la plataforma para chips en la estación de preparación de Experion. Se agregaron 9 μ l de mezcla de gel-solución de tinción en el pozo de carga y se cerró la tapa de la estación de carga, seleccionando la presión en B y el tiempo en 1. Se presionó el botón de inicio y esperó que el proceso estuviera terminado para inspeccionar los microcanales y descartar presencia de burbujas o carga incompleta.

5.5.5.6 Carga de muestras y escalera de RNA en el chip: Se pipetean 9 μ l de gel-solución de tinción en el pozo marcado como GS y 9 μ l de gel filtrado en el pozo marcado G. Posteriormente se pipetean 5 μ l de buffer (tapa amarilla) en cada pozo de carga (1 a 12) y el pozo marcado con la letra L (pozo de la escalera),

cuidando no dejar pozos de muestras vacios. Se pipetea 1 µl de escalera de RNA desnaturalizada en el pozo marcado con la letra L y 1 µl de muestra desnaturalizada en cada uno de los 12 pozos de muestra (colocar 1 µl de buffer TE o agua DEPC en los pozos que no se utilizan).

Se coloca el chip en la estación de mezcla del Experion y mezcla durante 1 min. Procurar niciar la corrida en la estación de electroforesis de Experion dentro de los 5 minutos posteriores a la carga.

5.5.5.7 Corrida y análisis de RNA: Se Inicia la estación de electroforesis de Experion y el programa de análisis, se coloca el chip en la plataforma de la estación de electroforesis. Se selecciona corrida y ensayo Experion RNA Std Sens RNA total Eukariota. Finalmente se iniciar la corrida y se esperar a que ésta este completa. Una vez terminado el proceso se eliminaa el chip. Una vez terminada la corrida 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) (Figura 8)

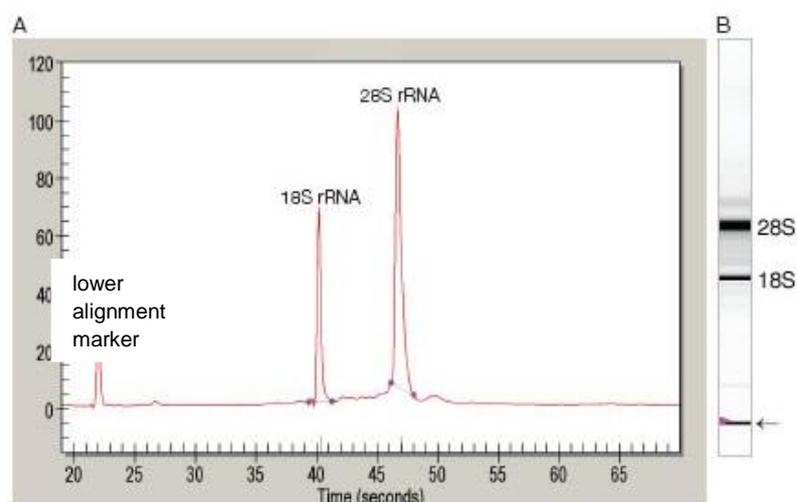


Figura 8. Electroferograma de ARN total de una muestra. (A) En la figura se representa la posición relativa del marcador de alinamiento (lower alignment marker), 18S rRNA, y 28S rRNA . (B) Gel de electroforesis virtual.

5.6. Análisis mediante microarreglos de expresión HG-U133 Plus2.

Marcaje de muestras e hibridación con microarreglos

En este paso se procedió de acuerdo a las instrucciones descritas en el manual técnico de Affymetrix™ para análisis de expresión y procesamiento de muestras de RNA eucariota, utilizando microarreglo HG-U133 Plus 2.0, y siguiendo los siguientes pasos:

Antes de comenzar asegurarse que la calidad del RNA a procesar es adecuada (RQI \geq 6.2 y se debe observar picos bien definidos para 18S y 28S).

La concentración de la muestra debe ser la suficiente para obtener 100ng de RNA necesarios para una óptima hibridación.

Preparar la solución de lavado de aRNA siguiendo las indicaciones del proveedor.

Programar Termociclador con las condiciones requeridas para cada paso:

Cuadro 4: programas para amplificación de RNA en termociclador.

Programa o método			
Síntesis de primera hebra cDNA	42°C por 2 hrs	4°C indefinido	
Síntesis de segunda hebra cDNA	16°C por 1 hrs	65°C por 10 min	4°C indefinido
IVT	40°C por 16 hrs	4°C indefinido	
Fragmentación	94°C por 35 min	4°C indefinido	

5.6.1. Dilución de controles de RNA Poly-A

Agregar 2 μ l de stock de Control Poly-A en 38 μ l de buffer de dilución para controles de Poly-A (dilución 1:20). Mezclar y centrifugar brevemente.

Tomar 2 μ l de la dilución anterior y agregar 98 μ l de buffer de dilución para controles de Poly-A (dilución 1:50). Mezclar y centrifugar brevemente.

Finalmente se prepara la tercera y cuarta dilución como sigue:

Diluciones seriadas de stock de Control de RNA Poly-A

Cantidad inicial de RNA total	Diluciones seriadas				Volumen de cuarta dilución agregada al RNA total
	Primera dilución	Segunda dilución	Tercera dilución	Cuarta dilución	
100ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 μ l

Se recomienda no pipetear volúmenes de solución inferiores a 2 µl para mantener la precisión y consistencia.

El volumen de mezcla control de Poly-A, 100 ng de muestra RNA debe ser 5 µl, ajustando el volumen con agua libre de RNAsas.

5.6.2. Síntesis de la primera hebra de cDNA

Preparación de la Mezcla Maestra de la Primera-Hebra

- a. Se descongeló los reactivos para la síntesis de la primera hebra y se colocaron en hielo.
- b. En hielo se ensambló la mezcla maestra de primera-hebra en un microtubo libre de nucleasas de la siguiente forma:

Mezcla maestra para síntesis de primera hebra para una muestra.

Componentes	Cantidad	Procedimiento
First- Strand Buffer Mix	4 µl	Mezclar suavemente en vortex. Centrifugar brevemente (5 seg)
First- Strand Enzyme Mix	1 µl	
Mezcla RNA total/Control Poly-A	5 µl	
Volumen total	10 µl	

- c. Se mezcló gentilmente con vortex y centrifugó brevemente (colocar en hielo).
- d. Se incubó durante 2 hrs a 42°C en termociclador, empleando programa de síntesis de primera hebra.
- e. Luego de la incubación, se centrifugó brevemente y se colocó en hielo e inmediatamente se prosiguió con la síntesis de la segunda hebra de cDNA.

5.6.3. Síntesis de la segunda hebra de cDNA

Preparación de la Mezcla Maestra de la Segunda-Hebra

- a. En hielo se ensambló la mezcla maestra de segunda-hebra en un microtubo libre de nucleasas de la siguiente forma:

Mezcla maestra para síntesis de segunda hebra para una muestra.

Componentes	Cantidad	Procedimiento
Agua libre de nucleasas	13 μ l	Mezclar suavemente en vortex. Centrifugar brevemente (5 seg)
Second- Strand Buffer Mix	5 μ l	
Second- Strand Enzyme Mix	2 μ l	
Mezcla síntesis primera hebra	10 μ l	
Volumen total	30 μ l	

- b. Se mezcló gentilmente con vortex y centrifugar brevemente. Colocar en hielo.
- c. Incubar durante 1hra a 16°C en termociclador, seguido de 10 min a 65°C empleando programa de síntesis de segunda hebra (cuadro 4). Es importante pre enfriara el termociclador a 16 °C antes de proceder al programa de síntesis de segunda hebra.
- d. Luego de la incubación, centrifugar brevemente, colocar en hielo e inmediatamente proseguir con IVT o congelar a -20°C.

5.6.4. Transcripción *in vitro* y síntesis de aRNA marcado

Preparación de IVT Mezcla Maestra

A temperatura ambiente se preparó el IVT Master Mix en un microtubo libre de nucleasas, de la siguiente forma:

Preparación de Mezcla maestra IVT para una muestra.

Componentes	Cantidad
IVT Biotin Label	4 μ l
IVT Labeling Buffer	20 μ l
IVT Enzyme Mix	6 μ l
Volumen total	30 μ l

Se mezcló suavemente y centrifugó 5 seg. para recolectar en el fondo del microtubo, se mantuvo en hielo.

Se agregaron 30 μ l de Mezcla Maestra IVT a la muestra de doble hebra de cDNA (30 μ l), mezclar y centrifugar 5 seg.

Colocar termociclador en IVT (cuadro 3) e incubar 16 hrs. a 40°C.

Una vez terminado el IVT se colocó en hielo la muestra y se procedió con la purificación de aRNA.

5.6.5. Purificación de aRNA

Luego de la síntesis, el aRNA es purificado para remover enzimas, sales y nucleótidos no incorporados.

Se prepara el agitador de platos (Lab-Line Titer Plate Shaker), platos para muestras con pozos en forma de U y se precalienta la solución de elución de aRNA entre 50-60°C al menos 10 min.

A temperatura ambiente se preparó la mezcla de unión de aRNA en un microtubo libre de nucleasas de la siguiente forma:

Mezcla para purificar una muestra de aRNA.

Componentes	Cantidad
RNA Binding Beads*	10 µl
aRNA Binding Buffer Concentrate	50 µl
Mezcla de segunda hebra	60 µl

*Mezclar previamente RNA Binding Beads para dispersarlas antes de emplear.

- a. Posteriormente se transfiere cada muestra a un plato con pozos en forma de U y se mezcla por pipeteo varias veces.
- b. Se agregó 120 µl de etanol al 100% a cada muestra y mezcló por pipeteo varias veces.
- c. Se colocó el agitador de platos en modo 3 y mezcló durante 2 min, para que el aRNA se uniera a las RNA Binding Beads durante la incubación.
- d. Posteriormente se colocó el plato en la base magnética aproximadamente 5 min. para capturar las perlas magnéticas.
- e. Una vez aclarada la solución y que las perlas estuvieron en el fondo del pozo, se aspiró cuidadosamente el sobrenadante, se descartó y removió el plato.
- f. Se agregó 100 µl de aRNA Wash Solution a cada muestra, y agitó a velocidad moderada en el agitador (modo 5) durante 1 min.
- g. Se colocó nuevamente el plato en la base magnética y repitió el procedimiento como en el paso anterior.
- h. Se aspiró y descartó el sobrenadante sin romper el precipitado de RNA Binding Beads para posteriormente remover el plato de la base magnética.

- i. Se repitieron los pasos de f a h.
- j. Finalmente se movió el plato al agitador, se agitó vigorosamente durante 1 min. para evaporar el etanol residual de las perlas.

5.6.6. Elución de aRNA

- a. Para la elución del aRNA desde las RNA Binding Beads se agregó a cada muestra 50 µl de la solución de elución de aRNA precalentada (50-60°C).
- b. Se agitó vigorosamente el plato por 3 min. en el agitador de platos (modo 7), asegurándose que las RNA binding Beads estuvieran completamente dispersas (de no ser así agitar nuevamente).
- c. Se movió el plato a la base magnética y capturó las RNA Binding Beads en el fondo del plato.
- d. Se transfirió el sobrenadante que contiene el aRNA a un microtubo libre de nucleasas.

En este punto se puede almacenar el aRNA a temperaturas menores a -20°C hasta 1 año, o colocar en hielo y proceder con la cuantificación y fragmentación. En caso de almacenar, procurar no someter las muestras a ciclos de congelación y descongelación para mantener la integridad del aRNA.

5.6.7. Evaluación y fragmentación de aRNA

La distribución de tamaños de los aRNAs fue evaluado empleando Experion, esperando un perfil de distribución de tamaños de aRNA entre 250-5500nt, con una mayor cantidad distribuida entre 600-1200nt (figura 9)

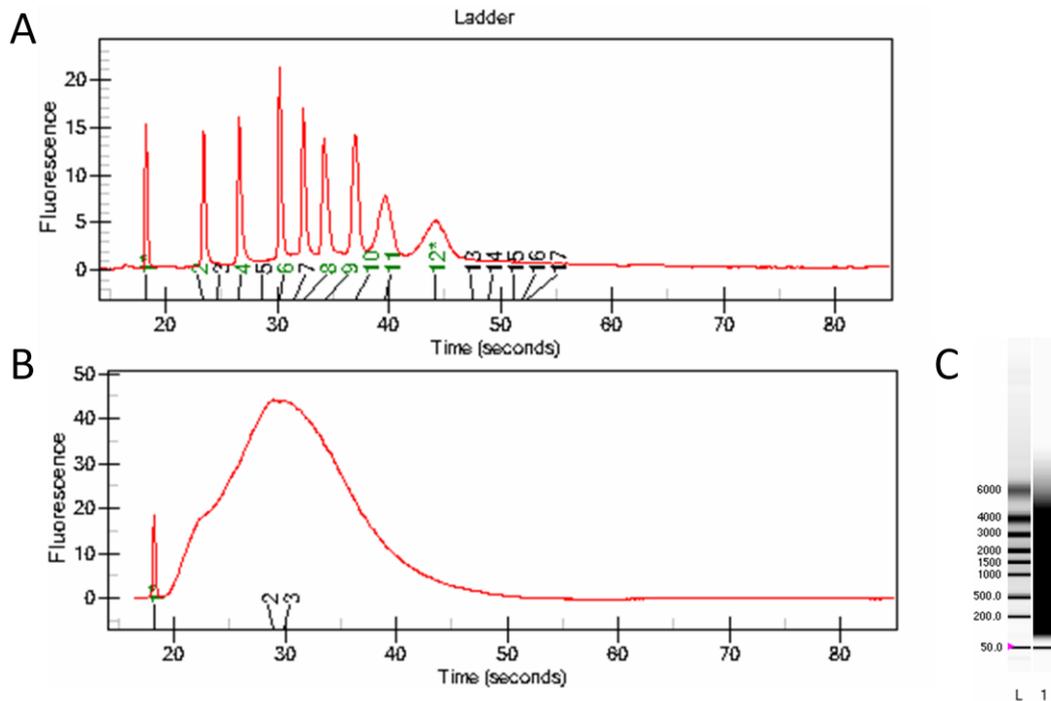


Figura 9. Electroferograma de aRNA. (A) En la figura se representa las posiciones correspondientes al mRNA StdSens en el electroferograma. (B) Electroferograma de un muestra de aRNA. (C) Gel de electroforesis virtual de aRNA puro.

5.6.8. Fragmentación de aRNA marcado

Se preparó la mezcla de fragmentación de la siguiente forma:

Mezcla para fragmentar una muestra de aRNA.

Componentes	Cantidad
aRNA	15 µg (1 a32 µl)
5X Array Fragmentation Buffer	8 µl
Agua libre de nucleasas	Variable, hasta completar volumen de 40 µL
Volumen total	40 µl

- Se incubó la reacción de fragmentación a 94°C durante 35 min.
- Transcurrido este tiempo, se colocó inmediatamente la reacción en hielo.
- Es evaluó una muestra de reacción en Experion, esperando una distribución de fragmentos de aRNA de entre 35-200 nt, con un pico aproximadamente de 100-120 nt. (figura 10)

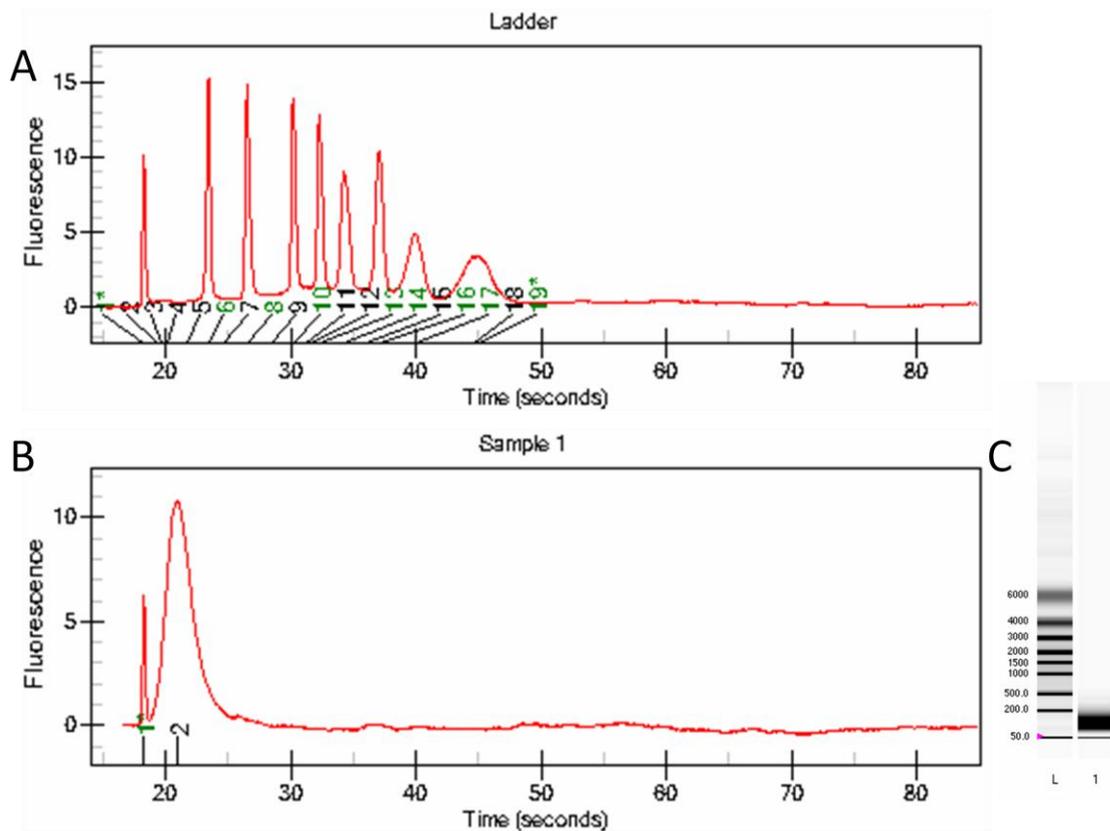


Figura 10. Electroferograma de aRNA. (A) En la figura se representa las posiciones correspondientes al mRNA StdSens en el electroferograma. (B) Electroferograma de una muestra de aRNA fragmentado. (C) Gel de electroforesis virtual de aRNA freagmentado.

5.6.9. Hibridación de las muestras

a.- Se preparó mezcla de hibridación de la siguiente forma:

Mezcla de hibridación para una arreglo.

Componentes	Formato arreglo 49 (St)/64 Format
aRNA fragmentado y marcado	12.5 µg (33.3 µl)
Oligonucleótido control B2 (3nM)	4.2 µl
20X Controles Hibridación (bioB, bioC, bioD, cre)	12.5 µl
2X Hybridization Mix	125 µl
DMSO	25 µl
Agua libre de nucleasas	50 µl
Volumen Total	250 µl

b.- Se equilibró el arreglo a temperatura ambiente antes de usarlo.

c.- Se calentó la mezcla de hibridación a 99°C durante 5 min en un bloque calefactor.

d.- Posteriormente se agregó 200 µl de mezclan de pre-hibridación al arreglo e incubó con rotación durante 10 min a 45°C.

- **Control de calidad:** son analizados los datos crudos, distribución y comportamiento de los controles establecidos por el fabricante, para detectar errores de hibridación.
- **Corrección del ruido de fondo:** elimina errores producidos por hibridación inespecífica y ajuste del escáner.
- **Normalización:** elimina la variación sistemática y ajusta los niveles de expresión entre los microarreglos analizados, haciéndolos comparables entre si.
- **Sumarización:** resume y promedia la información de las sondas de cada transcrito analizado en un solo valor, que es el nivel de expresión.

Los conjuntos de sondas que determinan la expresión de cada gen están formados por 16-20 pares de oligonucleótidos, para determinar los niveles de expresión de cada transcrito, presentes en el microarreglo Human Gene u133 plus Array, que analiza los niveles de expresión de aproximadamente 47,400 transcritos y variantes, incluyendo 38,500 genes humanos caracterizados.

Una vez obtenidos los datos de cada arreglo y teniendo en cuenta las características clínicas de las muestras de tejido de cada paciente (piel proveniente de tejido sano y afectado de pacientes con vitiligo vulgar activo y estable), fueron procesados los resultados de expresión para el grupo de muestras de provenientes de pacientes con vitiligo y calculada una vez realizada la normalización con las referencias internas del arreglo y comparados con los resultados obtenidos del grupo control.

La calidad de las hibridaciones y normalización de los datos se llevaron a cabo utilizando el paquete affyPLM y la función RMA del programa Bioconductor. Los datos de los microarreglos fueron normalizados y corregidos mediante Benjamini y

Hochber. Los genes que presentaron expresión diferencial fueron filtrados de acuerdo con valores de $P \leq 0.05$.

5.7.1. Análisis de vías de genes diferencialmente expresados

Las tablas obtenidas de los genes diferencialmente expresados, con sus valores de expresión, son analizados mediante el empleo de la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) que nos permite realizar la anotación, clasificación y agrupación funcional de cada gen, además de determinar las rutas de señalización y regulación en las que están involucrados.

5.8. Validación por qPCR de genes diferencialmente expresados.

5.8.1. Preparación de cDNA

Se realizó una reacción de retro transcripción a partir de 200 ng de RNA total extraído previamente de las muestras de pacientes con vitiligo, empleando el estuche SuperScrip™ III First-Strand Synthesis Supermix, siguiendo los siguientes pasos:

- a. Se mezcló y centrifugó brevemente cada componente del estuche antes de usar y precalentó el termociclador a 65°C.
- b. Se combinaron los siguientes reactivos en un microtubo de PCR de 0.2 ml, procurando mantenerlo en hielo:

Componente	Cantidad
RNA total	200 ng
50 ng oligo (dT) ₂₀	1 µl
Buffer de alineamiento	1 µl
Agua libre de nucleasas	Hasta 8 µl

- c. Posteriormente se incubó en termociclador a 65°C durante 5 min. Inmediatamente transcurrido este tiempo se colocó en hielo al menos 1 min y luego centrifugó brevemente.
- d. Terminado este proceso, fueron agregados los siguientes reactivos al tubo, manteniendo siempre en hielo:

Componente	Cantidad
2X First-Strand Reaction Mix	10 μ l
SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2 μ l

- e. Se mezcló y centrifugar brevemente. Posteriormente se incubó en termociclador 10 min a 25°C, luego 50 min a 50°C.
- f. Se terminó la reacción a 85°C por 5 min., colocó en hielo y posteriormente almacenó la reacción de síntesis de cDNA a -20°C, o procedió con la cuantificación de mensajeros mediante qPCR.

5.8.2. PCR cuantitativa con SYBR Green

Antes de comenzar:

- Se prepararon en una placa de 96 pozos diluciones 1:10 de cada cDNA
- Previamente fueron preparadas diluciones a 100 μ M de stock de cada primer y, a partir de estos, se hacen alícuotas de parejas de primers (forward y reverse) a 10 μ M de c/u.
- Los genes seleccionados fueron aquellos que presentaron una alteración significativa en sus patrones de expresión en las muestras de pacientes con vitiligo ($P < 0.05$), o que han sido descritos como marcadores de la enfermedad en literatura científica.
- Los primers fueron diseñados a partir de la secuencia detectada en el chip HGU 133 plus 2.0 affymetrix como alterada, utilizado para dicho efecto el número de identificación y la secuencia proporcionada por la base de datos de Affymetrix.

A partir de los cDNAs generados en el paso anterior, se procedió de la siguiente forma:

5.8.2.1 Estandarización de condiciones de qPCR

A partir de un pool de muestras de cDNA se realiza la amplificación utilizando LightCycler® 480 Real-Time PCR System con las diferentes parejas de primers. Una vez definidas condiciones de T° y concentración de primer se procedió combinando los reactivos de la siguiente forma para una muestra de cDNA:

Componente	Cantidad
cDNA	5 µl
LightCycler® Probe master 2X	10 µl
Primer Mix 0.2 mM final	0.4 µl
SYBR Green 1X	2 µl
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µl

El tipo de programa empleado en la reacción de qPCR se describe a modo general en el cuadro 5.

Cuadro 5. Programa de qPCR. Se indican las condiciones empleadas para una PCR tipo.

Setup					
Detection format	Block Type		Reaction Volume		
SYBR Green	384		20µL		
Programs					
Programs Name	Cycles		Analysis Mode		
Pre-incubation	1		None		
Amplification	45 a 70 (depende del gen)		Quantification		
Melting Curve	1		Melting Curves		
Cooling	1		Nonne		
TemperatureTargets					
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (°C/s)	
Pre-incubation					
95	None	0:05:00	4.8	-	
Amplification					
95	None	0:00:10	4.8	-	
primer dependiente	None	00:00:05 a 00:00:20	2.5	-	
72	Single	00:00:05 a 00:00:20	4.8	-	
Melting Curve					
95	None	0:05:00		-	
65 a 70	None	0:01:00		-	
95 a 98	Continous	-	-	5 a 10	
Cooling					
40	None	0:00:10	2.0	-	

5.8.2.2 Curva de eficiencia

A partir de los productos de PCR obtenidos para cada gen, se preparó dilución seriada para generar curva de calibración de la siguiente forma:

- Se prepararon diluciones seriadas 1:10 para generar 7 puntos de la curva.

- Se amplificaron los 7 puntos más un blanco siguiendo las condiciones antes descritas.
- Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calcularon a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real.

5.8.2.3 Determinación de concentración utilizando LightCycler® 480 Real-Time PCR System

Se realiza PCR por triplicado de cada una de las muestras de cDNA provenientes de los pacientes con vitiligo y controles utilizando las cantidades descritas en estandarización, empleando las T⁰ de melting para cada pareja de primer.

El análisis de la curva de fusión se llevó a cabo en las plataformas para la PCR en tiempo real, por lo general al final de la reacción de amplificación. La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta de alrededor de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADNc. Cuando las dobles cadenas de ADN o ADNc se separan por efectos de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR. Este punto aparece como uno o más picos que representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de la fluorescencia se producen, correspondiendo estos a un producto particular en la PCR. Para discriminar los productos específicos de la PCR es necesario saber que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de primer.

5.8.2.4. Cuantificación relativa

Permite obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gene en estudio en comparación con uno o más genes de referencia cuya expresión es constante en las células estudiadas. Por esto, las secuencias utilizadas para cuantificación relativa son generalmente genes "housekeeping".

Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección.

En el modelo para cuantificación relativa de Pfaffl (2001) las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = \frac{(E \text{ gen interés})^{\Delta CP_{\text{gen interés}} (\text{control- muestra})}}{(E \text{ referencia})^{\Delta CP_{\text{gen referencia}} (\text{control- muestra})}}$$

En esta ecuación el ratio del gen en estudio se expresa en una muestra frente a un control en comparación con un gen de referencia. *E gen interés* representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del amplicon en estudio; *E referencia* representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gene de referencia; $\Delta CP_{\text{gen interés}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gene en estudio; y $\Delta CP_{\text{referencia}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen de referencia.

En este modelo también es necesario conocer la eficiencia de PCR de cada gen estudiado. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1.$$

Es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo.

5.9. Identificación de mutaciones y polimorfismos

5.9.1.a. Genotipificación del polimorfismo TNF- α -308

La genotipificación del polimorfismo señalado para el promotor de TNF- α (TNFa -308G/A), fue realizada utilizando PCR-RFLP con una modificación al método

reportado por Chen y cols⁷⁵. La reacción de PCR fue realizado en un volumen de 25 µL conteniendo 250 ng de DNA genómico, 0.5 µM de cada uno de los oligonucléotidos Iniciadores (TNF-308F 5`gggACACACAAGCATCAAagg3` y TNF-308R 5`AATAggTTTTgAgggCCATg 3`), 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Promega). Las condiciones utilizadas para la amplificación incluyen 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Los productos obtenidos luego de la PCR fueron digeridos durante toda la noche a 37°C con la endonucleasa de restricción NcoI (New England Biolabs). Todos los productos obtenidos a partir de las digestiones fueron resueltos mediante electroforesis en geles de Agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio, y analizados en un sistema de documentación de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

5.9.1.b Detección de nivel de TNF-α en suero

Con la finalidad de confirmar que la presencia del polimorfismo TNF-α en las muestras altera los niveles de su producto proteico, el nivel sérico fue determinado con Serum Human TNF-Immunoassay Quantikine® (R&D SYSTEMS), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.9.2. Genotipificación del polimorfismo FOXD3 -639

La genotipificación del polimorfismo señalado para el promotor FOXD3 (FOXD3 -639G/T) fue realizada utilizando PCR-RFLP. La reacción de PCR fue realizado en un volumen de 25 µL conteniendo 250 ng de DNA genómico, 0.5 µM de cada uno de los oligonucléotidos Iniciadores (FOXD3-639F 5'-AACACgATATgggAACCTC-3' y FOXD3-639R 5'-AggACTggCCTgATAgATTAC-3'.) 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Promega). Las condiciones utilizadas para la amplificación incluyen 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Los productos obtenidos luego de la PCR fueron digeridos durante toda la noche a 37°C con la endonucleasa de restricción *Ddel* (New England Biolabs). Todos los productos obtenidos a partir de las digestiones fueron resueltos mediante electroforesis en geles de Agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, y analizados en un sistema de documentación de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

5.9.3. Genotipificación del polimorfismo AIRE 961

La genotipificación del polimorfismo señalado para la región codificante del gen AIRE (AIRE 961C/G) fue realizada utilizando PCR-RFLP. La reacción de PCR fue realizado en un volumen de 25 µL conteniendo 250 ng de DNA genómico, 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos Iniciadores (Aire S278R-F 5'-gCTgCCCCATTgCT-3' y Aire S278R-R 5'-ggCCTCTCCTgTggTCT-3'.) 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Promega). Las condiciones utilizadas para la amplificación incluyen 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Los productos obtenidos luego de la PCR fueron digeridos durante toda la noche a 37°C con la endonucleasa de restricción *NlaIV* (New England Biolabs). Todos los productos obtenidos a partir de las digestiones fueron resueltos mediante electroforesis en geles de Agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio, y analizados en un sistema de documentación de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

5.9.4. Genotipificación del polimorfismo IL-8 -251

La genotipificación del polimorfismo señalado para el promotor de IL-8 (IL-8 -251T/A) fue realizada utilizando PCR-RFLP. La reacción de PCR fue realizado en un volumen de 25 µL conteniendo 250 ng de DNA genómico, 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos Iniciadores (IL8-F 5'-GATTCTGCTCTTATGCCTCCA-3' e IL8-R 5'-CCCAAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC-3'). 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Promega). Las condiciones utilizadas para la amplificación incluyen 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 5 minutos. Los productos obtenidos luego de la PCR fueron digeridos durante toda la noche a 37°C con la endonucleasa de restricción *MfeI* (New England Biolabs). Todos los productos obtenidos a partir de las digestiones fueron resueltos mediante electroforesis en geles de Agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, y analizados en un sistema de documentación de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

5.10 Análisis de variación del número de copias por microarreglos de genotipificación Genome-Wide Human SNP Array 6.0

El arreglo de genotipificación Genome-Wide Human SNP Array 6.0 contiene 906,600 SNPs y más de 946,000 sondas no polimórficas para medir diferencias genéticas como la variación del número de copias. Aproximadamente 428.000 SNPs

están incluidos en la generación de chips anteriores, como el 500K y el 5.0. Los 424.000 SNPs restantes incluyen tagSNP derivados del proyecto HapMap, mejor representación de los cromosomas X e Y, SNPs mitocondriales y SNPs en puntos calientes de recombinación. De las 946,000 sondas no polimórficas 202,000 identifican 5,677 regiones con CNV de la base de datos de Variaciones Genómicas de Toronto. Además incluye 744,000 sondas espaciadas por todo el genoma para permitir la detección de CNV no descritas hasta el momento.

Antes de comenzar, nos aseguramos que el DNA genómico este como doble hebra, libre de inhibidores de PCR o de otros DNAs contaminantes, y que no se encuentre degradado.

5.10.1 Preparación del DNA genómico

Determinar la concentración del DNA genómico, cuantificando en NanoDrop. Diluir cada muestra a una concentración de 50 ng/μl empleando buffer TE reducido en EDTA.

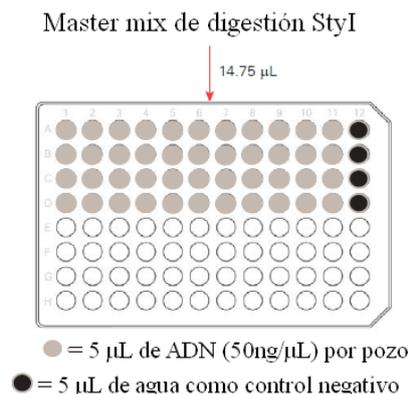
5.10.2 Digestión con *StyI*

1. Se preparó una placa de ADN genómico y el master mix de digestión 0 con *StyI*, vortexear y centrifugar (spin).

Reactivo	Cant. 1 muestra	Cant. 48 muestras (15% extra)
Agua ° Biol. Mol.	11.55 μl	637.6 μl
NE buffer 3 (10X)	2.0 μl	110.4 μl
BSA (100X; 10 mg/ml)	0.2 μl	11 μl
Sty 1 (10 U/ μl)	1.0 μl	55.2 μl
Volumen total	14.75 μl	814.2 μl

2. Se agregó 14.75 μl de master mix de digestión y 5 μl de la muestra de ADN (50ng/μl) a cada pozo de la placa de la siguiente forma:

A) Selle la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.



- B)** Coloque la placa en el termociclador (Veriti) y correr el programa de digestión.

Programa de digestión GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	Infinito

5.10.3 Ligación de productos digeridos con *StyI*

1. Se preparó master mix de ligación, vortexeó y centrifugó (spin).

Reactivo	Cant. 1 muestra
Buffer ligasa de ADN T4 (10X)	2.5 µl
Adaptador <i>StyI</i> (50µM)	0.75 µl
Ligasa de ADN T4(400 U/µL)	2.0 µl
Volumen total	5.11 µl

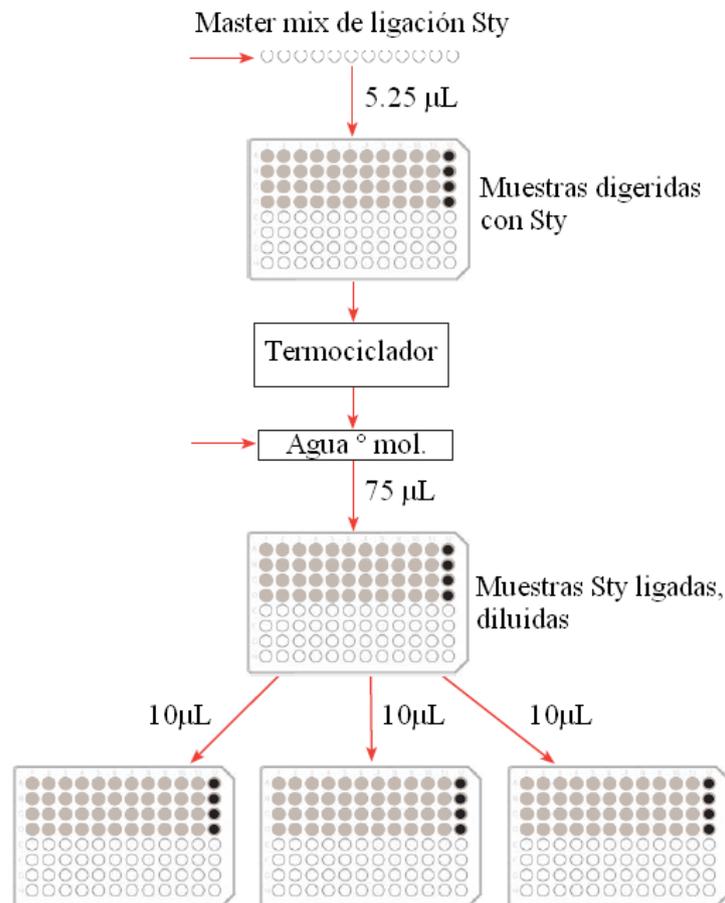
2. Luego se agregó 5.25 µl de master mix de ligación a cada pozo de la placa con muestras digeridas de la siguiente forma:

- A)** Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.
B) Colocar la placa en el termociclador (Veriti) y correr el programa de ligación.

Programa de ligación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Infinito

3. Las muestras ligadas fueron diluidas agregando 75 µl de agua grado molecular., en cada pozo con muestra (sellar la placa, vortexear y centrifugar, Para cada muestra de ligados *StyI* se realizarán 3 reacciones de PCR).

4. Se transfirió 10 μL de las muestras ligadas diluidas a tres placas de PCR (en caso de ser menos de 12 muestras, se puede hacer en una sola placa), siendo cuidadoso de no contaminar los pozos de otras muestras. Los pasos se resumen en el siguiente esquema:



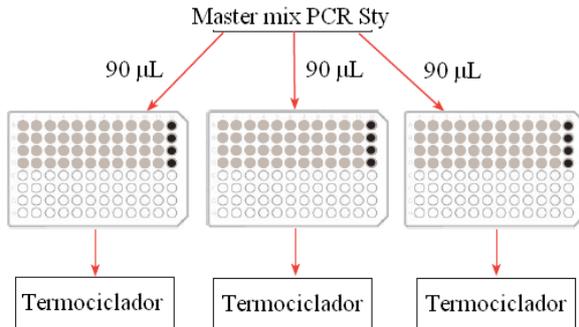
5.10.4 PCR de productos ligados *Sty*

1. Se preparó master mix de PCR en un tubo de 15ml ó 50ml (depende de la cantidad de muestras) sobre hielo.

Master mix de PCR para muestras ligadas <i>Sty</i> (para 3 placas). *Cuando sean menos de 12 muestras se puede utilizar la misma placa en lugar de 3 placas.	
Reactivo	Cant. 1 muestra
Agua ° mol.	39.5 μL
Buffer PCR Taq TITANIUM (10X)	10 μL
GC-Melt (5M)	20 μL
dNTP (2.5 mM c/u)	14 μL
Primer PCR 002 (100 μM)	4.5 μL
Taq ADN pol TITANIUM 50X	2.0 μL
Volumen total	90 μL

2. Luego se agregó 90 μl el master mix de PCR Sty a cada una de las muestras ligadas diluidas de la siguiente forma:

- Fue sellada la placa con etiquetas adhesivas, vortexeada y centrifugada.
- Se colocó la placa en el termociclador AB-9700 y se corrió el programa de PCR (laboratorio principal).



Programa PCR GW5/6 (termociclador AB-9700)		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	-
94°C	30 seg	30X
60°C	45 seg	
68°C	15 seg	-
68°C	7 min	
4°C	infinito	

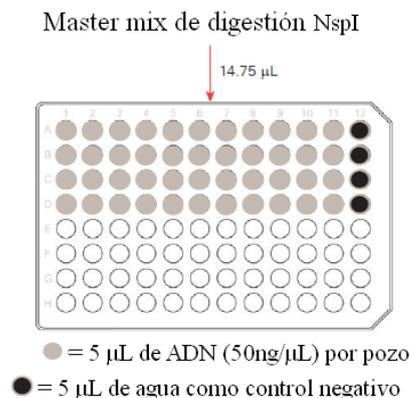
5.10.5 Digestión con *NspI*

1. Se preparó placa de ADN genómico

Reactivo	Cant. 1 muestra
Agua ° Biol. Mol.	11.55 μl
NE buffer 3 (10X)	2.0 μl
BSA (100X; 10 mg/ml)	0.2 μl
<i>NspI</i> (10 U/ μl)	1.0 μl
Volumen total	14.75 μl

- Posteriormente se preparó master mix de digestión con *NspI*, vortexear y centrifugó (spin).
- Se agregó 14.75 μl de master mix de digestión y 5 μl de la muestra de ADN (50ng/ μL) de la siguiente forma:

A) Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.



B) Colocar la placa en el termociclador y correr el programa de digestión.

Programa de digestión GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	Infinito

5.10.6 Ligación de productos digeridos con *Nspl*

1. Se preparó master mix de ligación, vortexeó y centrifugó (spin)

Reactivo	Cant. 1 muestra
Buffer ligasa de ADN T4 (10X)	2.5 µl
Adaptador <i>Nspl</i> (50µM)	0.75 µl
Ligasa de ADN T4(400 U/µl)	2.0 µl
Volumen total	5.25 µl

2. Se agregó 5.25 µl de master mix de ligación a cada pozo de la placa con muestras digeridas de la siguiente forma:

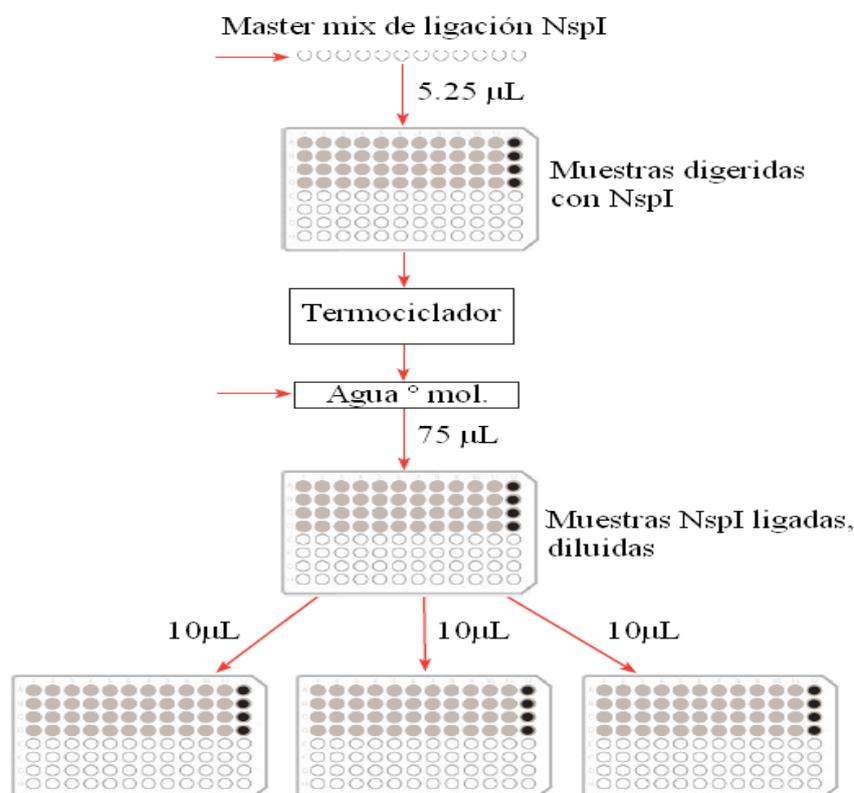
A. Sellar la placa con etiquetas adhesivas, vortexear y centrifugar.

B. Colocar la placa en el termociclador y correr el programa de ligación.

Programa de ligación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	Infinito

3. Se diluyeron las muestras ligadas agregando 75 µl de agua ° mol., en cada pozo con muestra. Se selló la placa, vortexeó y centrifugó. Para cada muestra de ligados *Nspl* se realizarán 4 reacciones de PCR.

4. Se transfirieron 10 µl de las muestras ligadas diluidas a tres placas (en caso de ser menos de 12 muestras, se puede hacer en una sola placa) de PCR. Los pasos se resumen en el siguiente esquema:



5.10.7 PCR de productos ligados *Nsp*

1. Se preparó master mix de PCR en un tubo de 15ml ó 50ml (dependiendo de la cantidad de muestras) sobre hielo

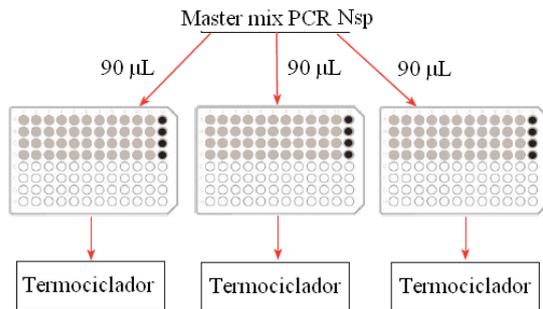
Master mix de PCR para muestras ligadas *Nsp* (para 4 placas). *Cuando sean menos de 12 muestras se puede utilizar la misma placa en lugar de 4 placas.

Reactivo	Cant. 1 muestra
Agua ° mol.	39.5 µl
Buffer PCR Taq TITANIUM (10X)	10 µl
GC-Melt (5M)	20 µl
dNTP (2.5 mM c/u)	14 µl
Primer PCR 002 (100 µM)	4.5 µl
Taq ADN pol TITANIUM 50X	2.0 µl
Volumen total	90 µl

2. En el área de preparación de PCR, se agregaron 90 µl el master mix de PCR *Nsp* a cada una de las muestras ligadas diluidas [de la(s) placa(s)], realizando los siguiente pasos:

A. Se selló la placa con etiquetas adhesivas, vortexeó y centrifugó.

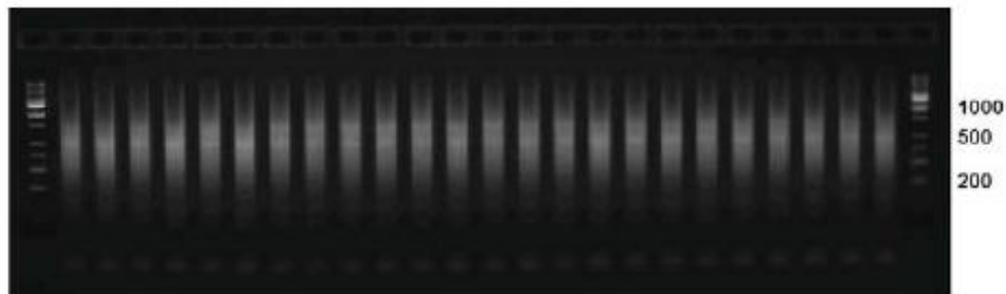
B. Se colocó la placa en el termociclador y siguiendo el siguiente programa de PCR (laboratorio principal).



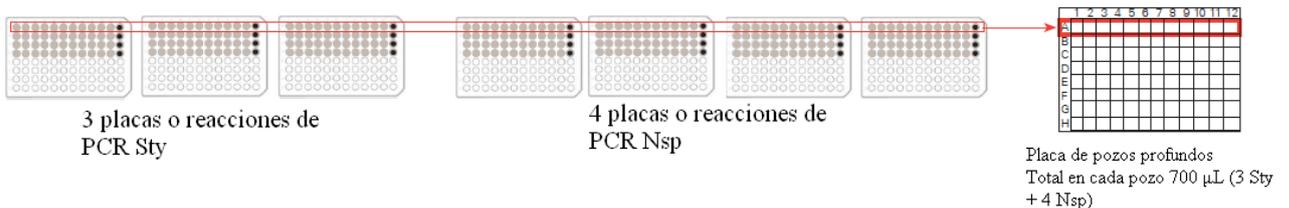
Programa PCR GW5/6 (termociclador AB-9700)		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 min	-
94°C	30 seg	30X
60°C	45 seg	
68°C	15 seg	
68°C	7 min	-
4°C	infinito	

5.10.8 Calidad y purificación de productos de PCR (*Sty-Nsp*)

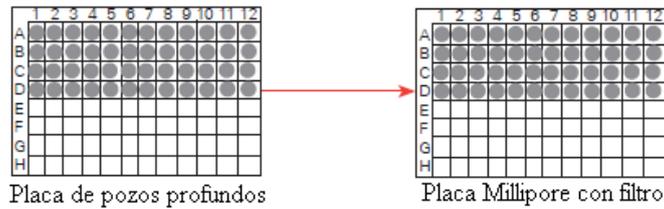
1. Se mezclaron 3 µl de cada producto de PCR con 1.5-3 µl de jugo azul y analizaron en un gel de agarosa al 2-2.5% (la distribución de los productos de PCR debe ser entre 200-1100 pb; por lo tanto se debe correr a ~100V por 40 min. Utilizar un marcador de peso molecular de 100 pb.)



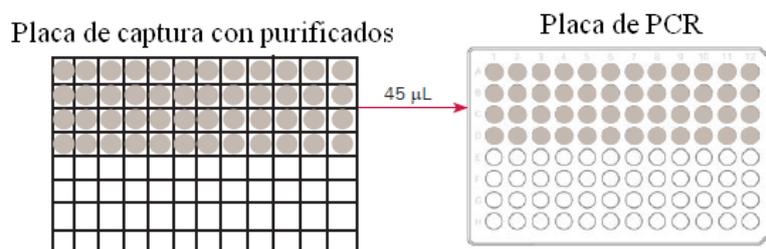
2. Se agruparon todos los productos de PCR en cada uno de los pozos correspondientes a cada muestra, cuidando no contaminar las muestras.



3. Se agregó 1.0 ml de perlas magnéticas (agitadas vigorosamente) a cada pozo profundo con muestra. Mezclar 5X con pipeteo al poner cada ml e incubó a temperatura ambiente por 10 min.
4. Se transfirió cada muestra incubada a una placa con filtro, sellando los pozos vacíos. Se colocó la placa sobre cámara de vacío.



5. Luego se aplicó vacío (de 20-24 pg de Hg) hasta que el líquido pasó completamente por el filtro (40-50 min), hasta que los pozos estuvieron completamente secos. Tiempo máximo 60 min.
6. Posteriormente fueron agregados 900 μL de etanol ($^{\circ}$ mol.) al 75% a cada muestra; se aplicó vacío \sim 2 min (o hasta que se filtró todo el líquido). Se repitió éste paso mientras sigue el vacío.
7. Se aplicó vacío hasta que los pozos estuvieron completamente vacíos y secos (\sim 10-15 min). Máximo 20 min.
8. Se eliminó el etanol restante limpiando la parte inferior de la placa con toallas limpias (aplicar vacío sólo 10 min).
9. Transcurrido este tiempo se unió una placa de captura con cinta adhesiva (solo a los lados) a la placa con filtro; se agregó 55-60 μl de buffer de elusión (a temperatura ambiente).
10. Se reselló la placa cubriendo todos los pozos y agitó en Jitterbug por 10 min en intensidad 5.
11. Se colocó la placa dentro de la cámara de vacío, cuidando sellar los pozos vacíos.
12. Se aplicó vacío hasta que todo el líquido pasó y estuvieron los pozos secos (\sim 5-15 min, máximo 30 min).
13. Se selló la placa completamente y centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 1400 RCF.
14. Finalmente se separó la placa de captura con el eluido y cuantificó los productos purificados (usando 1.5 μl de muestra deberá haber idealmente \sim 4.5-6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN por muestra).
15. Se transfirieron los productos a una nueva placa de PCR.



5.10.9 Fragmentación de productos purificados

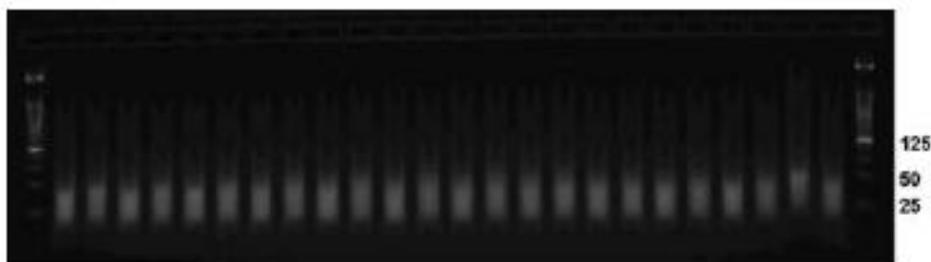
1. Se agregaron 5 μ L de buffer de fragmentación 10X a cada muestra.
2. Se preparó el master mix de fragmentación sobre hielo, vortexeó, centrifugó y mantuvo en hielo.

Master Mix de fragmentación	
Fragmentation Master Mix	1 Muestra
H2O Accugene	6.45 μ l
10X Fragmentation Buffer	0.75 μ l
Fragmentation Reagent (2.5 U/ μ l)	0.3 μ l

3. Se agregaron 5 μ l del master mix de fragmentación a cada muestra, selló la placa y vortexeó (Centrifugar a 4°C - 2000 rpm por 30 seg).
4. Se precalentar la tapa y bloque del termociclador a 37 °C; colocó la placa sellada en el termociclador y se corre el programa de fragmentación.

Programa de fragmentación GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Infinito

5. Se tomó 1.5 μ l de cada producto fragmentado y analizó en un gel de agarosa al 4% (la distribución de los productos fragmentados deberá ser en promedio <180 pb; por lo tanto se deberá correr a ~100V por 45 min).



5.10.10 Marcaje de productos fragmentados

1. Se preparó el master mix de marcaje, vortexeó y centrifugó.

Reactivo	Cant. 1 muestra
Buffer TdT (5X)	14 μ l
Reactivo marcaje ADN (30mM)	2.0 μ l
Enzima TdT (30 U/ μ L)	3.5 μ l
Volumen total	19.5 μl

2. Se agregó 19.5 μ l de master mix de marcaje a cada muestra (recordar sellar la placa, vortexear y centrifugar).
3. Se precalentar el bloque del termocicladora antes de colocar la placa sellada en el termociclador y correr el programa de marcaje.

Programa de marcaje GW5/6	
Temperatura	Tiempo
37°C	4 hr
95°C	15 min
4°C	Infinito

5.8.1.11 Hibridación

1. Precalentar el horno de hibridación durante 1 hr a 50°C y 60 rpm.
2. Sacar los chips para que se calienten a temperatura ambiente (20-35° C).
3. Se preparó el master mix de hibridación en hielo, vortexeó, centrifugó y mantuvo en hielo.

Master mix de hibridación	
Reactivo	Cant. 1 muestra
MES (12X; 1.25M)	12 μ l
Solución de Denhardt (50X)	13 μ l
EDTA (0.5M)	3 μ l
ADN Herring sperm (10mg/ml)	3 μ l
OCR, 0100	2 μ l
ADN Cot-1 Humano (1mg/ml)	3 μ l
Tween 20 (3%)	1 μ l
DMSO (100%)	13 μ l
TMACL (5M)	140 μ l
Volumen total	190 μl

4. Se agregó 190 µl de master mix de hibridación a cada muestra marcada. Fue sellada la placa firmemente, vortexeada y centrifugada.
5. Se colocó la placa en el termociclador y corrió el programa de hibridación.

Programa de hibridación

Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
49°C	infinito

6. Sin sacar la placa del termociclador, fue colocado 200 µL de cada una de las muestras en su chip correspondiente (previamente rotulado), y sellado los orificios de la parte posterior (por donde se introdujo la muestra) con etiquetas redondas.
7. El chip finalmente es colocado en el horno de hibridación a 50°C y 60 rpm durante 16-18 hrs.
- 8.

5.10.12 Lavado y tinción de chips

1. El buffer de tinción fue preparado de la siguiente forma:

Reactivo	Cant. 48 muestras (15% extra)
Agua AccuGene	44.162 ml
SSPE (20X)	19.872 ml
Tween 20 (3%)	218 µl
Solución Denhardt	1324 µl
Volumen total	65.6 mL

2. La solución de tinción SAPE (para un día) se preparó de la siguiente forma (Solución 1).

Reactivo	Cant. 1 muestra
Buffer de tinción	594 µl
Anticuerpo-Biotina	6.0 µl
Volumen total	600 µl
Volumen por tubo	600 µl

3. Se preparó solución de anticuerpo siguiendo las instrucciones del fabricante (Solución 2).
4. Se preparó buffer Array Holding (Solución 3).

5. Se alicuotaron 600 μ L de solución de tinción SAPE en un tubo de 1.5 ml, se colocó en la posición 1 la estación de fluidos. Se alicuotó 600 μ l de solución de anticuerpo a un tubo de 1.5 ml y colocó en la posición 2. Finalmente se alicuotaron 800-1000 μ l de buffer Array Holding en un tubo de 1.5 ml y colocó en la posición 3.
6. Los chips fueron sacados del horno, se extrajo los 200 μ l de muestra del chip y fueron regresados a su respectivo pozo (placa). Se colocó 270 μ l de Array Holding al chip.
7. Los chips fueron colocados en la estación de fluidos cuidando no tapar los orificios de llenado.
8. Una vez terminada la tinción y lavado de chips, se taparon los orificio de llenado y colocados en el escáner (previamente encendido). Se realizó la lectura.

CAPITULO VI

6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS OBJETIVO 1

6.1.1 Análisis demográficos

A través de campañas abiertas al público fueron invitados a participar 218 pacientes provenientes de diferentes estados del País, a quienes se les ofreció diagnóstico clínico de le enfermedad, biometría hemática y perfil tiroideo completo. Una vez obtenido los resultados de estas pruebas de laboratorio y en caso de ser necesario, los pacientes ya diagnosticados fueron derivados a otros servicios aparte de Dermatología para que pudieran recibir atención. Dado que este estudio sólo contemplaba el Noreste de México, región comprendida por Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Tamaulipas (Figura 11) fueron incluidos 198 pacientes, 104 mujeres y 94 hombres. En este grupo no se incluyeron aquellos pacientes familiares de otros ya incluidos en el estudio, con la finalidad de no sobreestimar los datos estadístico obtenido.



Figura 11. Noreste de México. Región geográfica de México, compuesta por los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

En el caso de los pacientes incluidos su edad media fue de 41.5 ± 16.4 años, con una mediana de 44 años. La media de la edad de inicio fue de 26.4 ± 15.98 años, con un rango de 74 años. (Figura 12). La media de los años de evolución fue de 15.1 ± 14.5 años, con una mediana de 10. Las frecuencias obtenidas para los subtipos focal, segmentario, vulgaris y universal, fueron de 18 (9.1%), 1 (0.5%), 176 (88.8%) y 3 (1.5%), respectivamente. En la figura 13 se representan resultados desglosados por tipo de vitiligo e identificados por la actividad de la enfermedad. Como se puede observar en ella, se detectaron 96 (48.5%) casos con estados activos, y 102 (51.5%) casos estables. Se obtuvieron 98 (49.9%) casos con historia familiar vitiligo (figura 14), de los cuales, 62 (31.3%) tenían un familiar en 1er o 2do grado de parentesco, y 36 (18.2%) tenían por lo menos un familiar en 3er o 4to grado (cuadro 6).

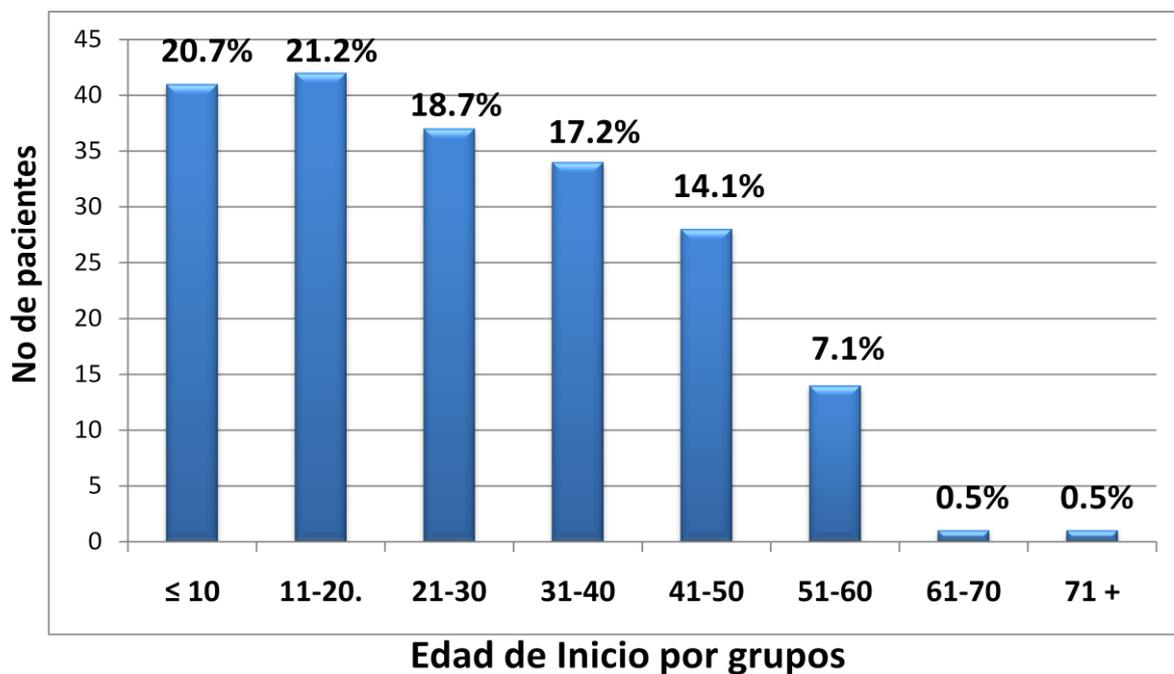


Figura 12. Edad de inicio del vitiligo por grupos. En la figura se puede observar que el 60.6% de los pacientes presentan la enfermedad antes de los 30 años.

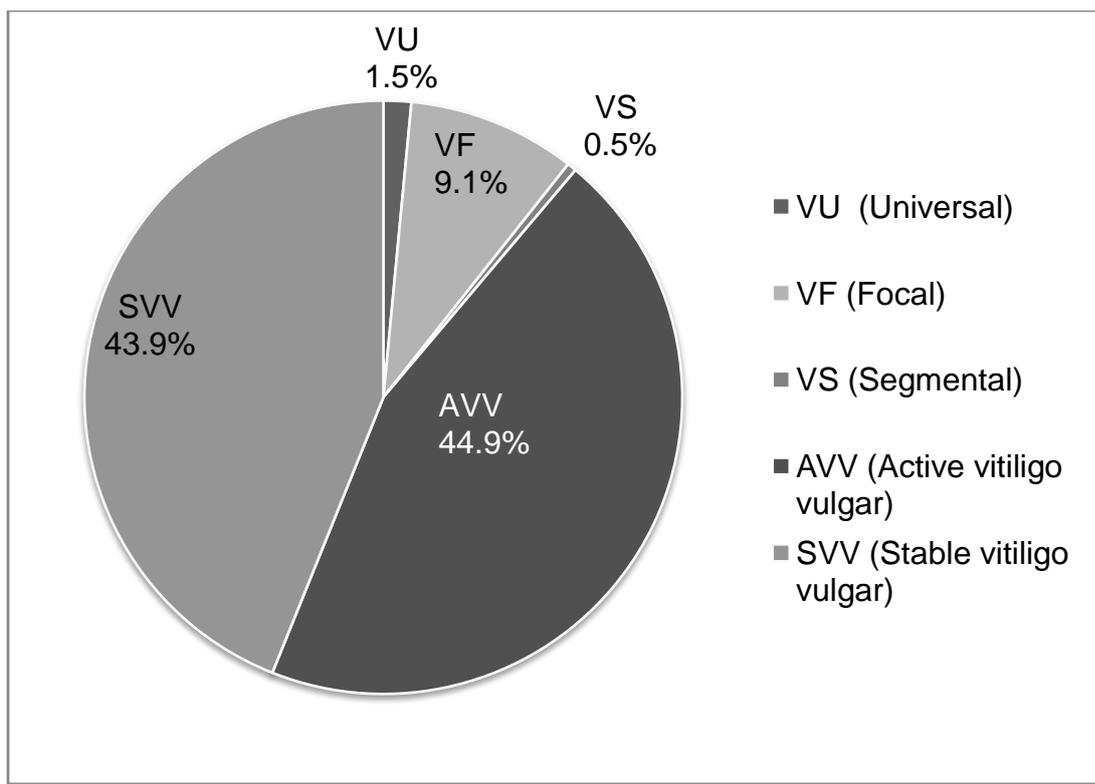


Figura 13. Tipos clínicos de vitiligo en pacientes del Noréste de México. En la figura V indica Vitiligo, VV vitiligo vulgar.

Cuadro 6. Historia familiar de vitiligo. En el cuadro se indican las frecuencias y porcentajes de pacientes con antecedentes familiares agrupados en primer y segundo grado, y los obtenidos para tercer y cuarto grado.

Antecedentes familiares	Frecuencia	Porcentaje
Sin	100	50.5
1er y 2o grado	62	31.3
3er y 4o grado	36	18.2
Total	198	100.0

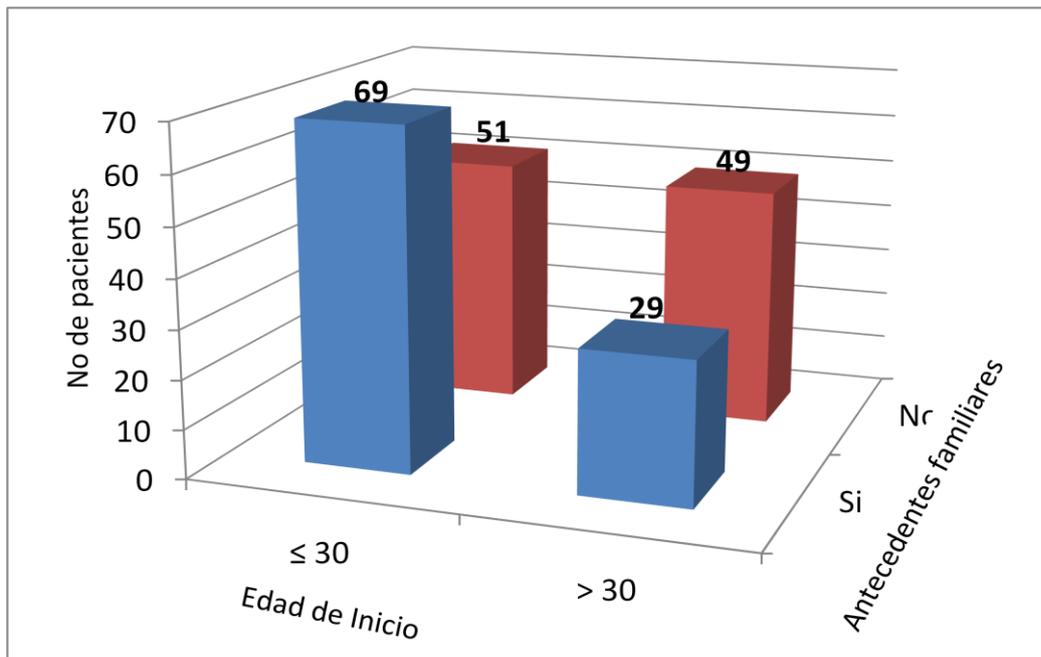


Figura 14. Edad de inicio vs historia familiar de la enfermedad. En la figura se observa que la mayoría de los pacientes que presentaron la enfermedad antes de los 30 años reportaron tener familiares afectados por vitiligo.

6.1.2. Resultados de análisis clínicos

La aparición de lesiones en sitios que han sufrido algún tipo de traumatismo, conocido como fenómeno de Koebner, se observó en 54 (27.3%) de los pacientes. Las frecuencias, conforme a si los pacientes relacionaban un evento o periodo estresante con el inicio del vitiligo, evaluados como ninguno, leve, moderado y severo, fueron: 67 (33.8%), 9 (4.6%), 57 (28.8%), y 65 (32.8%) respectivamente, correspondiendo a un total de 145 pacientes (73.2%) quienes registraron algún tipo de vivencia familiar o ambiental estresante asociado al inicio de la dermatosis.

Las enfermedades más frecuentemente asociadas fueron las alteraciones tiroideas en 48 pacientes (22.2%), le siguieron en frecuencia la hipertensión arterial, atopia, diabetes mellitus, y alopecia areata, entre otras (Figura 15). Con respecto a las enfermedades tiroideas, la más frecuente fue hipotiroidismo con un 10.6%, presentándose el resto de los respectivos problemas tiroideos con una menor frecuencia. (Cuadro 7).

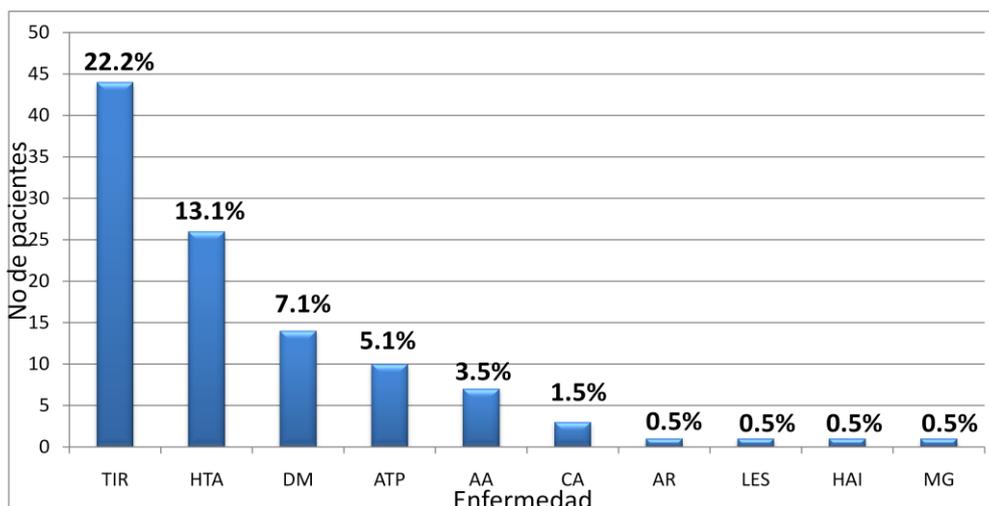


Figura 15. Enfermedades asociadas a vitiligo. En la figura TIR indica enfermedades tiroideas, HTA hipertensión arterial, DM diabetes mellitus, ATP atopía, AA alopecia areata, CA cáncer, AR artritis reumatoide, LES lupus eritematoso sistémico, HAI hepatitis autoinmune y MG miastenia gravis. Se puede observar que las enfermedades mas comunmente asociadas al vitiligo son las patologías tiroideas.

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.= 2.29; IC 95%= 1.22 – 4.28; P= 0.0052), así como una mayor asociación de patología tiroidea en pacientes que inician con vitiligo después de los 30 años de edad (OR= 2.51; IC 95%= 1.20 – 5.25; P= 0.007).

Cuadro 7. Historia personal de patologías tiroideas. En el cuadro se indican las frecuencias y porcentajes de pacientes con diferentes patologías tiroideas.

Tipo de patología tiroidea	Frecuencia	Porcentaje
Sin	154	77.8
Hipotiroidismo	22	11.1
Hipotiroidismo Subclínico	12	6.1
Hipertiroidismo	5	2.5
Hipertiroidismo Subclínico	1	0.5
Otros	4	2.0
Total	198	100.0

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

6.2. RESULTADOS OBJETIVO 2

6.2.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA REALIZACIÓN DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA

De las 218 pacientes que participaron en este estudio, sólo se obtuvieron biopsias de piel de 83 pacientes con vitiligo vulgar, provenientes de tejido afectado por vitiligo y de una región pigmentada, además muestras de piel de 13 donadores controles. Cuadro 8 y 9.

Cuadro 8. Biopsias obtenidas de pacientes con vitiligo vulgar.

Tipo de vitiligo	No pacientes	Femenino	Masculino
VVE	46	24	22
VVA	37	19	18
total	83	43	40

Cuadro 9. Biopsias obtenidas de donadores controles.

Género	No de Biopsias
Femenino	8
Masculino	5
Total	13

Del total de muestras de piel recolectadas sólo fueron seleccionadas para ser procesadas y analizadas por microarreglos de expresión biopsias de 10 pacientes con vitiligo vulgar y de 8 controles, debido al limitado número de arreglos disponibles y al costo total del ensayo.

Los criterios de selección de las biopsias de pacientes fueron las siguientes:

- Obtenidas de pacientes no emparentados.
- Provenir de pacientes sin antecedentes de enfermedades autoinmunes o perfil tiroideo alterado.

En cuanto a las características de sus RNAs:

- Que tuvieran una concentración suficiente para realizar el ensayo (≥ 100 ng/ μ l).
- Que tuvieran una pureza cercana al 2.0 basándose en el resultado de la relación 260/280 obtenidas de la espectrofotometría.
- Valor de integridad del RNA de (RQI) ≥ 6.2 , teniendo en consideración la ausencia de bandas intermedias entre las correspondientes al 28s y 16s ribosomal y de DNA genómico.

Las muestras que cumplieron con estos criterios fueron agrupadas de manera que permitiera realizar comparación entre edad (niños y adultos), sexo (femenino y masculino), tipo de vitiligo vulgar (activo y estable) y tipo de tejido (afectado por vitiligo y tejido pigmentado). En el cuadro 10 se muestran los datos de las muestras correspondientes a los pacientes seleccionados y los controles. En la figura 16 se muestra la imagen de electroforesis capilar del RNA total obtenido para algunas de las muestras.

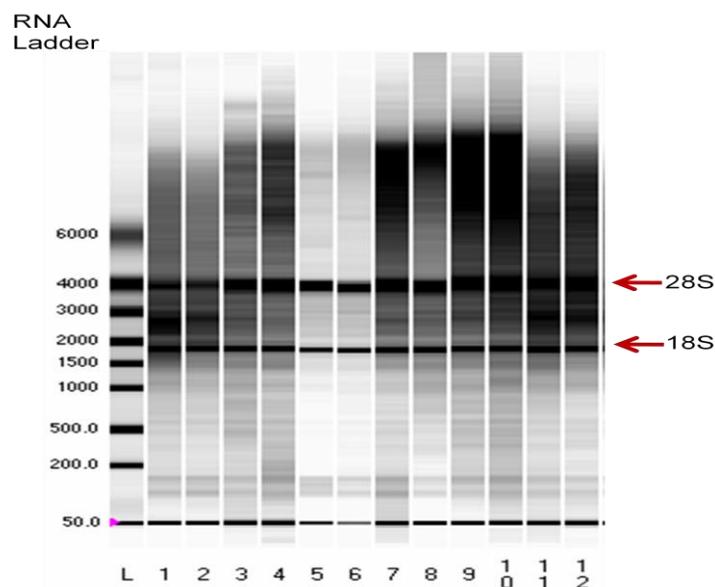


Figura 16. Electroforesis capilar de RNA total de muestras de biopsias. En la figura se presenta la electroforesis de muestras de RNA correspondientes a algunas de las biopsias extraídas, indicándose la posición de las subunidades ribosomales 18s y 28s. Se puede observar la excelente calidad de dos de las muestras seleccionadas para perfiles de expresión (carriles 5 y 6).

Cuadro 10. Características de las muestras de controles y pacientes seleccionadas para el análisis de perfil de expresión génica mediante microarreglos.

Muestra	Género	Edad (años)	Tipo vitiligo vulgar (actividad)	No Biopsias
C1	Femenino	54	Sano	1
C2	masculino	13	sano	1
C3	femenino	66	sano	1
C4	masculino	22	sano	1
C5	femenino	5	sano	1
C6	masculino	46	Sin vitiligo/ problema tiroideo	1
C7	femenino	28	Sin vitiligo/ Dermatitis atópica	1
C8	Femenino	40	Sin vitiligo/ Diabetes	1
Vit004	femenino	54	VV activo	2 (lesión y pigmentada)
Vit020	masculino	46	VV activo	2 (lesión y pigmentada)
Vit099	masculino	11	VV activo	2 (lesión y pigmentada)
Vit148	femenino	55	VV activo	2 (lesión y pigmentada)
Vit167	femenino	46	VV activo	2 (lesión y pigmentada)
Vit021	masculino	55	VV estable	2 (lesión y pigmentada)
Vit050	masculino	11	VV estable	2 (lesión y pigmentada)
Vit131	femenino	25	VV estable	2 (lesión y pigmentada)
Vit190	femenino	46	VV estable	2 (lesión y pigmentada)
Vit203	femenino	54	VV estable	2 (lesión y pigmentada)

6.2.2. Marcaje e hibridación de muestras, escaneado de microarreglos

El RNA total proveniente de las muestras seleccionadas fue procesado para poder realizar la transcripción *in vitro* y obtener aRNA marcado siguiendo las indicaciones de Affymetrix. En las etapas finales del proceso, los aRNAs puros y fragmentados fueron hibridados con los microarreglos de expresión génica HG-U133 Plus 2.0, lavados, teñidos y escaneados. Los Archivos generados luego del escaneo del chip son .CELL que contiene los resultados de los cálculos de intensidad de los pixeles de la imagen almacenada como .DAT del chip (figura 18) y archivos .RMA. Los datos obtenidos fueron extraídos, normalizados y resumidos con el método robusto RMA implementado en el software Expression Console de Affymetrix.

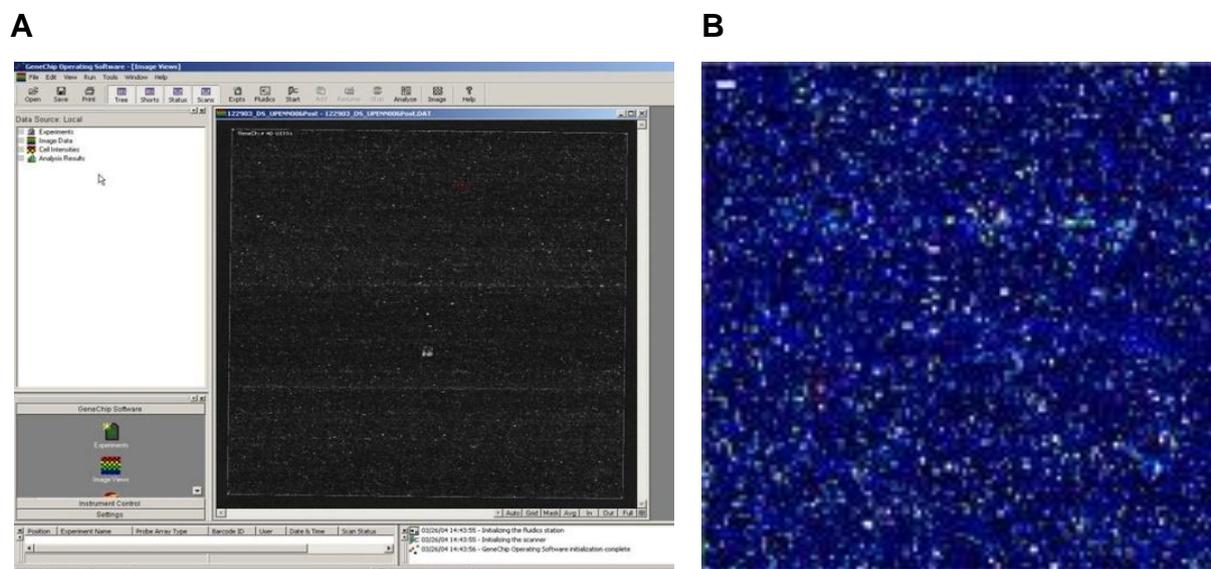


Figura 17. Detección de pixeles mediante Expresión Console. (A) En la imagen se presenta la ventana de comandos del Software Expresión Console en la captura de la imagen de un Chip de expresión. (B) Ejemplo de captura de pixeles de un microarreglo de expresión génica HG-U133 Plus 2.0.

6.2.3. Normalización de datos de microarreglos

Una vez escaneados los arreglos, los resultados obtenidos fueron normalizados aplicando el método “Quantile Normalización”. En la figura 19 se muestra el efecto del método de normalización para hacer comparables las réplicas técnicas presentes en el arreglo, representado en un grafico de Box Plot.

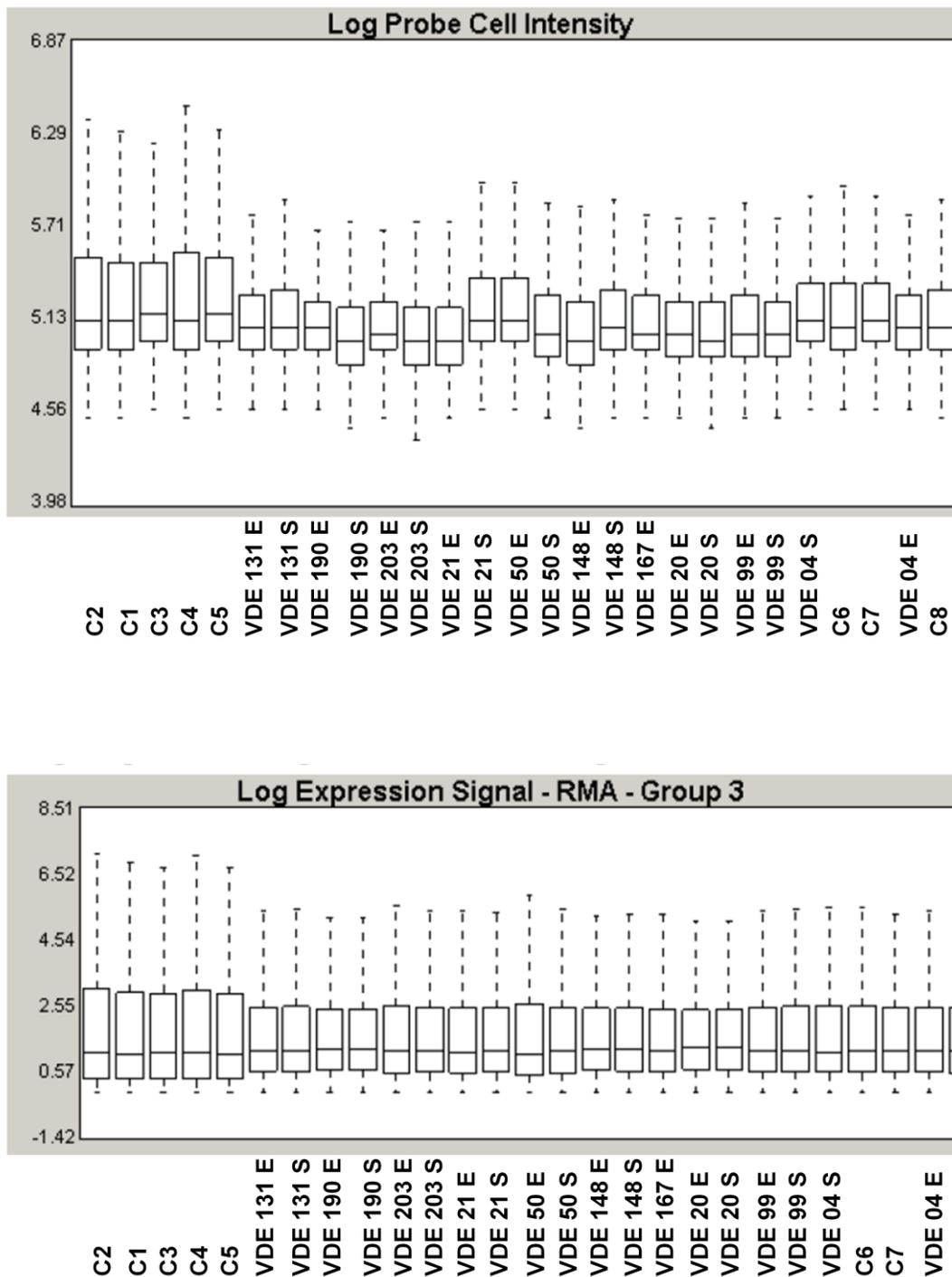


Figura 18. Distribución de datos después de aplicar el método “Quantile Normalization”. En el gráfico superior se representan los datos sin normalizar. En el Gráfico inferior se representan las réplicas normalizadas entre sí.

Después se procedió con la normalización global para hacer comparables todas las muestras entre sí. Para dicho efecto fue aplicado el método de Loess. En la figura

20 se observa el efecto de la normalización global, en la que destaca la superposición de las curvas, lo que es indicativo de muestras comparables.

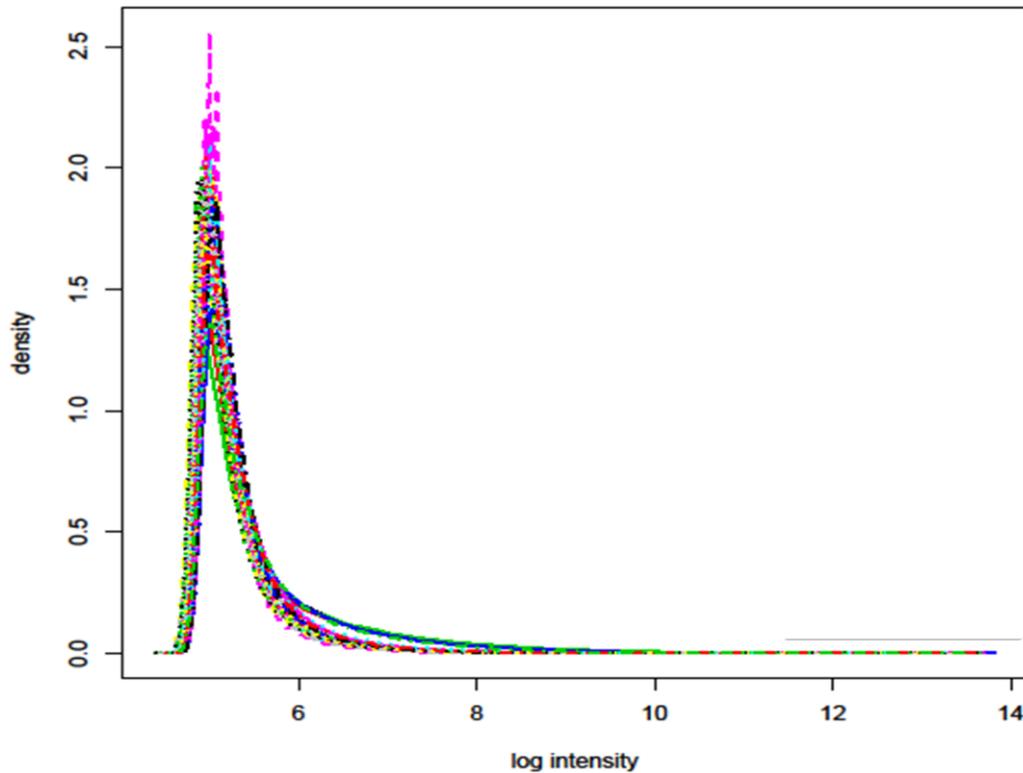


Figura 19. Distribución de datos después de aplicar el método de Loess de normalización global. En la grafica se observa la superposición de las curvas una vez normalizadas.

La concordancia de señal es evaluada usando el coeficiente de correlación de Pearson (r^2) y Spearman (r^2) que compara los valores de señal en dos archivos CHP. El mapa de calor contiene comparaciones por parejas de los valores de señal de todos los archivos seleccionados CHP, donde los valores r^2 han sido convertidos en una escala pseudocolor, figura 21.

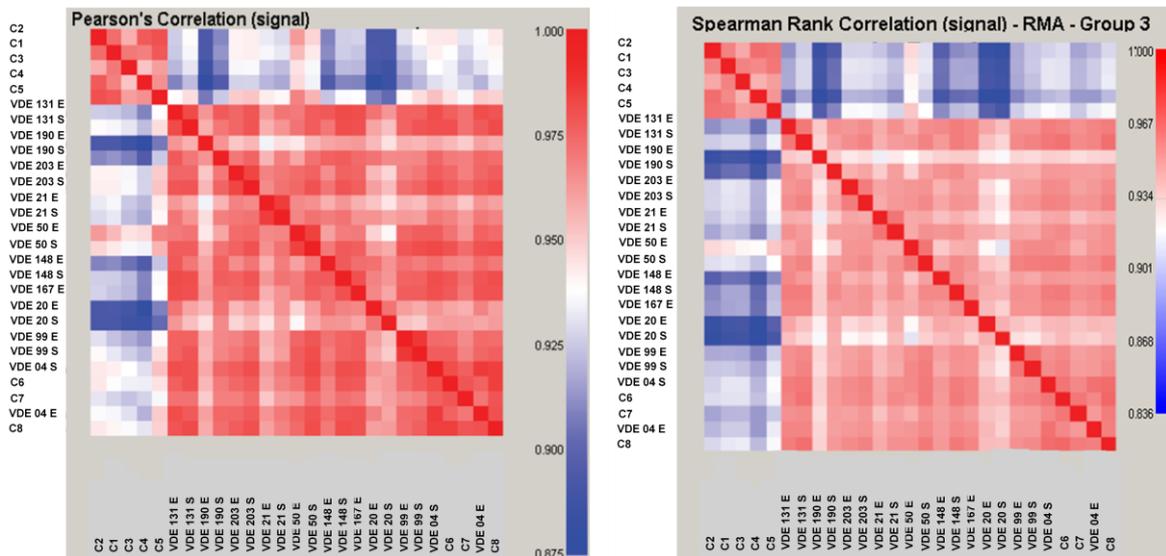


Figura 20. Heatmap de Correlación de Pearson y Spearman (señal) de los datos analizados mediante el arreglo 3'IVT. Se observa la agrupación de muestras claramente en casos y controles.

Como se observa tanto en los datos normalizados (figura 19) y en los heat maps obtenidos (figura 21) podemos diferenciar dos grupos de patrones de expresión:

- Controles C1 a C5
- Casos y C6 a C8.

En este último grupo, los controles C6 a C8 se presentan patrones de expresión semejantes a los obtenidos para las biopsias de pacientes con vitiligo.

6.2.4. Selección de genes diferencialmente expresados

Para identificar los genes diferencialmente expresados, considerando los controles de hibridación ya previamente empleados en el proceso de normalización de los arreglos, fueron realizadas las comparaciones por grupos de muestras considerando el esquema de la figura 22.

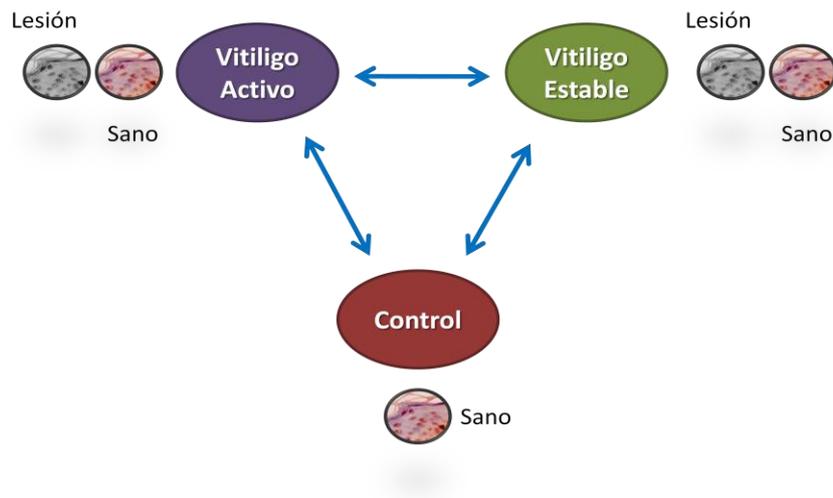


Figura 21. Esquema de análisis de expresión en muestras de pacientes y controles. En la figura se representa el flujo de comparaciones realizadas entre los patrones de expresión de biopsias sin lesión y con vitiligo de pacientes y muestras control.

Dentro de las comparaciones realizadas:

- VVA /VVE permite identificar genes involucrados con el pronóstico, la actividad y progresión de la enfermedad.
- VV tejido sin lesión / tejido con vitiligo permite identificar genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad.
- VVA o VVE (tejido sin lesión y afectado) / muestras control permite identificar genes involucrados con el desarrollo y daño en vitiligo.

Una vez normalizados los datos de cada chip, mediante el empleo del programa Bioconductor se realizó el filtrado de genes en los diferentes grupos de comparación teniendo en cuenta que los valores de intensidad estuvieran alterados en al menos un 20% de los arreglos analizados mediante una prueba de t . En este punto se obtienen los valores de “ p crudos” para cada uno de los genes en el arreglo para las muestras analizadas. Una vez considerada la hipótesis múltiple los valores de “ p fueron ajustados” y corregidos mediante el método Bonferroni y Benjamini Hochberg. En el caso de la primera corrección (Bonferroni) el número de genes que cumplió con la hipótesis de cada caso fue escaso, en comparación al número obtenido por el método de Benjamini Hochberg, motivo por el cual éste es el más empleado en el análisis de datos de microarreglos de expresión. Los genes diferencialmente expresados en cada caso fueron identificado en la base de datos DAVID de acuerdo a su número de ID en el arreglo, agrupados funcionalmente e identificadas posibles interacciones.

6.2.5. Perfiles de expresión muestras con vitiligo activo vs estable

El análisis del perfil de expresión reveló que no existen genes con patrones de expresión significativamente diferentes ($p > 0.05$) que permitan diferenciar entre las dos condiciones de la enfermedad y que puedan ser empleados en el pronóstico.

6.2.6. Perfiles de expresión muestras sin lesión de pacientes con vitiligo activo vs estable

Al igual que en el caso anterior el análisis del perfil de expresión reveló que no existen genes con patrones de expresión significativamente diferentes ($p > 0.05$) que permitan diferenciar entre las dos condiciones de la enfermedad y que puedan ser empleados en el pronóstico.

A partir de estos dos resultados son consideradas las muestras provenientes de pacientes con vitiligo vulgar como “grupos”, sin distinción de la actividad, sólo haciendo diferencia entre el sitio de su obtención: provenientes de lesiones o de una zona sin vitiligo.

6.2.7. Perfiles de expresión muestras con vitiligo vulgar vs sin lesión de pacientes

En este caso el análisis del perfil de expresión reveló que sólo un gen presenta patrón de expresión significativamente diferente ente ambos tipos de muestras. Este gen tiene número de identificación de Affymetrix 205694_at, $p = 0.00262$ tanto para corrección de Bonferroni y Benjamini Hochberg.

Este gen subexpresado corresponde a *tyrosinase-related protein 1*. La función del producto de este gen está relacionado con el metabolismo de la tirosinasa (TYRP1, enzima clave en el desarrollo de la melanina), diferenciación de los melanocitos, organización de los melanosomas, y participa en proceso de pigmentación y oxidación.

6.2.8. Perfiles de expresión muestras con vitiligo vulgar vs muestras control

En este caso el análisis del perfil de expresión reveló que 482 sondas correspondientes a genes identificables presentan patrones de expresión significativamente diferente ente ambos tipos de muestras, considerando valores de $p \leq 0.05$ considerando corrección de Benjamini Hochberg.

A partir del análisis funcional obtenido mediante agrupación de genes utilizando la base de datos DAVID se observa principalmente que estos genes se encuentran involucrados en los siguientes procesos:

1. Grupo 1 mayoritariamente enriquecido por las siguientes categorías: genes de la Cadena Respiratoria ($P=5.30E-30$; Benjamini $1.10E-27$), membrana mitocondrial interna ($P=3.40E-28$; Benjamini $1.40E-25$), fosforilación oxidativa ($P=2.70E-25$; Benjamini $1.70E-23$), membrana de organelos ($P=9.92E-19$; Benjamini $3.60E-17$), Oxido reducción ($P=0.004$; Benjamini $1.60E-4$), entre otros.
2. Grupo 2 mayoritariamente enriquecido por genes pertenecientes a 6 categorías: gránulos de pigmento ($P=1.25E-15$; Benjamini $4.06E-14$), melanosoma ($P=1.25E-15$; Benjamini $4.06E-14$), unión de vesículas a membrana citoplasmática ($P=5.72E-6$; Benjamini $1.14E-4$), vesículas del citoplasma ($P=1.07E-05$; Benjamini $1.85E-4$), unión de vesículas a membrana ($P=1.13E-5$; Benjamini $1.88E-4$) y vesículas ($P=2.71E-5$; Benjamini $4.32E-4$).
3. En los restantes grupos se encuentra genes que participan en empalme de RNA (RNA splicing), unión a RNA, procesamiento de mensajeros, metabolismo, síntesis de ATP, inflamación, proteosoma, apoptosis, vesículas, peroxisomas y estrés oxidativo.

6.2.9. Perfiles de expresión muestras pigmentadas vitiligo vulgar vs muestras control

En este caso el análisis del perfil de expresión reveló que 338 sondas correspondientes a genes identificables presentan patrones de expresión significativamente diferente ente ambos tipos de muestras, considerando valores de $p \leq 0.05$ considerando corrección de Benjamini Hochberg.

A partir del análisis funcional obtenido mediante agrupación de genes utilizando la base de datos DAVID se observa principalmente que estos genes se encuentran involucrados en los siguientes procesos:

1. Grupo 1 mayoritariamente enriquecido por genes pertenecientes a 6 categorías: gránulos de pigmento ($P=2.14E-15$; Benjamini $6.83E-13$), melanosoma ($P=2.14E-15$; Benjamini $6.83E-13$), unión de vesículas a membrana citoplasmática ($P=3.23E-05$; Benjamini $6.54E-4$), unión de vesículas a membrana ($P=5.43E-5$; Benjamini 0.001), vesículas ($P=1.2E-4$; Benjamini 0.0021) y vesículas del citoplasma ($P=1.5E-4$; Benjamini 0.002).
2. Grupo 2 mayoritariamente enriquecido por las siguientes categorías: genes de la Cadena Respiratoria ($P=2.10E-13$; Benjamini $3.65E-11$), membrana mitocondrial interna ($P=1.79E-10$; Benjamini $1.56E-08$), fosforilación oxidativa ($P=2.74E-10$; Benjamini $1.59E-08$), membrana de organelos ($P=4.44E-06$; Benjamini $1.03E-4$), Oxidoreductasa ($P=2.69E-05$; Benjamini 0.003), entre otros.
3. En los restantes grupos se encuentra genes que participan en empalme de RNA (RNA splicing), unión a RNA, procesamiento de mensajeros, metabolismo, síntesis de ATP, inflamación, proteosoma, apoptosis, vesículas, peroxisomas y estrés oxidativo.

El análisis de los perfiles de expresión de estos últimos dos grupos de biopsias revela que para las muestras de piel pigmentada de pacientes se tiene que:

- El grupo de genes principalmente afectados son los asociados al pigmento.
- Las categorías de genes de los diferentes grupos son similares, sin embargo en el último caso, el número de genes en cada categoría es menor.
- Las muestras con vitiligo y piel sin lesión de pacientes comparten 286 genes correspondiendo a un 84.61% de los que presentan perfil alterado en muestras pigmentadas de vitiligo vulgar y 63.07% de los genes que presentan perfil de expresión alterada en lesiones de vitiligo vulgar.
- Esto da cuenta que en piel sana de pacientes con vitiligo si hay daño.

6.2.10. Análisis de vías

A partir de los datos de expresión y las comparaciones realizadas con los genes diferencialmente expresados, se realizó el análisis de vías en la base de datos DAVID, con la cual se evidenciaron interacciones entre los genes alterados, fundamentándose en la información recopilada en bases de datos de interacciones publicadas en artículos científicos. También fueron obtenidos agrupamientos de genes de acuerdo a su función y de acuerdo a enfermedades y padecimientos en los que estos participan.

Para los análisis de vías fueron empleados sólo los resultados de las comparaciones de vitiligo vulgar vs piel control y piel sin lesión de pacientes con vitiligo vulgar vs piel control.

En el cuadro 11 se muestran algunos de los genes mayormente alterados en la comparación vitiligo vulgar vs piel control indicando la enfermedad en la que se encuentra involucrado. En el cuadro 12 se muestran algunos de los genes mayormente alterados en la comparación de piel sin lesión de pacientes con vitiligo vulgar vs piel control, indicando la enfermedad en la que se encuentra involucrado.

Como parte del análisis de vías, se realizaron gráficos de interacciones entre algunas de las proteínas que codifican los genes diferencialmente expresados en cada una de las comparaciones. Las interacciones fueron determinadas mediante el empleo de la base de datos String –protein, utilizando el software libre STRING 9.0. Fueron observadas que los genes participaron en rutas comunes de Transporte, generación de vesículas, transporte, generación de pigmento y gránulos de pigmento, melanosomas, inflamación estrés oxidativo, proteosoma y apoptosis, cáncer, entre otras.

Con la finalidad de hacer sentido biológico entre los genes diferencialmente expresados y la patología, fueron generados gráficos de las interacciones obtenidos a partir del análisis de vías; en la figura 23 se muestra un ejemplo de los gráficos de interacciones obtenidos de este análisis.

Cuadro 11. Genes alterados vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan.

Extraído de base de datos DAVID.

Gene Name	OMIM_DISEASE
CWC15 spliceosome-associated protein homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Conduct disorder and ADHD: Evaluation of conduct problems as a categorical and quantitative trait in the international multicentre ADHD genetics study,
DEK oncogene	Leukemia, acute nonlymphocytic,
IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	IMPDH2 enzyme activity, variation in,
Kruppel-like factor 6	Gastric cancer, somatic, Prostate adenocarcinoma-1, Prostate cancer, somatic,
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	Mitochondrial complex I deficiency,
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13	Thyroid carcinoma, Hurthle cell,
Niemann-Pick disease, type C2	Niemann-pick disease, type C2,
SAM and SH3 domain containing 1	A Genome-Wide Association Study Identifies Protein Quantitative Trait Loci (pQTLs),
TIMP metalloproteinase inhibitor 3	Sorsby fundus dystrophy, Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory,
TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1	Hemolytic anemia due to triosephosphate isomerase deficiency,
TSPY-like 1	Sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome,
aldo-keto reductase family 1, member C2	Obesity, hyperphagia, and developmental delay,
amyloid beta (A4) precursor protein	Alzheimer disease 1, familial, Alzheimer
catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	Colorectal cancer, Hepatoblastoma, Hepatocellular carcinoma, Medulloblastoma, Ovarian cancer, Ovarian carcinoma, endometrioid type, Pilomatricoma,
cathepsin H	Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci,
chromosome 18 open reading frame 45	Many sequence variants affecting diversity of adult human height,
collagen, type VI, alpha 3	Bethlem myopathy, Ullrich congenital muscular dystrophy,
complement factor D (adipsin)	Complement factor D deficiency,
complement factor H	Basal laminar drusen, Complement factor H deficiency
cytochrome c oxidase subunit Vb polypeptide 1 (ubiquitous)	Cytochrome c oxidase deficiency,
cytochrome c, somatic	Thrombocytopenia 4,
decorin	Corneal dystrophy, congenital stromal,
fibronectin 1	Glomerulopathy with fibronectin deposits 2, Glomerulopathy, fibronectin,
forkhead box O3; forkhead box O3B pseudogene	Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis,
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	Glutamine deficiency, congenital,

Cuadro 11. Genes alterados vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan (continuación) Extraído de base de datos DAVID

Gene Name	OMIM_DISEASE
hexosaminidase B (beta polypeptide)	Sandhoff disease, infantile, juvenile, and adult forms, Spinal muscular atrophy, juvenile,
histidine ammonia-lyase	Histidinemia,
iron-sulfur cluster scaffold homolog (E. coli)	Myopathy with exercise intolerance, Swedish type,
keratin 17; keratin 17 pseudogene 3	Pachyonychia congenita, Jackson-Lawler type, Steatocystoma multiplex,
keratin 2	Ichthyosis bullosa of Siemens,
keratin 6B	Pachyonychia congenita, Jackson-Lawler type,
lactate dehydrogenase B	Lactate dehydrogenase-B deficiency,
major histocompatibility complex, class I, A	Abacavir hypersensitivity, susceptibility to, Ankylosing spondylitis, susceptibility to, 1, Stevens-Johnson syndrome, susceptibility to,
major histocompatibility complex, class I, G	Asthma, susceptibility to,
matrix Gla protein	Keutel syndrome, Natural teeth remaining intact,
nuclear receptor coactivator 4	Thyroid carcinoma, papillary,
palladin, cytoskeletal associated protein	Pancreatic cancer, 1, Pancreatic cancer susceptibility
peripheral myelin protein 22	Charcot-Marie-Tooth disease, type 1A, Charcot-Marie-Tooth disease, type 1E, Dejerine-Sottas disease, Neuropathy.
programmed cell death 10	Cerebral cavernous malformations 3,
scavenger receptor class B, member 2	Action myoclonus-renal failure syndrome,
serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	Atopy, Netherton syndrome,
solute carrier family 25 member 3	Mitochondrial phosphate carrier deficiency,
sterol carrier protein 2	Leukoencephalopathy with dystonia and motor neuropathy,
thymidine kinase 2, mitochondrial	Mitochondrial DNA depletion myopathy, Mitochondrial DNA depletion syndrome, myopathic form,
transaldolase 1	Transaldolase deficiency,
tubulin, alpha 1a	Lissencephaly 3,
tyrosinase-related protein 1	Albinism, brown, Albinism, rufous, Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans,
ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa	Mitochondrial complex III deficiency,
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia, Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in Rheumatoid Arthritis,
zinc finger protein 750	Seborrhea-like dermatitis with psoriasiform elements,

Cuadro 12. Genes alterados en muestras sin lesión de vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan. Extraído de base de datos DAVID.

Gene Name	OMIM_DISEASE
B-cell CLL/lymphoma 6	Lymphoma, B-cell,
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	Leukemia, acute myeloid,
CWC15 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)	Conduct disorder and ADHD: Evaluation of conduct problems as a categorical and quantitative trait in the international multicentre ADHD genetics study,
DEK oncogene	Leukemia, acute nonlymphocytic,
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	Mitochondrial complex I deficiency,
Notch homolog 2 (Drosophila)	Alagille syndrome 2,Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes,
Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	Amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism/dementia complex 2,Parkinson disease 7, autosomal recessive early-onset,
TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1	Hemolytic anemia due to triosephosphate isomerase deficiency,
TSPY-like 1	Sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome,
actin, beta	Dystonia, juvenile-onset,
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	VLCAD deficiency,
amyloid beta (A4) precursor protein	Alzheimer disease 1, familial,Alzheimer disease-1, APP-related,Amyloidosis
ankylosis, progressive homolog (mouse)	Chondrocalcinosis 2,Craniometaphyseal dysplasia,
anthrax toxin receptor 1	Hemangioma, capillary infantile, susceptibility to,
ataxin 10	Spinocerebellar ataxia-10,
cathepsin H	Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci,
chromosome 18 open reading frame 45	Many sequence variants affecting diversity of adult human height,
clathrin interactor 1	Schizophrenia, susceptibility to,
complement factor D (adipsin)	Complement factor D deficiency,
complement factor H	Basal laminar drusen,Complement factor H deficiency.
cytochrome c, somatic	Thrombocytopenia 4,
desmoplakin	Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 8,Dilated cardiomyopathy with woolly hair and keratoderma, Epidermolysis bullosa
ets homologous factor	Genetic correlates of brain aging on MRI and cognitive test measures: a genome-wide association and linkage analysis in the Framingham Study,

Cuadro 12. Genes alterados en muestras sin lesión de vitiligo vulgar y enfermedad en la que participan (continuación). Extraído de base de datos DAVID

Gene Name	OMIM_DISEASE
fibroblast growth factor receptor 3	achondroplasia,Bladder cancer,CATSHL syndrome,Cervical cancer, somatic,Colorectal cancer, somatic,Crouzon syndrome with acanthosis nigricans,Hypochondroplasia,LADD syndrome,Muenke syndrome,Nevus, keratinocytic, nonepidermolytic,Thanatophoric dysplasia, types I and II,
forkhead box C1	Anterior segment mesenchymal dysgenesis, Axenfeld anomaly,Axenfeld-Rieger syndrome, type 3,Iridogoniodysgenesis,Iridogoniodysgenesis, type 1,Iris hypoplasia and glaucoma,Rieger anomaly,Rieger or Axenfeld anomalies,
gap junction protein, beta 2, 26kDa	Bart-Pumphrey syndrome,Deafness, Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome, Keratoderma, palmoplantar, with deafness,Vohwinkel syndrome,
gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	Amyloidosis, Finnish type,
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	Glutamine deficiency, congenital,
histidine ammonia-lyase	Histidinemia,
keratin 17; keratin 17 pseudogene 3	Pachyonychia congenita, Jackson-Lawler type,Steatocystoma multiplex,
keratin 2	Ichthyosis bullosa of Siemens,
lactate dehydrogenase B	Lactate dehydrogenase-B deficiency,
major histocompatibility complex, class I, G	Asthma, susceptibility to,
methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	Homocystinuria, cblD type, variant 1,Methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblD type,Methylmalonic aciduria, cblD type, variant 2,
oligophrenin 1	Mental retardation, X-linked, with cerebellar hypoplasia and distinctive facial appearance,
platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Common variants in the GDF5-UQCC region are associated with variation in human height,Gastrointestinal stromal tumor, somatic,Hypereosinophilic syndrome, idiopathic, resistant to imatinib,
programmed cell death 10	Cerebral cavernous malformations 3,
transformer 2 beta homolog (Drosophila)	Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity,
tubulin, alpha 1a	Lissencephaly 3,
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Conduct disorder and ADHD: Evaluation of conduct problems as a categorical and quantitative trait in the international multicentre ADHD genetics study,
zinc finger protein 750	Seborrhea-like dermatitis with psoriasiform elements,

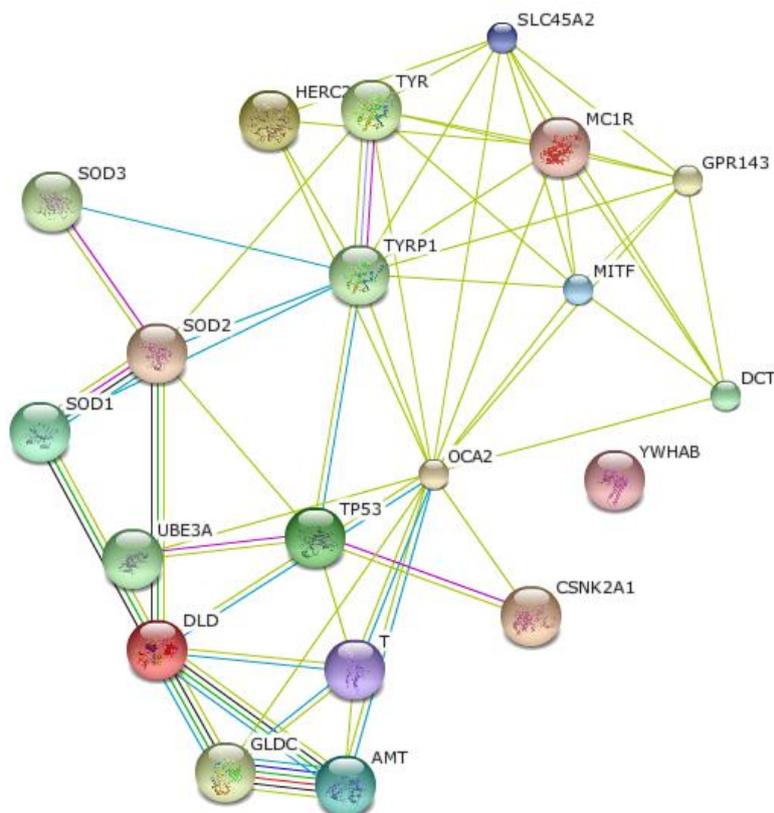


Figura 22. Interacción entre genes diferencialmente expresados asociados a la ruta del pigmento. En la figura se muestra un ejemplo de los genes involucrados en la ruta del pigmento obtenidos a partir del análisis con STRING 9.0.

6.3. Validación por qPCR de genes diferencialmente expresados

Durante el análisis de vías de los genes diferencialmente expresados identificados en las muestras analizadas, y los previamente reportados en literatura científica como marcadores o relacionados con la enfermedad, fueron seleccionados algunos genes para su validación. Además se incluyeron 2 genes endógenos para ser utilizados durante la normalización de los resultados.

La determinación de los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa fue realizada empleando SYBR Green, para lo cual fue necesario diseñar aligonucleótidos específicos con Tm adecuadas y que generaran amplicones cercanos a los 250pb. Para ello fue considerada la secuencia reconocida para cada gen de interés descrita en la base de datos de Affymetrix, considerando el número de identificación de la sonda que la reconoce. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el Software GENTle diseñado por la Universidad de Cologne, Alemania.

En el cuadro 13 se muestran las secuencias y características de los oligonucleótidos empleados.

Cuadro 13. Listado de primers para amplificación por tiempo real.

Sequence Description	Bases Qty.	Sequence	Tm °C
ACTINA-F	21	TggACT TCgAgCAAgAgATgg	61.3
ACTINA-R	21	ggAAggAAggCTggAAgAgTg	61.1
GAPD-F	21	TCCTgCACCACTgCTTA	62.5
GAPD-R	24	ATggCATggACTgTggTCATgAgT	65.7
CTSB-F	24	TAATCATgTgggTgAgCCAgTggA	66.4
CTSB-R	24	CAACTCCTgACCACTTggTTTCCT	63.5
CTSL2-F	24	TAC CAg Tgg AAggCA ACA CAC AgA	64.7
CTSL2-R	24	gCC ATT gTg AAg CCA TgT TTC CCT	67.8
DCT-F	21	ATgTCACCAAATACTgTgggC	58.2
DCT-L	30	ACTgAAgATATAAgCAgTAAAgTgATCTgg	60.5
RAB1A-F	24	TTCAgAgCACTCCAgTCAAgCAgT	63.5
RAB1A-R	24	ATCTCTgACCTTTgTggAgACggT	63.2
STOM-F	24	TgTgAAgTggTTCACCCCTTgAggA	65.8
STOM-R	24	TCTATgCgTCCCTCCCAAgTgATT	65.7
TXN-F	24	TggTgAAgCAgATCgAgAgCAAgA	66.3
TXN-R	24	ACCACgTggCTgAgAAgTCAACTA	63.1
TYRP1-F	24	TTCTCAATggCgAgTggTCTgTGA	66.9
TYRP1-R	24	AAACCAACTTCCAAGCACTgAgCg	66.4
YWHAB-F	24	TCACAgTAATgCTgCCgTTgTTCg	67.0
YWHAB-R	24	ggAAgACACTgTggACATTTgTgg	63.6
TNF α -F	22	CCCAGgCAgTCAgATCATCTT	60.1
TNF α -R	18	AgCTgCCCCTCAgCTTgA	60.6

Antes de comenzar los ensayos de validación y detección de los niveles de expresión de los genes seleccionados, fue necesario realizar la optimización de la qPCR, determinando la eficiencia y especificidad de las amplificaciones, y determinando la cantidad de RNA a amplificar. Una vez determinada las condiciones óptimas de PCR y observando que a partir de una dilución 1:10 de producto de RT-PCR obtenido a partir de 200ng de RNAm.

Posterior a la optimización de la reacción de qPCR se procedió a amplificar un grupo de muestras provenientes de lesiones y tejido pigmentado de 25 pacientes, siendo un total de 50 muestras. Para determinar diferencias en los niveles de expresión respecto de los niveles considerados normales, se compararon los niveles de expresión de los genes seleccionados en cada una de las muestras, con sus respectivos genes en 10 controles provenientes de 10 sujetos considerados como clínicamente sanos. Las reacciones de qPCR para cada gen fue realizada por triplicado, teniendo como criterio de aceptación de cada réplica una desviación estándar pequeña en los valores de Ct obtenidos, datos con los cuales las curvas de amplificación se superponen.

6.3.1. Validación por tiempo real del gen Tiorredoxina (TXN)

El gen Tiorredoxina participa en transporte de vesículas y actúa como antioxidante entre otras funciones. Se ha observado incremento de la expresión de este gen en condiciones de estrés oxidativo y como un mecanismo de defensa ante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)^{76, 77}.

En la figura 24 se observan las gráficas obtenidas para la amplificación de los triplicados de las muestras analizadas.

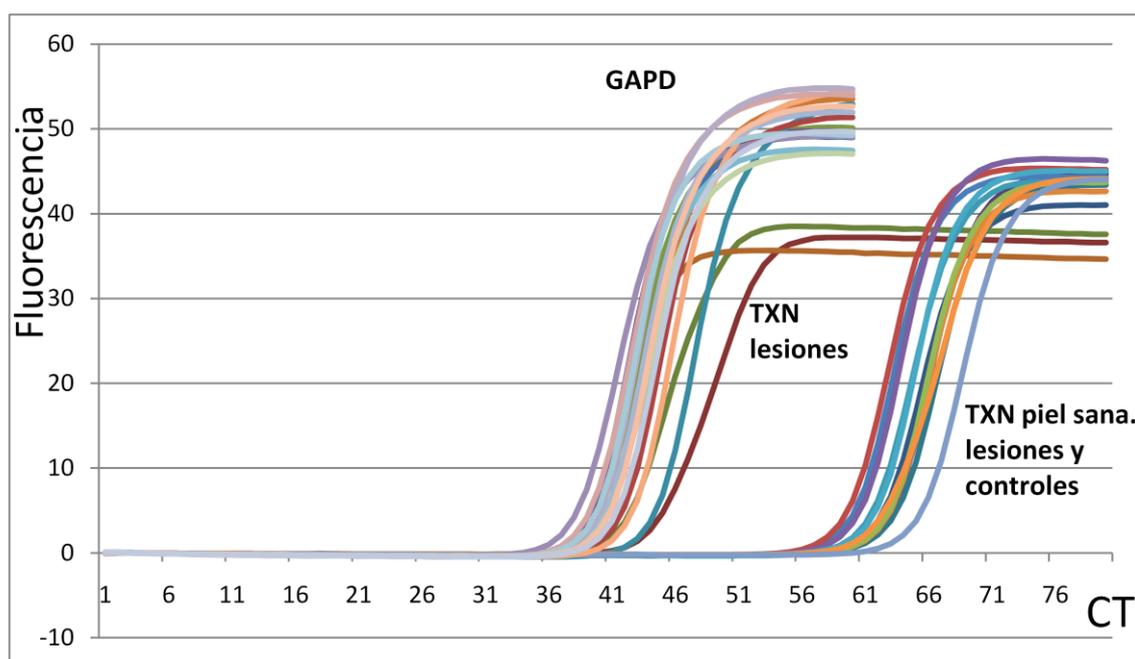


Figura 23. Ejemplo de grafica de amplificación Ct vs Fluorescencia obtenida para el gen TXN en muestras de pacientes con vitiligo y controles. En la figura se observan los amplicones obtenidos para cada una de las muestras y el gen de referencia GAPDH.

Podemos observar que todas las muestras muestran amplicones en Ct similares para el gen de referencia. En el caso del gen TXN, se observa un grupo de amplicones con Ct similares para las muestras correspondiente a piel sana y lesiones de pacientes con vitiligo vulgar y controles, y otro grupo de muestras correspondientes a piel proveniente de lesiones con vitiligo, que presentan patrones de expresión alterados.

En cuanto al análisis de los cambios de expresión, se pudo detectar que 6 pacientes presentan patrones de sobre-expresión para este gen, como se observa en la gráfica de expresión relativa de las muestras analizadas. Figura 25.

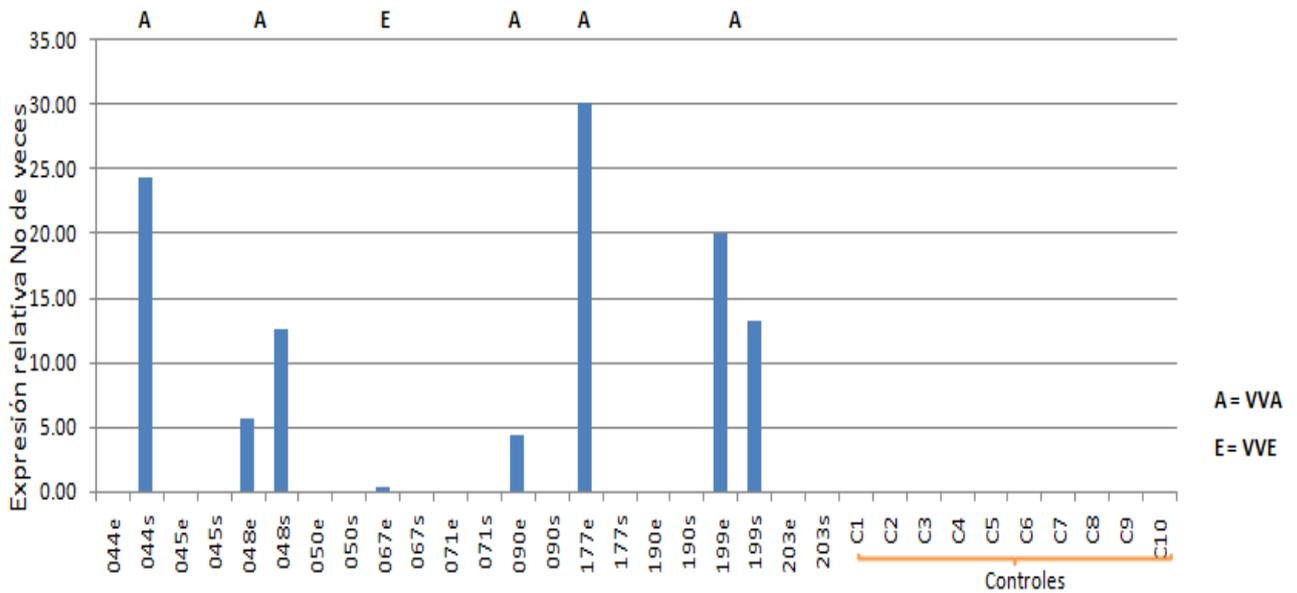


Figura 24. Gráfica expresión relativa de TXN. En la figura se observan los niveles de expresión relativa obtenidas para cada una de las muestras y controles.

Del total de muestras analizadas, 6 pacientes (5 con VVA, 1 con VVE) presentan patrones de sobre expresión para este gen ($\chi^2= 2.9$, $P=0.088$, $rr=1.53$, I.C.=1.17-1.99), pudiendo ser empleado como marcador predictivo de la enfermedad dado que se presentó mayoritariamente y con niveles superiores en paciente con vitiligo vulgar activo ($\chi^2= 4.51$, $P=0.0336$, $rr=2.21$, I.C.=1.31-3.39).

6.3.2. Validación por tiempo real del gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El gen TNF- α es miembro de un grupo de citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. Se ha observado incremento de la expresión de este gen en una serie de patologías de naturaleza inflamatoria/autoinmune.

En cuanto al análisis de los cambios de expresión en el grupo de muestras, se pudo detectar que 5 pacientes presentan patrones de sobre-expresión de más del doble para este gen, mientras que 4 presentan niveles ligeramente superiores a los observados en las muestras controles como se observa en la gráfica de expresión relativa de la figura 26. A diferencia del gen anterior, los patrones de sobre expresión fueron observados independiente de la actividad de la enfermedad

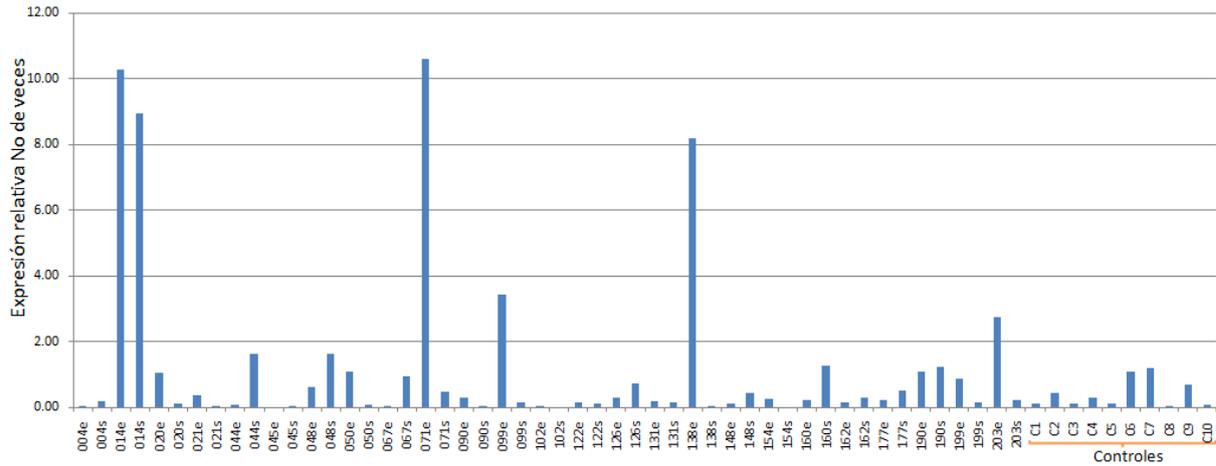


Figura 25. Gráfica expresión relativa de TNF-α. En la figura se observan los niveles de expresión relativa obtenidas para cada una de las muestras y controles.

6.3.3. Validación por tiempo real del gen Catepsina L2 (CTSL2)

El gen CTSL2 es miembro de la familia C1 de peptidasas, siendo una cisteína proteinasa lisosomal cuya expresión ha sido detectada en melanocitos y keratinocitos⁷⁸ que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. Se ha niveles incrementados de la expresión de este gen en pieles de fototipos claros y en diferentes líneas celulares de cáncer⁷⁹.

En cuanto al análisis de los cambios de expresión en el grupo de muestras, se pudo detectar que 5 pacientes presentan patrones de sobre-expresión de más del doble para este gen, al igual que en 2 controles como se observa en la gráfica de expresión relativa de las figura 26.

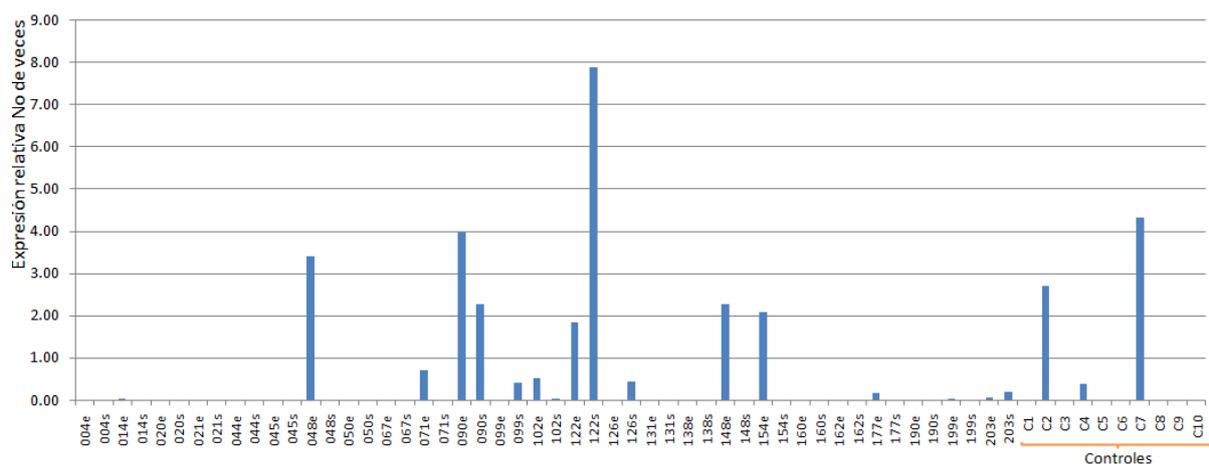


Figura 26. Gráfica expresión relativa de CTSL2. En la figura se observan los niveles de expresión relativa obtenidas para cada una de las muestras y controles.

6.3.5. Validación por tiempo real de CTSB, DCT, RAB1A, TYRP1 e YWHAB

Para el caso de estos 5 genes: Catepsina B (CTSB), Dopa cromotautomerasa (DCT), proteína relacionada a Ras 1A (RAB1A), proteína relacionada con tirosinasa 1 (TYRP1) y la proteína 14-3-3 beta/alfa (YWHAB), no fue posible detectar amplicones en casos y controles.

6.4. RESULTADOS OBJETIVO 4

6.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE CAMBIOS EN GENES EN VITILIGO

6.4.1.1A Genotipificación del polimorfismo TNF- α -308: Para el análisis de TNF α se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas, de 198 casos y 395 controles. Mediante un Test de Bondad de Ajuste se demostró que los genotipos TNF α en controles cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3.54$, $P = 0.06$, 1 grado de libertad). La frecuencia de los genotipos y alelos en los diferentes tipos de vitiligo en casos y controles son mostrados en el cuadro 14.

Cuadro 14. Distribución de genotipos y frecuencias de alelos TNF- α -308 en pacientes con vitiligo y muestras control.

	Vitiligo		Control		χ^2	<i>p</i>	OR	CI 95%
	N	%	n	%				
TNF- α -308G/A polymorphism Genotypes								
TNF α GG	177	89.39	356	90.13	0.08	0.78	0.92	0.51-1.68
TNF α GA/AA	21	10.61	39	9.87	0.08	0.78	1.08	0.6-1.96
TNF- α -308G/A polymorphism Alleles								
TNF α G	375	94.7	748	94.68	0	0.99	1.00	0.57-1.78
TNF α A	21	5.3	42	5.32	0	0.99	1.00	0.56-1.76

El 89.39% de los pacientes con vitiligo fueron homocigotos GG mientras que el 10.61% fue heterocigoto GA. Es importante señalar que no se detectaron homocigotos de TNF2 (TNF2/TNF2) en los casos.

Se consideró los datos obtenidos para el alelo A como el conjunto de frecuencias obtenidas para los genotipos GA y AA (GA/AA) en casos y controles. En general las frecuencias de los genotipos portadores del alelo A no presentaron una diferencia estadística entre casos y controles ($P = 0.78$, OR=1.08; IC 95%=0.6– 1.96).

Cuando se consideró por separado variables demográficas como el género, el tipo de vitiligo, edad de inicio, y actividad de la enfermedad fue encontrada asociación entre VV activos y la presencia del alelo A ($P = 0.0295$) con un O.R. = 2.0 (IC 95%= 1.01 – 3.93). Cuadro 15.

6.4.1.1B Detección de niveles de TNF- α en suero: Los niveles de TNF- α analizados en suero fueron determinados en 5 pacientes con VV activos, 5 pacientes con VV estable (todos positivos para el polimorfismo TNF- α -308G/A positive), 5 homocigotos (GG) independiente de la actividad y 16 controles. Todas las muestras analizadas presentaron nivel inferior a 7.8 pg/ml (valores de referencia: 7.8 - 500 pg/ml).

6.4.1.2 Genotipificación del polimorfismo FOXD3 -639: Las secuencias polimórficas no se detectaron en el total de casos y controles.

6.4.1.3 Genotipificación del polimorfismo AIRE 961: Para el análisis de AIRE se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de 198 casos y 310 controles. En el caso de éste polimorfismo se encontraron representados tanto en caso como en controles los 3 genotipos (C/C homocigoto normal; C/G heterocigoto; G/G homocigoto polimórfico). Se detectaron 42 casos y 70 controles con el alelo polimórfico. Al analizar mediante tablas 2x2 no se encontró asociación aparente entre la presencia del polimorfismo y la presencia o las diferentes formas de la enfermedad. Cuadro 16.

6.4.1.4 Genotipificación del polimorfismo IL-8 -251

Para el análisis de IL-8 se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas, de 198 casos y 310 controles. En el caso de éste polimorfismo se encontraron representados tanto en caso como en controles los 3 genotipos (T/T homocigoto normal; T/A heterocigoto; A/A homocigoto polimórfico). Se detectaron 126 casos y 201 controles con el alelo polimórfico. Al analizar mediante tablas 2x2 no se encontró asociación aparente entre la presencia del polimorfismo y la presencia o las diferentes formas de la enfermedad. Cuadro 16.

Cuadro 15. Distribución de genotipos y frecuencias de alelos TNF- α -308 en pacientes con formas activas de vitiligo (AVV)[12A] y estables (SVV) [12B].

13a	AVV		Control		χ^2	P	OR	CI 95%
	n	%	n	%				
TNF- α - 308G/A polymorphism								
Genotypes								
TNF α GG	73	82.02	356	90.13	4.74	0.0295	0.50	0.25-0.99
TNF α GA/AA	16	17.98	39	9.87	4.74	0.0295	2.00	1.01-3.93
TNF- α - 308G/A polymorphism								
Alleles								
TNF α G	162	90.9	748	94.68	3.48	0.062	0.57	0.3-1.08
TNF α A	16	9.1	42	5.32	3.48	0.062	1.76	0.92-3.32
13b								
	SVV		Controls		χ^2	P	OR	CI 95%
	n	%	n	%				
TNF- α - 308G/A polymorphism								
Genotypes								
TNF α GG	82	94.25	356	90.13	1.46	0.226	1.80	0.65-5.36
TNF α GA/AA	5	5.75	39	9.87	1.46	0.226	0.56	0.19-1.54
TNF- α - 308G/A polymorphism								
Alleles								
TNF α G	169	97.13	748	94.68	1.83	0.176	1.90	0.71-5.54
TNF α A	5	2.87	42	5.32	1.83	0.176	0.53	0.18-1.42

Cuadro 16. Distribución por frecuencias genotípicas y alélicas en casos y controles para AIRE 961 y para el gen IL8 -251.

	Vitiligo		Controles		<i>p</i>	OR	CI 95%
	n	%	n	%			
<i>Genotipos</i>							
<i>AIRE 961C/G</i>							
<i>Genotipos</i>							
CC	156	78.79	240	77.42	0.72	1.08	0.69-1.71
CG	41	20.71	65	20.97	0.94	0.98	0.62-1.56
GG	1	0.5	5	1.61	0.26	0.31	0.01-2.74
<i>IL-8 - 251T/A</i>							
<i>Genotipos</i>							
TT	72	36.36	109	35.16	0.78	1.05	0.71-1.55
TA	108	54.55	156	50.32	0.35	1.18	0.82-1.72
AA	18	9.09	45	14.52	0.07	0.59	0.32-1.09
<i>Alelos</i>							
<i>AIRE 961C/G</i>							
<i>Alelos</i>							
C	353	89.14	545	87.9	0.55	1.13	0.75-1.72
G	43	10.86	75	12.1	0.55	0.89	0.58-1.34
<i>IL-8 - 251T/A</i>							
<i>Alelos</i>							
T	252	63.64	374	60.3	0.29	1.15	0.88-1.51
A	144	36.36	246	39.7	0.29	0.87	0.66-1.14

6.4.2. Análisis de variación del número de copias por microarreglos de genotipificación Genome-Wide Human SNP Array 6.0

De las familias que fueron incorporadas a este estudio, sólo dos fueron seleccionadas para el análisis de variación del número de copias (figura 27). Una vez realizado el protocolo experimental de Affymetrix para número de copias y escaneado el Chip, los archivos BRLMM son analizados mediante la plataforma Genotyping Console para el análisis de las intensidades de hibridación. De éste análisis se obtuvieron los números de copias de los SNP presentes en el microarreglo tomándose como normal las intensidades correspondientes a las 2 copias del genoma de las muestras que fueron utilizadas como referencias en cada caso. A partir del resultado del análisis de las intensidades de hibridación y utilizando logaritmo en base 2 de las intensidades registradas para cada SNP, podemos observar aquellas regiones que presentan números de copias normales y otras que presentan alteraciones, ya sean amplificaciones o disminuciones. Estos resultados son entregados por paciente o grupos de pacientes (figura 28) o por cromosoma (figura 29).

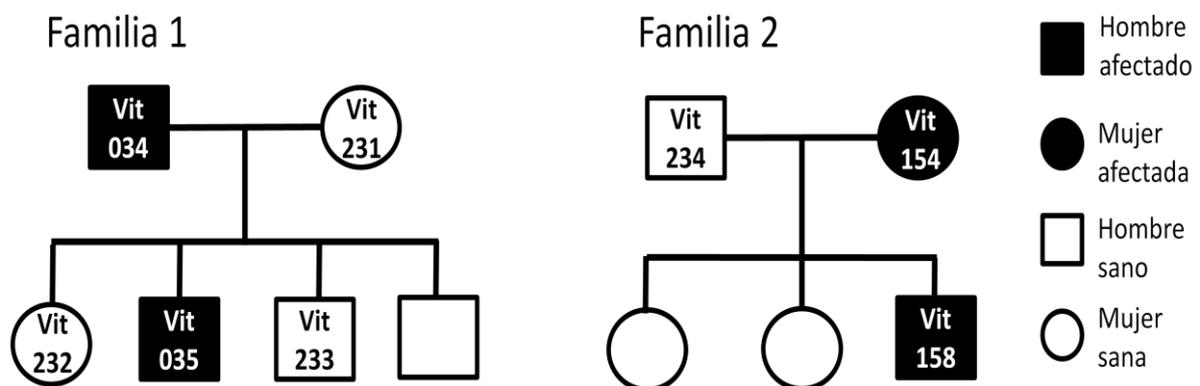


Figura 27. Árboles genealógicos de familias analizadas para variaciones en número de copias. En la figura se observan los pacientes afectados por vitiligo y familiares empleados como referencias de hibridación.

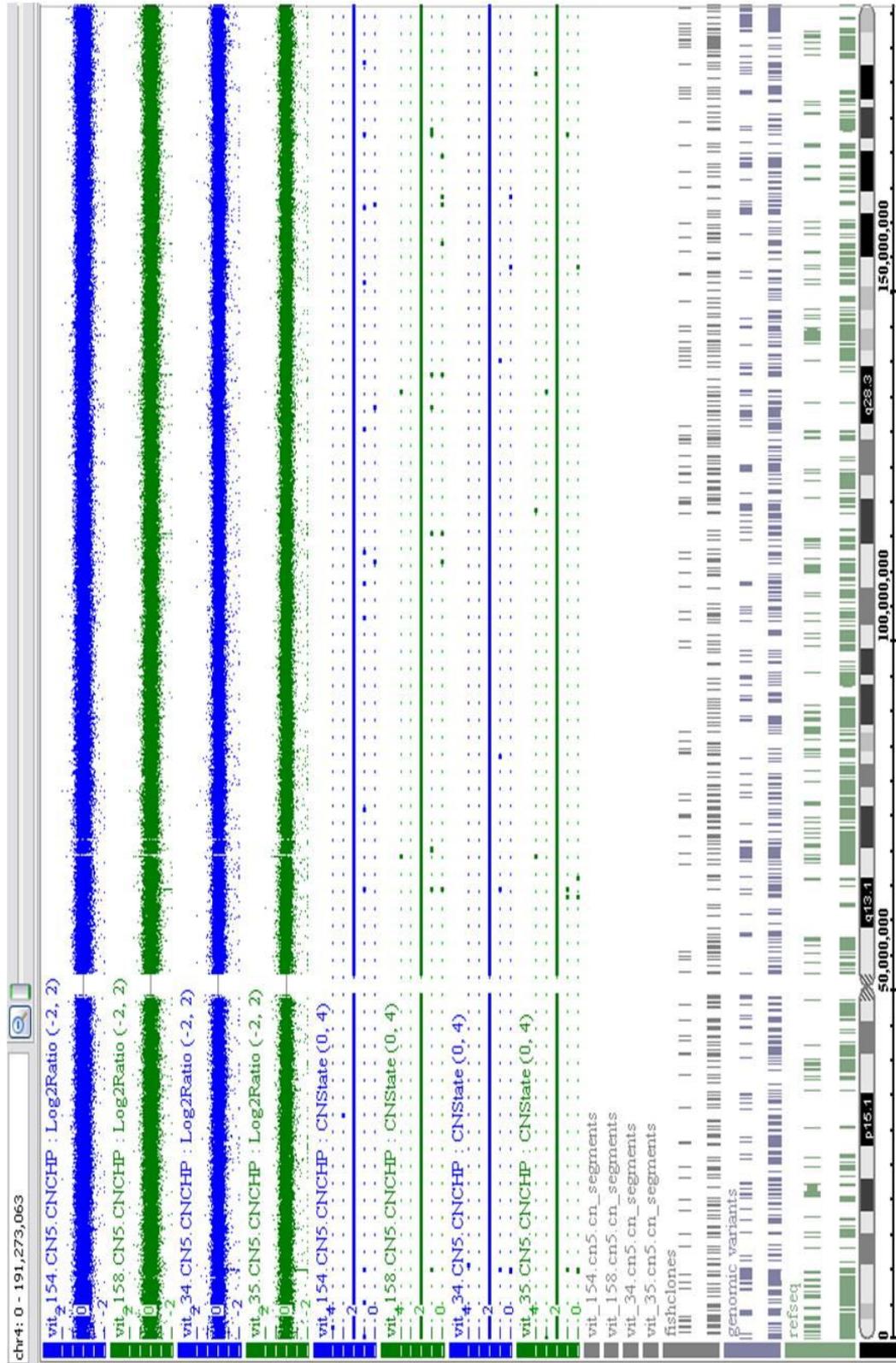


Figura 28: Imagen obtenida del análisis de intensidades de hibridación. Ejemplo de imagen con los resultados de los 4 pacientes analizados con microarreglos de SNP. Se observan las alteraciones en número de copias obtenidas para el cromosoma 4

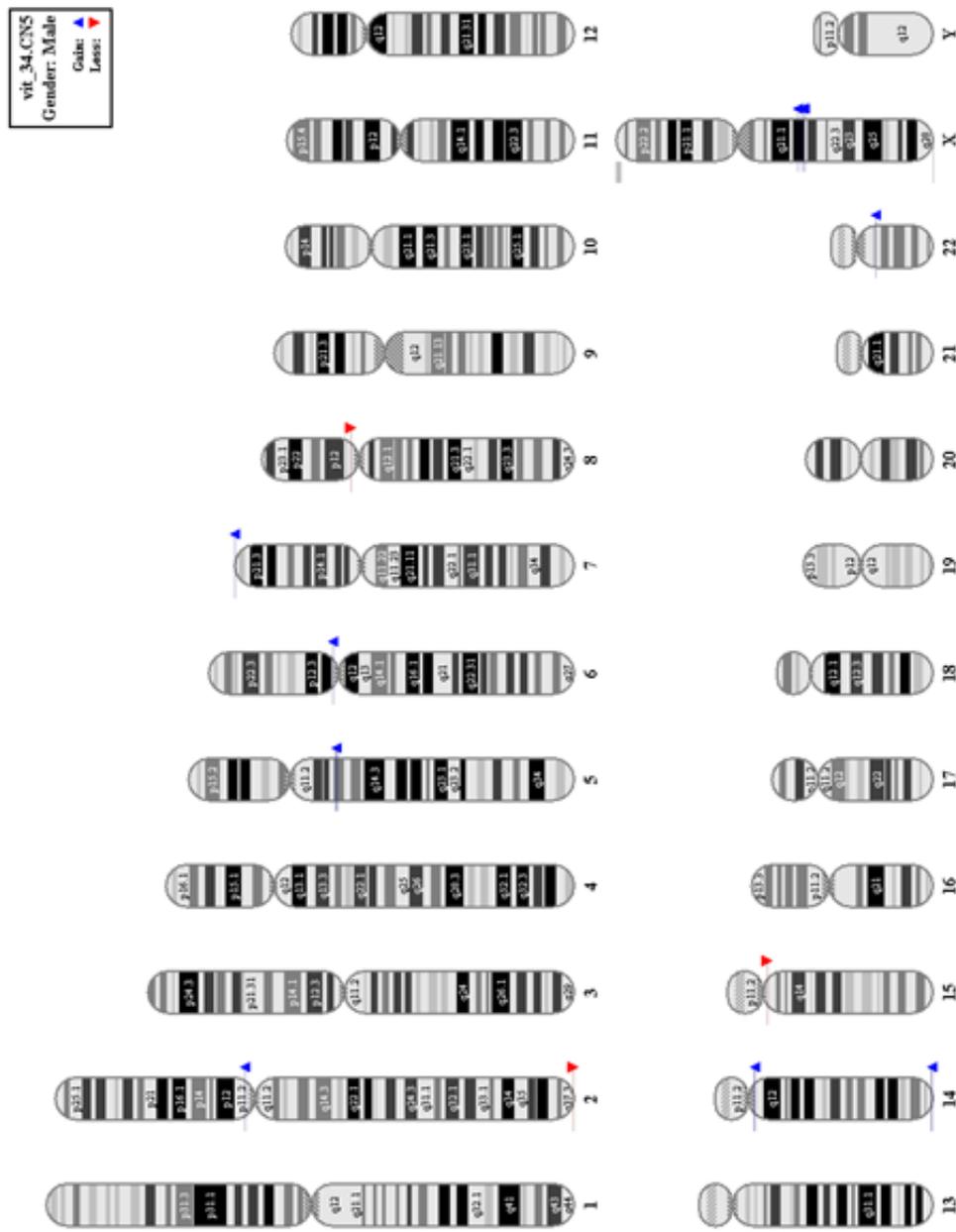


Figura 29: Imagen obtenida del análisis por cariotipo obtenido mediante Genotyping console. Ejemplo de imagen obtenida del estado de número de copias por cromosoma para una muestra de paciente con vitiligo donde se observan los segmentos ganados (en azul) y perdidos (en rojo).

Como parte de los análisis fueron obtenidas tablas con cada uno de los SNPs, indicándose su localización cromosómica, la posición que ocupa dentro del cromosoma, número de copias presentes, y en su caso, el gen al cual corresponde. Estos datos fueron exportados a Excel con la finalidad de analizar las alteraciones presentes.

En este análisis se obtuvieron 335 alteraciones, que involucraron genes o regiones cromosómicas, de las cuales 275 correspondieron a pérdidas y 60 a ganancias.

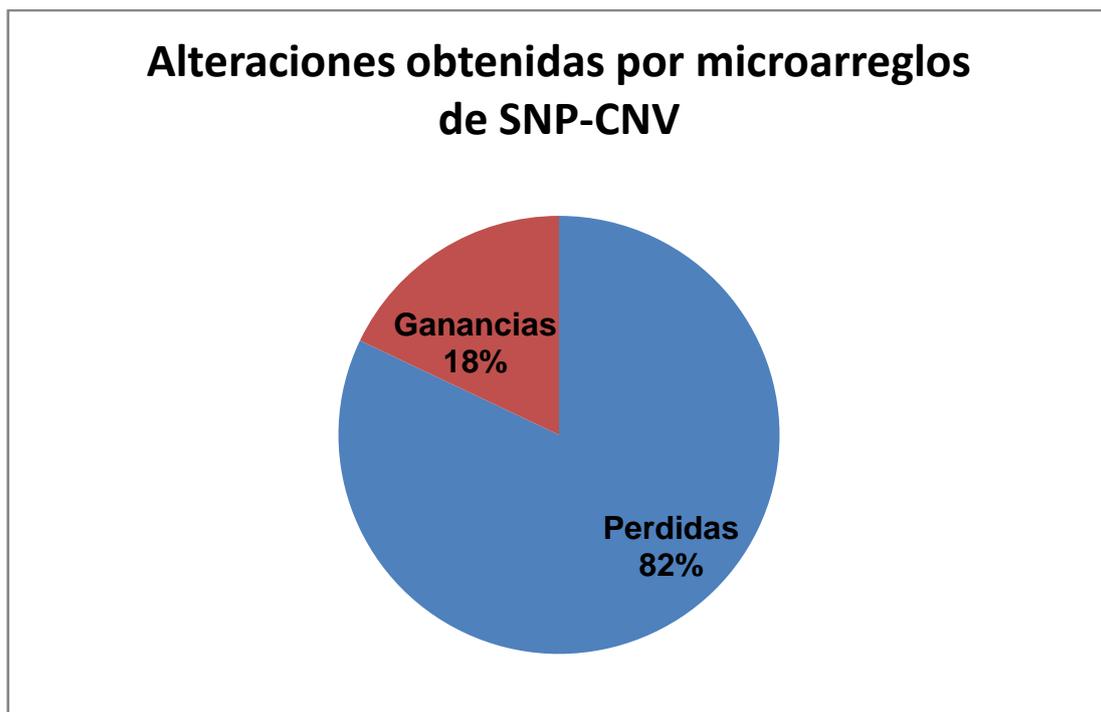


Figura 30. Alteraciones encontradas en las familias analizadas con microarreglos de SNP-CNV. Se obtuvieron alteraciones en 335 genes o regiones cromosómicas, siendo la mayoría pérdidas.

Al ordenar las alteraciones encontradas por cromosomas observamos que se encuentran CNVs en el total de cromosomas (22 autosómicos y 2 sexuales). Al analizar por separado tanto ganancias como pérdidas podemos observar que las pérdidas se pudo detectar que estaban presentes en los 22 cromosomas autosómicos y en sólo en uno de los cromosomas sexuales (cromosoma X). En cuanto a las duplicaciones, estas sólo estuvieron ausentes en los cromosomas autosómicos 6, 13 15 y 20. En éste caso se obtuvo duplicaciones en ambos cromosomas sexuales.

Dentro de las funciones que cumplen los genes para los cuales fue posible identificar alteraciones, se tienen:

- Pigmento, biosíntesis de melanina, peroxisomas (Ej. SLC24A2, SLC45A2, OCA2, HERC2)
- Membrana celular, transportadores iónicos, desarrollo del sistema nervioso (Ej. OCA2, GABRG3, SLC24A2, SLC45A2)
- Genes que participan en enfermedades: Artritis reumatoide (GTSM4), cáncer (SMYD3, CDC73, GTSM4), diabetes tipo 2 (F3).
- Sobrevida y crecimiento celular (Ej. PAK2)
- Supresor tumoral (Ej. Incrementos en EXT1)

Por otra parte, alteraciones en regiones amplias sólo fueron identificadas en 13 de los autosomas y en ambos de los cromosomas sexuales. Estas alteraciones involucraron deleciones y duplicaciones de cientos de pares de bases, así como también de exones completos de genes. Cuadro 17.

El análisis mediante la base de datos DAVID identifica dentro de las regiones amplias deletadas 7 grupos de genes involucrados en:

- Genes de antígenos preferencialmente expresadas en melanoma.
- Transporte, transporte de proteínas y establecimiento de localización proteica.
- Proteínas integrales de membrana, receptores, péptidos señales, regiones de transmembrana.
- Unión de nucleótidos, unión a ATP, unión a ribonucleótidos y nucleósidos.
- Receptores, fosfoproteínas y relacionadas con empalme alternativo.
- Proteínas del núcleo, factores de transcripción, transcripción y su regulación.
- Unión a metales, unión a iones.

Cuadro 17. Alteraciones identificadas por Microarreglos de SNP-CNVs que involucra regiones amplias.

CROMOSOMA	CN state-GEN-DELECIÓN	CN state-GEN-DUPLICACIÓN	N° de marc
1	CAMTA1		397kb-2
1	HNRNPCL1, PRAMEF2, 4, 5, 6, 7, 8, 10		296Kb-15
1	FCGR3A-B, FCGR2C-B		148kb
3		MUC4	1ex
8	MYST3		119kb-57
8	PRDM14		13ex
9	FAM27A		590kb-18, 661kb-24
10	MPHOSPH1		2ex
11		ODF3	2ex
12	ERBB3		7ex
12	MRPL42		10ex
14		NUBPL	11ex
15	POTE15		357kb-130, 1.12Mb-254
16	NOMO1, NPIP, PDXDC1		114kb-60
16	RUNDC2B, LOC23117		233kb-29
17		KIAA1267, ARL17, LRRC37A	186kb-93
17	KIAA1267, ARL17, LRRC37A, NSF		351kb-40
19	FLJ44894		117kb-66
19	LILRA6		16ex
19	FCAR		2ex
22	ACTBL1		371kb-27
22	KDEL3, DDX17		12ex
X	SLC6A14		3ex
Y		TMSB4Y	

En cuanto a las regiones duplicadas sólo se identificaron 7 genes:

- MUC4 (mucin 4): codifica a una proteína que participa en la protección de epitelios y puede estar relacionada con progresión de tumores.
- ODF3 (outer dense fiber of sperm tails 3): es un componente de las fibras externas densas de los flagelos de los espermios, que les da la rigidez, elasticidad y la protección contra fuerzas disruptoras durante su movimiento.
- NUBPL (nucleotide binding protein-like): codifica proteínas que son requeridas para el ensamble del complejo 1 de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa).
- KIAA1267: codifica a una proteína hipotética que interactúa con CCDC85B un represor transcripcional.
- ARL17 (ADP-ribosylation factor-like 17): codifica para una proteína de unión a GTP. Participa en el tráfico de proteínas.
- LRRC37A (leucine rich repeat containing 37)
- TMSB4Y (thymosin beta 4, Y-linked): su producto participa en la organización del citoesqueleto. Une y secuestra monómeros de actina y además inhibe su polimerización.

6.5. RESULTADOS OBJETIVO 5

6.5.1. Integración de datos e identificación de rutas de señalización

A partir de los resultados obtenidos del análisis clínico se pudo identificar que el tipo más común de vitiligo era el vulgar. Teniendo en cuenta esta información y considerando las características clínicas, demográficas y familiares, fueron seleccionadas las muestras para realizar los estudios de expresión y de identificación de genes candidatos.

De acuerdo a la agrupación de genes identificados mediante los arreglos de expresión, tanto de las comparaciones realizadas entre piel pigmentada de pacientes con vitiligo y controles, así como también entre lesiones de pacientes con vitiligo y controles, las rutas mayoritariamente comprometidas en vitiligo son las de: fosforilación oxidativa, pigmento, melanosomas, transporte de vesículas y procesamiento de mensajeros. En particular, el análisis realizado en la base de datos DAVID permite identificar que la primera agrupación de genes en piel pigmentada de pacientes es la relacionada con pigmento, vesículas y transporte, seguida por la una enriquecida en genes relacionados con la cadena transportadora de electrones y estrés oxidativo (cuadro 18). Este orden se invierte cuando son analizados los resultados de expresión obtenidos de la comparación de lesiones de vitiligo vs controles, pasando a primer plano la agrupación enriquecida por genes relacionados con la cadena transportadora de electrones y estrés oxidativo, seguido por la agrupación de genes cuya función está relacionada con la biosíntesis del pigmento, vesículas y transporte (cuadro 19).

Por otra parte, la validación mediante qPCR de los genes seleccionados de los estudios de expresión mediante microarreglos, permitió confirmar que, en un grupo de pacientes, se observa incrementos de los niveles del mensajero del gen TXN, posiblemente como respuesta a un incremento de ROS producido por defectos en la cadena transportadora de electrones⁷⁷. Además, se detectó aumento en la expresión de CTSL2, lo que puede estar asociado al desarrollo de procesos inflamatorios⁸⁰. Esto concuerda con el hecho de que algunos pacientes presentaron polimorfismo en la región promotora gen TNF α , lo que esté asociado a un incremento en la producción de TNF y al desarrollo de enfermedades inflamatorias⁸¹.

Cuadro 18. Agrupaciones funcionales iniciales identificadas por DAVID data base para piel sin lesión de pacientes con vitiligo. En el cuadro se presenta los resultados del primer grupo y parte del segundo grupo.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 7.64015512565659				
Term	Count	%	PValue	Fold Enrich.	Bonferroni	Benjamini
GO:0048770~pigment granule	20	6.51465798	2.14E-15	12.0687376	6.83E-13	6.83E-13
GO:0042470~melanosome	20	6.51465798	2.14E-15	12.0687376	6.83E-13	6.83E-13
GO:0016023~cytoplasmic membrane-bounded vesicle	26	8.46905537	3.23E-05	2.53882353	0.01040949	6.54E-04
GO:0031988~membrane-bounded vesicle	26	8.46905537	5.43E-05	2.45836785	0.01742619	0.00103357
GO:0031982~vesicle	28	9.12052117	1.20E-04	2.24442493	0.03805047	0.00215286
GO:0031410~cytoplasmic vesicle	27	8.79478827	1.50E-04	2.2586586	0.04736838	0.00242341
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 6.336259868703146				
Term	Count	%	PValue	Fold Enrich.	Bonferroni	Benjamini
respiratory chain	16	5.21172638	2.10E-13	14.4971501	7.31E-11	3.65E-11
hsa05012:Parkinson's disease	22	7.16612378	2.82E-12	6.82800293	3.27E-10	3.27E-10
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	29	9.44625407	6.02E-12	4.934618	1.03E-08	1.03E-08
mitochondrion inner membrane	20	6.51465798	1.79E-10	6.66643561	6.24E-08	1.56E-08
GO:0005740~mitochondrial envelope	31	10.0977199	2.01E-10	3.97346624	6.50E-08	3.25E-08
hsa00190:Oxidative phosphorylation	20	6.51465798	2.74E-10	6.11177885	3.18E-08	1.59E-08
hsa05010:Alzheimer's disease	22	7.16612378	3.24E-10	5.36186733	3.76E-08	1.25E-08
GO:0006119~oxidative phosphorylation	16	5.21172638	3.63E-10	8.69548449	6.19E-07	3.10E-07
electron transport	15	4.88599349	4.53E-10	9.64966555	1.58E-07	3.15E-08
GO:0005743~mitochondrial inner membrane	26	8.46905537	4.79E-10	4.56324491	1.55E-07	5.17E-08
GO:0070469~respiratory chain	14	4.56026059	1.01E-09	10.025098	3.27E-07	8.17E-08
GO:0044455~mitochondrial membrane part	17	5.53745928	1.22E-09	7.304	3.95E-07	7.90E-08

Cuadro19. Agrupaciones funcionales iniciales identificadas por DAVID data base para lesiones de pacientes con vitiligo. En el cuadro se presenta los resultados de parte del primer grupo y del segundo grupo.

Annotation Cluster 1 Enrichment Score: 15.185873016871161						
Term	Count	%	PValue	Fold Enrich.	Bonferroni	Benjamini
respiratory chain	30	7.02576112	5.29E-30	19.537175	2.24E-27	1.12E-27
GO:0005743~mitochondrial inner membrane	54	12.64637	3.39E-28	6.51921115	1.35E-25	1.35E-25
mitochondrion inner membrane	41	9.60187354	6.88E-28	9.82257623	2.91E-25	9.71E-26
GO:0019866~organelle inner membrane	55	12.8805621	1.60E-27	6.17574714	6.38E-25	3.19E-25
GO:0005740~mitochondrial envelope	60	14.0515222	2.06E-26	5.29005201	8.21E-24	2.74E-24
hsa05012:Parkinson's disease	40	9.3676815	1.43E-25	7.98523869	1.79E-23	1.79E-23
hsa00190:Oxidative phosphorylation	40	9.3676815	2.75E-25	7.86238887	3.43E-23	1.72E-23
GO:0031966~mitochondrial membrane	57	13.3489461	2.78E-25	5.34442945	1.11E-22	2.77E-23
mitochondrion	72	16.8618267	9.11E-24	4.00136372	3.85E-21	9.63E-22
GO:0044429~mitochondrial part	67	15.6908665	1.56E-23	4.15987759	6.22E-21	1.24E-21
GO:0031967~organelle envelope	67	15.6908665	1.55E-22	3.99214059	6.17E-20	1.03E-20
GO:0031975~envelope	67	15.6908665	1.85E-22	3.97930413	7.37E-20	1.05E-20
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	47	11.0070258	9.19E-22	5.65838725	1.66E-18	1.66E-18
Annotation Cluster 2 Enrichment Score: 8.25636374133129						
Term	Count	%	PValue	Fold Enrich.	Bonferroni	Benjamini
GO:0048770~pigment granule	23	5.38641686	1.25E-15	9.54685978	4.87E-13	4.06E-14
GO:0042470~melanosome	23	5.38641686	1.25E-15	9.54685978	4.87E-13	4.06E-14
GO:0016023~cytoplasmic membrane-bounded vesicle	35	8.19672131	5.72E-06	2.35086705	0.00227947	1.14E-04
GO:0031410~cytoplasmic vesicle	38	8.89929742	1.07E-05	2.18660976	0.00425425	1.85E-04
GO:0031988~membrane-bounded vesicle	35	8.19672131	1.13E-05	2.27636774	0.00449464	1.88E-04
GO:0031982~vesicle	38	8.89929742	2.71E-05	2.09522906	0.01074522	4.32E-04

A partir de los resultados de SNP-CNV se identificaron alteraciones en genes asociados con el pigmento, su biosíntesis y transporte, así como también en genes relacionados con el transporte de iones y desarrollo de enfermedades autoinmunes, fenómenos que concuerdan con los previamente detectados a través del análisis de expresión (figura 31).

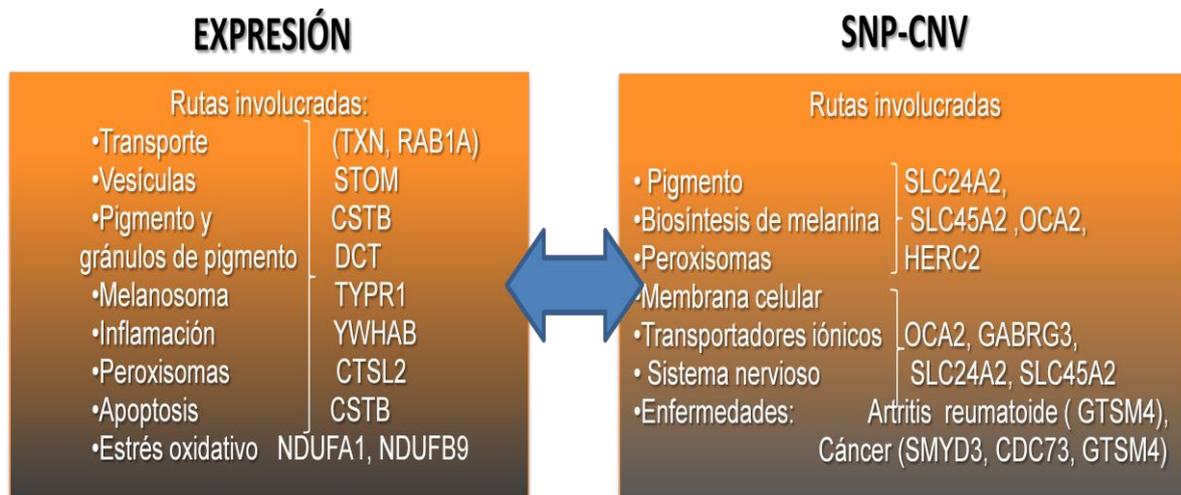


Figura 31. Semejanzas entre resultados de expresión y SNP-CNV. En la figura se muestran algunas de las rutas comunes obtenidas a partir del análisis bioinformático.

Si bien se han propuesto diferentes teorías para explicar las causas del vitiligo ⁵⁵, los resultados obtenidos apuntan a que en el grupo de muestras con Vitiligo vulgar analizado, pueda deberse a:

- Alteraciones en biosíntesis y transporte del pigmento.
- Estrés oxidativo
- Desarrollo de procesos inflamatorios

procesos que pueden ser integrados como se describe en la figura 32.

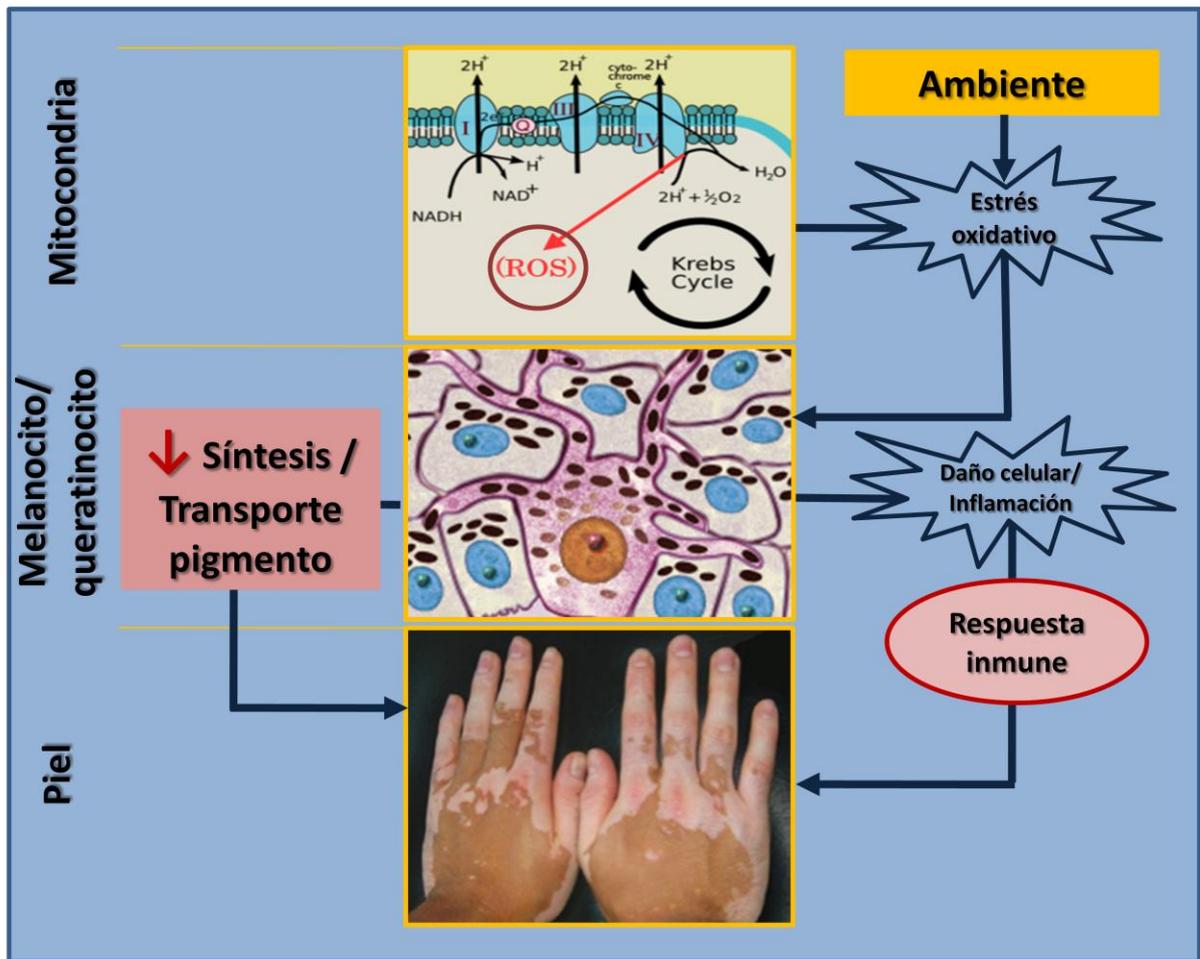


Figura 32. Procesos involucrados en el desarrollo de vitiligo. En la figura se muestran los procesos que presentaron alteraciones en las muestras analizadas.

CAPITULO VII

7. DISCUSIÓN

Existen diversos trabajos en los que se menciona la prevalencia del vitiligo a nivel mundial⁸⁵. En ellos se reportan valores variados, muchos basados en reportes publicados de hace décadas. Como se observa en el cuadro 1, en México los datos son escasos u obsoletos, y la mayoría representan valores adquiridos a partir de incidencia de la enfermedad en pacientes que asisten a clínicas dermatológicas del país o corresponden a extrapolación realizada de los porcentajes obtenidos para otras poblaciones y que no toma en cuenta el factor genético, cultural, medio ambiente, social y racial, por lo tanto no representan de manera exacta la magnitud de ésta enfermedad en nuestra Región.

Si bien los resultados reportados en este estudio no reflejan la realidad nacional, sino que representa las consultas de la enfermedad en la Clínica Dermatológica del Hospital Universitario “José E. González”, la información obtenida sobre la distribución por género y edad, y de los otros subtipos de vitiligo más frecuentes en la población afectada en estudio es similar a la descrita por diversos estudios^{72,82, 83, 84, 85}, con una mayor prevalencia del subtipo vulgar (88.8%).

Clínicamente fue común observar la presencia del fenómeno de Koebner, hasta en aproximadamente un tercio de los pacientes con vitiligo, el cual es una reacción que consiste en la aparición de nuevas máculas posteriores a una lesión o trauma sobre piel sana, como cortes, quemaduras, así como abrasión^{86,87}, siendo más frecuente este fenómeno en el subtipo vulgar, con 54 (27.3%) casos, lo cual podría ser un indicador de la progresión del vitiligo^{88, 89}.

Se encontró que para nuestra población, el riesgo de padecer vitiligo antes de los 30 años de edad, es mayor en aquellos individuos con algún antecedentes familiares de vitiligo hasta en 4o grado de parentesco (OR= 2.29; P= 0.0052). Esto concuerda con lo demostrado por Alzolibani⁹⁰.

Cabe destacar la existencia de un elevado porcentaje de pacientes que manifestaron algún evento estresante asociado al inicio de la patología. Si bien se

ha indicado como una de las posibles causas del vitiligo⁹¹, existen a la fecha pocos reportes que incluyan metodologías cualitativas y cuantitativas útiles para interpretar su participación en el inicio, mantención y reversión de esta etiopatogenia. En este estudio no se profundizó en el estado del paciente mediante el apoyo de un test cualitativo o cuantitativo que indicara con mayor precisión el estado emocional, psicológico o la presencia de alguna enfermedad psiquiátrica. Sin embargo para evitar múltiples interpretaciones de la condición de cada paciente, los resultados obtenidos fueron recopilados gracias a la intervención de un sólo médico encargado de la entrevista, quién únicamente registró el estado anímico actual y al momento de iniciarse la patología, según haya sido indicado por el paciente.

Dentro de las enfermedades conocidas con naturaleza autoinmune, comúnmente asociadas con vitiligo, las de origen tiroideo siguen siendo las más prevalentes (22.2%) en esta población. Las alteraciones tiroideas tienen mayor asociación (OR= 2.51; P= 0.007) en aquellos pacientes en los cuales el vitiligo comenzó después de los 30 años, esto podría reflejar el carácter autoinmune de la presentación en mayores de 30 años^{15, 92, 93}, siendo de importancia para un diagnóstico temprano y para la aplicación de un tratamiento apropiado.

En cuanto al análisis de expresión se eligieron 10 muestras para ser procesadas mediante microarreglos considerando la concentración de RNA total que presentaban, integridad, y que representaran en porcentajes iguales ambos tipos de vitiligo a comparar. A pesar de contar con un número ligeramente mayor de muestras candidatas, que cumplían con los requisitos para su análisis, se tenía como limitante en número de microarreglos para realizar este tipo de ensayo.

Las comparaciones de los perfiles de expresión fueron realizadas para ambas muestras provenientes de cada paciente, ente grupos distintos de vitiligo vulgar considerando como puntos de análisis la actividad de la enfermedad y, entre pacientes y controles. Para seleccionar los genes como potenciales marcadores fue considerado aquellos que presentaran alteraciones en sus patrones de expresión en al menos el 20% de las muestras analizadas, de acuerdo al algoritmo utilizado en Bioconductor.

Hasta la fecha, sólo se contaba con un estudio de expresión de vitiligo utilizando la tecnología de microarreglos⁹⁴ en el que fueron analizadas sólo 5 muestras de vitiligo vulgar mediante cultivo de melanocitos. Si bien los resultados de este trabajo corresponden a un pequeño número de muestras y no son representativos de las alteraciones esperadas in vivo considerando la piel como un todo, ya que representan las alteraciones de sólo un tipo celular cuyo patrón de expresión puede verse modificado por las condiciones de cultivo celular, se observan algunas similitudes en cuanto a las funciones de los genes identificados como involucrados en la enfermedad. Dentro de las funciones identificadas en los melanocitos destacan genes involucrados en su desarrollo, procesamiento intracelular y transporte de tirosinasa, enzima fundamental en la biosíntesis del pigmento, empaquetamiento y transporte de melanosomas, adhesión celular y finalmente procesamiento y presentación de antígenos. Además se señala que la respuesta autoinmune es un evento secundario causado por la función anormal del melanocito.

En esta tesis, dichas funciones también fueron identificadas como alteradas en magnitud similar a la observada con genes cuya función está relacionada a la cadena transportadora de electrones ya a mecanismos de control del estrés oxidativo, sin embargo, en el contexto biológico y estructural de la piel en el que el melanocito representa menos de una décima parte de las células de la epidermis, no cabe duda que los genes involucrados tanto en la síntesis del pigmento, como en su empaquetamiento y transporte sean de vital importancia.

Además, dentro de los resultados obtenidos fue posible identificar patrones de expresión alterados, en piel afectada como sana de pacientes, en genes relacionados con el Complejo mayor de histocompatibilidad humana clase 1, genes que previamente han sido descritos como involucrados en una serie de enfermedades autoinmunes y vitiligo^{3,44,95}. En particular se detectó alteraciones en el patrón de expresión de HLA-A y HLA-G localizados en el cromosoma 6p21.3, identificados dentro de los principales grupos caracterizados mediante la base de datos DAVID, lo que refuerza que la presencia de defectos en las rutas de procesamiento y presentación de antígenos en respuesta inmune antimelanocitos está participando tanto en el desarrollo como en la progresión del vitiligo. Estos genes previamente han sido descritos.

Por otra parte se identificaron resultados similares en genes localizados en la región en que se ha caracterizado AIS1 y AIRE, previamente descritos como asociada a vitiligo^{3,44}, entre los que se pueden destacar sterol carrier protein 2, proteína presente en peroxisomas y relacionada con el metabolismo de lípidos, en glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase) involucrada en el metabolismo energético y proliferación celular, y en el factor H del complemento que participa en la respuesta inmune, estos tres localizados en el cromosoma 1p32, y amyloid beta (A4) precursor protein descrita, localizada en el cromosoma 21q21.2-q21.3 como alteradas en enfermedades como alzheimer y amiloidosis cerebroarterial.

Luego del análisis de los genes que presentaron patrones de expresión diferencial, fue seleccionado un grupo de 8 genes de la ruta melanogénica y respuesta al estrés oxidativo para su validación. Además, fue incluido el gen TNF α posible candidato, que no fue encontrado diferencialmente expresado bajo nuestros criterios de selección.

Como resultado de los ensayos de validación se observó una tendencia a expresión diferencial en tres genes: TXN, TNF- α y CTSL2. Al comparar los niveles de expresión de las muestras contra el grupo control sano, sólo TXN resulta sobre expresado luego de aplicar la prueba estadística, con tendencia a formas activas de vitiligo vulgar, esto como posiblemente como respuesta al estrés oxidativo en un grupo de los pacientes analizados, pudiendo ser empleado como marcador pronóstico de la enfermedad.

Por otra parte, las alteraciones en los niveles de expresión de TNF α , pueden estar relacionado con su participación en la activación de la respuesta inmune, además se ha descrito que TNF induce indirectamente aumento en el estrés oxidativo y, al igual que en el caso de CTSL2, el número de muestras que presentó alteración en la expresión de este gen no fue el suficiente para considerarlo como un marcador de enfermedad o actividad de ésta con validez estadística.

Para el resto de los genes seleccionados fue imposible realizar su validación mediante qPCR, posiblemente debido a que los niveles de expresión para estos genes es lo suficientemente bajo en piel para escaparse a la sensibilidad de esta técnica en las condiciones de trabajo⁷¹.

En lo que respecta a los análisis moleculares, TNF α -308G/A sólo ha sido estudiado en otras dos poblaciones con resultados contrastantes entre ellos. Namian y cols. encontraron que el alelo TNF2 confiere un riesgo significativo para padecer vitiligo en población israelí⁹⁶. Yazici y cols. no observaron diferencias entre casos y controles en cuanto al riesgo que podría conferir TNF2 en vitiligo en población turca⁹⁷. TNF α -308G/A no había sido estudiado en población americana para esta enfermedad. En este trabajo no se encontró asociación entre vitiligo, considerando el total de tipos presentes en esta población, y el polimorfismo estudiado para TNF, pero fue encontrada una asociación interesante entre la forma activa de vitiligo vulgar y la presencia del alelo A en la posición -308 de TNF α ($P=0.0295$), lo que confiere un elevado O.R. de 2.0.

En cuanto a AIRE e IL-8, a pesar de encontrarse representados los alelos normales y polimórficos en la población, las frecuencias presentes en Casos y controles no presentan diferencia. El análisis estadístico indicó, en ambos casos, que la presencia del alelo polimórfico no confiere riesgo para el desarrollo de la enfermedad, y, a diferencia de lo observado con TNF, tampoco fue posible asociar su presencia con la actividad del vitiligo.

Los resultados obtenidos mediante el análisis por Genome-Wide Human SNP Array 6.0 permitieron detectar una serie de marcadores repartidos prácticamente por todo el genoma, detectados como ganancias y pérdidas, siendo porcentualmente más abundantes estas últimas. Dentro de estas alteraciones destacaron algunas relacionadas con genes involucrados con la pigmentación (del pelo, piel y ojos), enfermedades de naturaleza autoinmune y transporte, entre otros. Teniendo en cuenta el reducido número de familias incluidas en el trabajo, y dado que la mayoría de muestras presentaban la forma estable de la enfermedad, no fue posible identificar algún gen o región asociada con la actividad de la enfermedad.

Si bien a la fecha ya se cuenta con estudios genómicos amplios en vitiligo⁹⁸, no han sido reportados para esta población. Una de las regiones identificadas en este trabajo, y que ya ha sido descrito en poblaciones caucásicas y chinas, es la identificación de señales en la región correspondiente a MHC, sin embargo se hace

necesario aumentar el número de muestras para dar mayor validez a las observaciones.

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en México para esta enfermedad describen características demográficas y los parámetros que se encuentran alterados en los pacientes, y no se han enfocado a encontrar la etiología molecular y los factores genéticos que intervienen en la aparición y desarrollo de la enfermedad en esta población. Este trabajo es el primero realizado en población Mexicana que conjunta variables demográficas, clínicas y genéticas con la finalidad de identificar marcadores y genes que participan en el desarrollo/origen de la enfermedad con validez diagnóstica.

CAPITULO VIII

8. CONCLUSIONES

- La frecuencia y distribución de los diferentes tipos de vitiligo es similar a las reportadas en poblaciones a nivel mundial.
- Se destaca la presencia de antecedentes familiares, factores psicológicos, y enfermedades tiroideas asociadas. Estos juegan un papel muy importante en el inicio y progresión de la enfermedad.
- No se observan diferencias significativas entre los patrones de expresión de VVA vs VVE mediante microarreglos que puedan dar cuenta de la actividad de la enfermedad.
- Se detectaron niveles alterados de expresión entre casos y controles en genes de algunas de las siguientes rutas:
 - Metabolismo de la melanina, transporte de vesículas y citoesqueleto, respuesta inmune, estrés oxidativo, apoptosis, proteosoma, diferenciación y mantenimiento de los queratinocitos.
- Se observa sobre-expresión de TXN, posiblemente como respuesta al estrés oxidativo en un grupo de pacientes con vitiligo. Este incremento se presenta mayoritariamente en pacientes con VVA, pudiendo ser empleado como marcador pronóstico de la enfermedad.
- Por otra parte, las alteraciones en los niveles de expresión de TNF α pueden estar relacionados con su participación en la activación de la respuesta inmune; se ha descrito que TNF induce indirectamente aumento en el estrés oxidativo.
- El análisis por Genome-Wide Human SNP Array 6.0 permitió detectar una serie de alteraciones en genes relacionados con la pigmentación (del pelo, piel y ojos), enfermedades de naturaleza autoinmune y transporte, entre otros. Además se encuentran genes que comparten rutas comunes entre ambos tipos de microarreglos.

- La presencia del polimorfismo TNF -308G>A se asocia a un aumento en el riesgo a desarrollar formas activas de vitiligo vulgar ($p < 0.05$), pudiendo ser utilizado como un indicador de progresión de la enfermedad.
- Los resultados obtenidos confirman la participación de diferentes factores en el desarrollo del vitiligo:
 - Herencia
 - Estrés oxidativo
 - Alteraciones en rutas melanogénicas
 - Respuesta inmune.
- Estas rutas también se encuentran alteradas en piel sin lesiones de los pacientes, lo que refleja que en la piel sin lesión **hay daño** o cambios que eventualmente conducirán a la depigmentación.
- Lo que sugieren que la suma de todos estos eventos, tras una situación desencadenante sobre el individuo genéticamente predispuesto podrían promover cambios en la pigmentación de la piel que lo conducen, en última instancia, al vitiligo.

CAPITULO IX

9. PERSPECTIVAS

Es necesario analizar un mayor número de muestras para confirmar los resultados obtenidos, y compararlos con resultados de expresión por tiempo real realizados sobre melanocitos y/o melanoma, estos últimos como células hiperpigmentadas donde es factible detectar patrones de sobre expresión de genes de la ruta melanogénica..

Por otra parte sería interesante evaluar genes involucrados en otras rutas de vitiligo, identificadas con alteración mediante los ensayos de expresión (Apoptosis, respuesta inmune, activación de queratinocitos), y asociar las alteraciones descritas en vitiligo con otras enfermedades autoinmunes presentes en los pacientes (diabetes, hipertensión arterial, tiroiditis y cáncer, entre otras).

Debido a la gran cantidad de información generada mediante los análisis realizados por microarreglos, tanto expresión y como SNP, se hace necesario un análisis profundo para identificar nuevas rutas comunes relacionadas con esta enfermedad y que posiblemente pudieran ser útiles el pronóstico de esta patología

Desde el punto de vista de investigación, sería conveniente relacionar los patrones de metilación presentes en DNA de pacientes con vitiligo como factor epigenético involucrado en la regulación de la expresión génica y posiblemente asociado al desarrollo y/o progresión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Sehgal V and Srivastava G. Vitiligo: Compendium of clínico-epidemiological features. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2007; 73 (3) 149-156.
- ² Njoo MD, Spuls PI, Bos JD, Westerhof W and Bossuyt PMM. Nonsurgical Repigmentation Therapies in Vitiligo: Meta-analysis of the Literature. *Arch Dermatol*, 1998; 134: 1532 - 1540.
- ³ Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *J Dermatol Sci*, Jan 2006; 41(1): 3-10.
- ⁴ Vázquez-Martínez OT, Velásquez-Arenas L, Méndez-Olvera N and Ocampo-Candiani J. Vitiligo. Overview and current therapeutics. *DCMQ* 2006(3)
- ⁵ Steiner D, Bedin V, Brito M, Tadeu R and Steiner T. Vitiligo. *An bras Dermatol*, 2004; 79 (3): 335-351.
- ⁶ Davinder Parsad,¹ Sunil Dogra,¹ and Amrinder Jit Kanwar¹. Quality of life in patients with vitiligo. *Health Qual Life Outcomes*. 2003; 1: 58-63
- ⁷ Moretti S. Vitiligo. *Orphanet Encyclopedia*. October 2003. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-vitiligo.pdf>
- ⁸ Lerner AB, Nordlund JJ. Vitiligo: What is it? Is it important?. *J Am Med Assoc* 1978; 239:1183-1187.
- ⁹ Parsad D, Dogra S, Kanwar AJ. Quality of life in patients with vitiligo. *Health Qual Life Outcomes* 2003;1:58.
- ¹⁰ Alain Taïeb and Mauro Picardo The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force *Pigment Cell Res.*2007 20; 27–35.
- ¹¹ Halder RM, Chappell JL. Vitiligo update. *Semin Cutan Med Surg* 2009;28:86-92.
- ¹² Nordlund JJ, Majumder PP. Recent investigations on vitiligo vulgaris: advances in clinical research. *Dermatol Clin* 1997; 15:69-78.
- ¹³ Halder RM, Chappell JL. Vitiligo update. *Semin Cutan Med Surg* 2009;28:86-92.
- ¹⁴ Nordlund JJ, Majumder PP. Recent investigations on vitiligo vulgaris: advances in clinical research. *Dermatol Clin* 1997; 15:69-78.
- ¹⁵ Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010.
- ¹⁶ Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of Vitiligo. Epidemiological Survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol*. 1977;113(1):47-52.
- ¹⁷ Parsad D, Dogra S, Kanwar AJ. Quality of life in patients with vitiligo. *Health Qual Life Outcomes* 2003;1:58.
- ¹⁸ Ruiz Maldonado R. Epidemiología de las enfermedades de la piel en la ciudad de México, D.F. Tesis para Médico Cirujano. UNAM 1964.
- ¹⁹ Ruiz-Maldonado R, Tamayo Sánchez L, Velázquez E. Ruiz-Maldonado R, Tamayo Sánchez L, Velázquez E. Epidemiology of skin diseases in 10,000 patients of pediatric age. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1977 Jan-Feb;34(1):137-61.

-
- ²⁰ 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):96-98.
- ²¹ Arakawa A, Uber die Vitiligo. *Dermatologica* 1944, 84: 257-319.
- ²² Sehgal VN, Srivastava G. Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 May-Jun;73(3):149-56.
- ²³ Nordlund J and Lerner AB. Vitiligo. It is important. *Arch Dermatol* 118:5-8, 1982.
- ²⁴ Koga M and Tango T. Clinical features and course of type A and type B vitiligo. *Brit J Dermatol* 118:223-228, 1988.
- ²⁵ Hann S, Chang J, Lee H, and Kim S. The classification of segmental vitiligo on the face. *Yonsei Med J*, 2000; 41(2): 209-12.
- ²⁶ Njoo MD, Das PK, Bos JD, Westerhof W. Association of the Kobner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. *Arch Dermatol.* 1999;135:407-413
- ²⁷ Norris DA, Horikawa T, Morelli JG. Melanocyte destruction and repopulation in vitiligo [review]. *Pigment Cell Res.* 1994;7:193-203
- ²⁸ Zhang XJ, Chen JJ and Liu JB. The genetic concept of vitiligo. *J Dermatol Sci*, 2005; 39(3): 137-46.
- ²⁹ Huggins RH, Janusz CA and Schwartz RA. Vitiligo: a sign of systemic disease. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 2006; 72, 1: 68-71.
- ³⁰ Jin Y., Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR and Spritz RA. *NALP1* in Vitiligo-Associated Multiple Autoimmune Disease. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 1216 - 1225.
- ³¹ Ringold S, Glass TJ and Glass RM. Vitiligo. *JAMA*, 2005; 293: 762.
- ³² Sánchez L, Quincha M, Delgado M, Mendez M, Kumakawa H and Lanchipa P. VITILIGO DERMATOLOGÍA PERUANA 2002;12 N° 1 ENERO – JUNIO.
- ³³ Carsberg CJ, Warenus HM and Friedmann PS. Ultraviolet radiation-induced melanogenesis in human melanocytes. Effects of modulating protein kinase C. *J. Cell Sci.*, 1994; 107: 2591 - 2597.
- ³⁴ Mosher DB, Parrish JA and Fitzpatrick TB. Monobenzylether of hydroquinone. A retrospective study of treatment of 18 vitiligo patients and a review of the literature. *Brit J Dermatol* 97:669-679, 1977.
- ³⁵ McCurdy H., Enzyme localization during Melanogenesis. *J. Cell Biol.*, 1969; 43: 220 – 228.
- ³⁶ Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev*, 2004; 84: 1155 - 1228.
- ³⁷ Gillbro JM, Marles LK, Hibberts NA and Schallreuter KU. Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol*, 2004; 123(2): 346-53.
- ³⁸ Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL, Slominski A, Wei ET, Thody AJ, Tobin DJ and White A. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB J*, 2007; 21: 1844 - 1856.

-
- ³⁹Slominski A, Ermak G and Wortsman J. Modification of melanogenesis in cultured human melanoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999; 35(10): 564-5.
- ⁴⁰Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y and Imokawa G. Biphasic Expression of Two Paracrine Melanogenic Cytokines, Stem Cell Factor and Endothelin-1, in Ultraviolet B-Induced Human Melanogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2004; 165: 2099 - 2109.
- ⁴¹Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP and Ballotti R. Ultraviolet B Radiation Acts through the Nitric Oxide and cGMP Signal Transduction Pathway to Stimulate Melanogenesis in Human Melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 28052.
- ⁴²Radanovic´-Grguric´ L, Filakovic´ P, Barkic´ J, Mandic´ N, Karner I and Smoje J. Depression en pacientes con alteraciones del tiroides. *Eur. J. Psychiat.*, 2003; 17(3), 123-134.
- ⁴³Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, *et al.* Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994; 263:1444-1446,
- ⁴⁴Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Res*, 2007; 20(4): 271-8.
- ⁴⁵Tazi-Ahnini R, McDonagh AJ, Wengraf DA, Lovewell TR, Vasilopoulos Y, Messenger AG, Cork MJ and Gawkrödger DJ. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. *Br J Dermatol*, 2008; 159(3): 591-6.
- ⁴⁶Cucchi ML, Frattini P, Santagostino G, *et al.* Higher plasma catecholamine and metabolite levels in the early phase of nonsegmental vitiligo. *Pigment Cell Res*. 200; 13:28-32.
- ⁴⁷Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, *et al.* High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol* 1994; 74:120-123.
- ⁴⁸Ongenaë K, Van Geel N, Naeyaert JM. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* 2003; 16:90-100.
- ⁴⁹Al Badri AM. An immunohistochemical study of cutaneous lymphocytes in vitiligo. *J Pathol.* 1993; 170:149-155.
- ⁵⁰Van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, *et al.* Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest.* 2000; 80:1299-1309.
- ⁵¹Ogg GS, Dunbar PR, Romero P, *et al.* High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med.* 1998; 6:1203-1208.
- ⁵²Yee C, Thompson JA, Roche P, *et al.* Melanocyte destruction after antigenic-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of T cell mediated vitiligo. *J Exp Med.* 2001; 192:1637-1643.
- ⁵³Strömberg S, Bjorklund MG, Asplund A, Rimini R, Lundeberg J, Nilsson P, Ponten F and Olsson MJ. Transcriptional profiling of melanocytes from patients with vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21(2): 162-71.
- ⁵⁴Zhang X, Liu J, Gui J, Li M, Xiong Q, Wu H, Li J, Yang S, Wang H, Gao M, Yang J, and Yang Q. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*, Sep 2004; 51(3): 383-90.
- ⁵⁵Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, Talbert J, Uhlhorn C, Taylor M, *et al.* Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. *Hum Mol Genet* 2002;11:661e7.

-
- ⁵⁶ Fain PR, Gowan K, LaBerge GS, Alkhateeb A, Stetler GL, Talbert J, et al. A genomewide screen for generalized vitiligo: confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2003;72:1560e4.
- ⁵⁷ Spritz RA, Gowan K, Bennett DC, Fain PR. Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. *Am J Hum Genet* 2004;74:188e91.
- ⁵⁸ Chen J, Huang W, Gui J, Yang S, Zhou F, Xiong Q, Wu H, Cui Y, Gao M, Li W, Li J, Yan K, Yuan W, Xu S, Liu J and Zhang X. A novel linkage to generalized vitiligo on 4q13-q21 identified in a genomewide linkage analysis of Chinese families. *Am J Hum Genet*, 2005; 76: 1057-1065.
- ⁵⁹ de Vijlder HC, Westerhof W, Schreuder GM, de Lange P, Claas FH. Difference in pathogenesis between vitiligo vulgaris and halo nevi associated with vitiligo is supported by an HLA association study. *Pigment Cell Res* 2004 Jun;17(3):270-4
- ⁶⁰ Passeron T and Orthonne JP. Physiopathology and genetics of Vitiligo. *Journal of autoimmunity* 2005, 25: 63-68.
- ⁶¹ Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, et al. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res*. 2003; 16:208-214.
- ⁶² Chodorowska G, Bartosińska J, Dąbrowska-Członka M, Wawrzycki B and Wojnowska D. Involvement of immunological factors in the pathogenesis of vitiligo. *ANNALES Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin–Polonia* vol. Ixii, n 1, 36 sect io d 2007.
- ⁶³ Bystryń JC. Immune mechanisms in vitiligo. *Clin Dermatol*. 1997; 15:853-861.
- ⁶⁴ Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007 22;356(12):1216-25.
- ⁶⁵ Teng L, Mundell N, Frist A, Wang Q, and Labosky P. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. *Development*, 2008; 135: 1615 – 1624.
- ⁶⁶ Hochstein P, Cohen G. The cytotoxicity of melanin precursors. *Ann N Y Acad Sci* 1963;100:876–881
- ⁶⁷ Riley PA. Mechanisms of inhibition of melanin pigmentation. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P, eds. *The Pigmentary System. Physiology and Pathophysiology*. New York: Oxford University Press; 1998. pp. 401–421.
- ⁶⁸ Raymond E. Boissy and Prashiela Manga. On the Etiology of Contact/Occupational Vitiligo *Pigment Cell Res* 2004, 17: 208–214.
- ⁶⁹ Seung-Kyung Hann MD, James J. Nordlund MD, Aaron B. Lerner. Chapter 19. Biochemical Theory of Vitiligo: a Role of Pteridines in Pigmentation. *Vitiligo: A Monograph on the Basic and Clinical Science*. 2000.
- ⁷⁰ Rebat M. Halder, MD, and Johnathan L. Chappell, MD, Vitiligo Update, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2009, 28(2): 86-92.
- ⁷¹ Kingo K, Aunin E, Karelson M, Philips M, Rätsep R, Silm H, Vasar E, Soomets U and Koks S. Gene expression analysis of melanocortin system in vitiligo. *Journal of dermatological science* 2007, 48(2):113-122
- ⁷² Kingo K, Aunin E, Karelson M, Rätsep R, Silm H, Vasar E and Kõks S. Expressional changes in the intracellular melanogenesis pathways and their possible role in the pathogenesis of vitiligo. *J Dermatol Sci*. 2008 Oct;52(1):39-46. Epub 2008 Jun 2.

-
- ⁷³ Lucchese A, Willers J, Mittelman A, Kanduc D and Dummer R. Proteomic Scan for Tyrosinase Peptide Antigenic Pattern in Vitiligo and Melanoma: Role of Sequence Similarity and HLA-DR1 Affinity. *J. Immunol.* 2005; 175: 7009 – 7020
- ⁷⁴ Le Poole IC and Luiten RM. Autoimmune etiology of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmun*, 2008; 10: 227-43.
- ⁷⁵ Chen YP, Pfab T, Slowinski T, Richte CM, Godes M and Hocher B. Impact of genetic variation of tumor necrosis factor- α on gestational hypertension. *Chin. Med. J.* 2006, 119:719-724.
- ⁷⁶ Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994 Nov 4;269(44):27670-8.
- ⁷⁷ Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005 Mar;14(2):149-53.
- ⁷⁸ Nannan Chen, Miri Seiberg and Connie B Lin. Cathepsin L2 Levels Inversely Correlate with Skin Color. *Journal of Investigative Dermatology* (2006) 126, 2345–2347.
- ⁷⁹ Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E, López-Otín C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;58(8):1624-30.
- ⁸⁰ Helske S, Syväranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oörni K, Mäyränpää MI, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1791-8.
- ⁸¹ Liz-Grana M, Gomez-Reino Carnota J: Tumor Necrosis Factor. Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16:140 - 9
- ⁸² Akrem J, Baroudi A, Aichi T, Houch F, Hamdaoui MH. Profile of vitiligo in the south of Tunisia. *Int J Dermatol* 2008;47:670-4.
- ⁸³ Kyriakis KP, Palamaras I, Tsele E, Michailides C, Terzoudi S. Case detection rates of vitiligo by gender and age. *Int J Dermatol* 2009;48:328-9.
- ⁸⁴ Handa S, Kaur I. Vitiligo: clinical findings in 1436 patients. *J Dermatol* 1999;26:653-7.
- ⁸⁵ Arycan O, Koc K, Ersoy L. Clinical characteristics in 113 Turkish vitiligo patients. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2008;17:129-32.
- ⁸⁶ Levine EL, Ribeiro GG. Vitiligo and radiotherapy: the Koebner phenomenon demonstrated in patients with vitiligo undergoing radiotherapy for carcinoma of the breast. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1994;6:133-4.
- ⁸⁷ Jaigirdar MQ, Alam SM, Maidul AZ. Clinical presentation of vitiligo. *Mymensingh Med J* 2002;11:79-81.
- ⁸⁸ Hann SK, Chun WH, Park YK. Clinical characteristics of progressive vitiligo. *Int J Dermatol* 1997;36:353-5.
- ⁸⁹ Dave S, Thappa DM, Dsouza M. Clinical predictors of outcome in vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2002;68:323-5.
- ⁹⁰ Alzolibani A. Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of Saudi Arabia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2009;18:119-25.
- ⁹¹ Papadopoulos L, Bor R, Legg C, Hawk JL. Impact of life events on the onset of vitiligo in adults: preliminary evidence for a psychological dimension in aetiology. *Clin Exp Dermatol* 1998; 23: 243-8.
- ⁹² Mason CP, Gawkrödger DJ. Vitiligo presentation in adults. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:344-5.
- ⁹³ Cho SB, Kim JH, Cho S, Park JM, Park YK, Oh SH. Vitiligo in children and adolescents: association with thyroid dysfunction. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010.

⁹⁴ Strömberg S, Björklund MG, Asplund A, Rimini R, Lundeberg J, Nilsson P, Pontén F, Olsson MJ. Transcriptional profiling of melanocytes from patients with vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Apr;21(2):162-71.

⁹⁵ C B Casp, J-X She and W T McCormack. Genes of the *LMP/TAP* cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. *Genes and Immunity* (2003) 4, 492–499. doi:10.1038/sj.gene.6364016

⁹⁶ Namian AM, Shahbaz S, Salmanpoor R, Namazi MR, Dehghani F, Kamali-Sarvestani E. Association of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with susceptibility to vitiligo in Iranian patients. *Arch Dermatol Res* 2009;301:21-5.

⁹⁷ Yazici AC, Erdal ME, Kaya TI, et al. Lack of association with TNF-alpha-308 promoter polymorphism in patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res* 2006;298:46-9.

⁹⁸ Spritz RA. Six Decades of Vitiligo Genetics: Genome-Wide Studies Provide Insights into Autoimmune Pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct 13. [Epub ahead of print].

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL
ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PACIENTES CON VITILIGO**

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

DIRECCIÓN DEL(OS) CENTRO(S) DE ESTUDIO: Hospital Universitario “Dr. José E. González” Av. Madero y Gonzalitos S/N esq. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, CP 64460, Monterrey, Nuevo León, México.

NÚMERO(S) DE TELÉFONO EN HORAS DE OFICINA Y DESPUÉS DE HORAS HÁBILES: 83 48 14 65

PROPÓSITO DEL PROYECTO

Se le está solicitando su participación en un estudio de investigación sobre marcadores de Vitiligo (sustancias de sangre o tejidos que pueden indicar la presencia del Vitiligo). En este estudio deseamos examinar muestras biológicas (sangre, orina, saliva y piel) en personas que presentan Vitiligo en sus distintas modalidades.

OBJETIVO

El objetivo de esta forma de consentimiento es darle información a fin de que usted pueda decidir si quiere proporcionar información de salud muestras biológicas adicionales para la investigación de marcadores proteicos y genéticos de vitiligo y para otras investigaciones relacionadas. El doctor del estudio coleccionará la muestra y la información, con la finalidad de generar un Banco de Muestras y Datos, mantenidos bajo estricta confidencialidad conjuntamente en el Departamento de Dermatología y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

ANTECEDENTES

El estudio tiene dos objetivos. El primer objetivo es correlacionar el perfil hormonal, genético y de expresión asociado a las características clínicas observadas en pacientes con vitiligo. El segundo objetivo es identificar marcadores que permitan predecir e influir en el diseño de un tratamiento óptimo.

El vitiligo es un desorden específico de la piel que puede ser congénito o adquirido, el cual afecta a los melanocitos (células de la piel encargadas de la producción de melanina). Las causas del vitiligo son complejas y aún no se han comprendido en su totalidad. Tradicionalmente se han formulado una serie de teorías para explicar el vitiligo, considerando, para dicho efecto, 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. La identificación de estos factores es de gran importancia tanto para la prevención así como para desarrollar mejores y orientadas terapias de este padecimiento.

Dependiendo del tipo de vitiligo se han sugerido serie tratamientos alternativos, tanto médicos como quirúrgicos (Tratamiento con corticoides tópicos y orales, Fototerapia, Transplante 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 sensitivos y específicos para el diagnóstico de la enfermedad, y que nos permitan determinar si existe relación entre ellos y el curso clínico de ésta. Eventualmente los hallazgos de esta investigación pudieran conducir al desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento más personalizado.

Para lograr esto, nosotros estudiaremos tejidos dérmico, sangre, orina y saliva para identificar genes y proteínas que están presentes en niveles alterados (altos o bajos) en el Vitiligo, e identificaremos aquellos que pueden progresar muy lentamente y a aquellos que progresan muy rápidamente durante el transcurso de la enfermedad.

Las células en el cuerpo humano, como las provenientes de tejido dérmico y sangre, contienen genes compuestos de ácido desoxirribonucleico (ADN), y proteínas, compuestos que median la función de un gen. Éstas 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.

PROCEDIMIENTO

Si usted acepta participar en este proyecto de investigación, no se afectará de manera absoluta el tratamiento médico que se le recomiende o su elección de médico para realizar el tratamiento. Nosotros obtendremos de usted la siguiente información y las siguientes muestras biológicas:

Información Demográfica: Se le solicitará la siguiente información: fecha de nacimiento, historia 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, su peso y sus perímetros de cintura y cadera.

Se le solicitará que complete un cuestionario que se llenará en un tiempo de 30 a 45 minutos.

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).

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 es adicional a cualquiera de las muestras de sangre que se le extraigan para los fines de su atención médica o para el ensayo clínico principal.

Se le recolectará una muestra de orina (1 a 2 onzas) en un recipiente plástico. En caso de ser necesario se le solicitará una muestra de piel de no más de 1cm de diámetro, una de la zona afectada por el vitiligo (despigmentada) y otra de tejido sano (pigmentada, sin vitiligo). Estas muestras serán almacenadas en el Banco de Muestras y Datos. Los tejidos estarán disponibles sólo para este estudio, en los que serán determinados los mejores marcadores para el diagnóstico y pronóstico del Vitiligo.

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.

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.

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.

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

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.

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.

Algunos de los estudios de investigación podrán incluir análisis genéticos de sus muestras. Debido a que el almacenamiento de tejidos y otras muestras biológicas para futuras pruebas genéticas aun está en desarrollo, los riesgos de las pruebas genéticas aun son desconocidos. Con el uso de la nueva tecnología, la información de la estructura de su DNA (información genética) puede ser utilizada para determinar el riesgo de sufrir ciertas enfermedades. Esta información genética es única y podría indicar cambios en su estado de salud futura o en su expectativa de vida o la de sus hijos y familiares. Algunos descubrimientos pueden generar inquietud y causar dificultades psicológicas o problemas familiares. También es posible que durante la investigación se encuentre que personas de su mismo origen étnico tengan un riesgo incrementado para ciertas enfermedades. Esto podría generar marcas para su grupo étnico o cultural. La disponibilidad de esta información puede producir discriminación o dificultades para obtener seguros de salud y de vida y para el empleo. Los riesgos señalados anteriormente pueden ocurrir si se rompe la confidencialidad de los datos. Debido a las consecuencias de romper la confidencialidad, NOSOTROS HAREMOS TODOS LOS ESFUERZOS POSIBLES PARA PROTEGER SU PRIVACIDAD. Los datos estarán almacenados en un banco de datos protegido con clave de acceso secreta. Las computadoras se alojarán en la misma sala donde se almacenen las muestras. Todos los papeles y formas asociadas con las muestras estarán almacenados en archiveros con llave y el acceso a la sala donde están las muestras y los archiveros estarán restringidos exclusivamente al personal que labore en esa área. La política del encargado del Banco de Muestras y Datos es la de entregar tejidos identificados con el número de código a los investigadores que soliciten muestras, ya sea en la misma muestra o en una forma adjunta (su nombre y su identificación no serán revelados ni informados en las muestras). La información clínica pertinente a la muestra como la edad, la raza y el diagnóstico solo estarán disponibles de una manera codificada.

También es posible que se utilice información clínica de las muestras, a la cual se le 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.

No se le notificará el momento en que se realice investigaciones adicionales, y no se obtendrá consentimiento informado adicional de usted. La investigación adicional estará limitada por la información

original de salud que sea colectada en la forma de reporte de caso durante el ensayo clínico principal y que haya sido discutida en este consentimiento informado.

Costos:

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

Nuevos hallazgos:

Se le proporcionarán todos los nuevos hallazgos, descubiertos durante el curso de este estudio de investigación, que pudieran cambiar su decisión de participar en esta enmienda cuando estén disponibles.

Retiro del consentimiento y destrucción de las muestras:

Usted podría retirar este consentimiento y terminar su participación en la investigación de ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PACIENTES CON VITILIGO 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 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 de farmacogenética o si sufriera alguna lesión causada por el procedimiento de colección de la muestra, usted deberá contactar al médico responsable del proyecto en el número telefónico indicado en la primera página.

Si tuviera alguna pregunta acerca de sus derechos como sujeto del estudio, deberá contactar a

REPRESENTANTE DEL COMITE: Dr. José Gerardo Garza Leal (Secretario de Investigación del Área Clínica / Presidente del Comité de Ética)

CENTRO / HOSPITAL DEL ESTUDIO: Subdirección de Investigación- Planta Baja de la Biblioteca de la Facultad de Medicina del Hospital Universitario “Dr. José E. González”

NÚMERO(S) DE TELÉFONO: 83-29-40-50 Extensión 2870 a la 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/de salud 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 ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE PACIENTES CON VITILIGO como se describe arriba. Entiendo que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.

ENTIENDO QUE ESTOY EN MI DERECHO DE SOLICITAR CUALQUIER ACLARACIÓN Y OBTENER INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN QUE SOLICITE EN CUALQUIER MOMENTO DEL DESARROLLO DE LA MISMA. ADEMÁS, ENTIENDO QUE ESTOY EN LA LIBERTAD DE RETIRARME EN EL MOMENTO QUE DESEE Y

SI TOMO ESTA DECISIÓN NO ME AFECTARÁ EN FUTUROS TRATAMIENTOS QUE REQUIERA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO.

ENTIENDO QUE LA INFORMACIÓN OBTENIDA DE LA INVESTIGACIÓN SERÁ MANEJADA EN FORMA CONFIDENCIAL Y QUE EN NINGUN MOMENTO SE VIOLARÁ MI PRIVACIDAD.

ADEMÁS, EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA U.A.N.L., ESTARÁ EN LA DISPOSICIÓN DE BRINDARME TRATAMIENTO MÉDICO O QUIRÚRGICO SIN COSTO, EN CASO DE QUE RESULTARA DAÑO DIRECTAMENTE POR CUALQUIERA DE LOS PROCEDIMIENTOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, Y EN CASO DE DAÑO PERMANENTE, TENDRÉ DERECHO A SER INDEMNIZADO DE ACUERDO AL DAÑO SUFRIDO.

SU FIRMA INDICA QUE USTED HA DECIDIDO TOMAR PARTE EN ESTE PROYECTO Y QUE HA LEIDO Y ENTENDIDO LA INFORMACIÓN PROPORCIONADA Y EXPLICADA PERSONALMENTE.

NOMBRE DEL SUJETO

FECHA

FIRMA DEL SUJETO

NOMBRE Y FIRMA DE LOS PADRES/TUTOR (Si aplica)

NOMBRE DE LA MADRE

FECHA

FIRMA DE LA MADRE

NOMBRE DEL PADRE

FECHA

FIRMA DEL PADRE

NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL

FECHA

FIRMA DEL REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE DEL INVESTIGADOR

FECHA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

NOMBRE Y FIRMA DE LOS TESTIGOS

NOMBRE DEL PRIMER TESTIGO

FECHA

FIRMA DEL TESTIGO

Dirección del primer testigo _____

Relación con el paciente _____

NOMBRE DEL SEGUNDO TESTIGO

FECHA

FIRMA DEL TESTIGO

Dirección del segundo testigo _____

Relación con el paciente _____

Registro: _____

Grupo: 1 2

Fecha: _____

HOSPITAL UNIVERSITARIO "JOSÉ ELUTERIO GONZÁLEZ"
Departamento de Dermatología
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Unidad de Diagnóstico Molecular, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

PROTOCOLO: "GENES CANDIDATOS EN VITILIGO"

FICHA DE IDENTIFICACIÓN

Nombre: _____

Edad: _____ Género: _____ Fecha de Nacimiento: _____

Lugar de Nacimiento: _____ Nacionalidad: _____

FICHA DE CONTACTO

Dirección: _____ Colonia: _____

Ciudad: _____ Estado: _____ C.P.: _____

Teléfono: _____ Celular: _____

E-mail: _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS (Marcar con una X en caso de positivo; especificar evolución)

Alcoholismo Tabaquismo Drogas

ANTECEDENTES MÉDICOS PERSONALES Y HEREDOFAMILIARES
 (Marcar con una X, si ha padecido alguna de las siguientes patologías, y especificar tiempo de evolución y tratamiento. En el caso del familiar especificar el parentesco.)

<u>Patología</u>	<u>Paciente</u>	<u>Familiar</u>
• Alopecia Areata	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Tiroiditis Autoinmune	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Diabetes	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Dermatitis Atópica	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Asma Alérgica	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• HTA	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Insuf. Renal, Suprarenal y/o Enf. Adison	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____

ANTECEDENTES MÉDICOS PERSONALES Y HEREDOFAMILIARES

(Marcar con una X, si ha padecido alguna de las siguientes patologías, y especificar tiempo de evolución y tratamiento. En el caso del familiar especificar el parentesco. En "Otras", especificar patología(s).)

<u>Patología</u>	<u>Paciente</u>	<u>Familiar</u>
• Oftalmopatía (Uveitis)	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Lupus Eritematoso	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Miastenia Gravis	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Anemia Perniciosa	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Artritis Reumatoide	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Hepatitis Crónica Activa	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Colitis Ulcerosa	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Enfermedad de Crohn	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____
• Otras	<input type="radio"/> _____	<input type="radio"/> _____

ANTECEDENTES DE VITILIGO

¿Es la primera ocasión que presenta esta enfermedad?

SÍ NO

Edad de Presentación:

Tiempo de la Primera Presentación:

Número de ocasiones previas en las que se han reactivado las lesiones:

Fecha y/o Tiempo en el que se presentó por última vez:

Fecha y/o Duración de la presentación actual:

Número de Lesiones Activas Actuales:

Motivo por el cual decidió acudir a consultar: _____

TERAPÉUTICA PREVIA EMPLEADA

(Marcar con una **X** la respuesta al tratamiento en base a la repigmentación de lesiones previas, y mencionar las zonas donde se refiera mejoría en base al tratamiento. En "Otros", especificar también el nombre del tratamiento; en caso de haber empleado terapia anti-estrés, mencionarla como "Apoyo psicológico".)

Tratamiento	Tiempo Empleado	Repigmentación	Zona(s)
• Esteroides Tópicos	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Esteroides Intralesionales	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Esteroides Orales	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• PUVA	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Difenilciclopropeno/DCP	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Zinc	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Tacrolimo	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Dapsone	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Minoxidil	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
• Otros	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
_____	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____
_____	_____	SÍ <input type="radio"/> NO <input type="radio"/>	_____

PADECIMIENTO, EVOLUCIÓN Y ESTADO ACTUAL

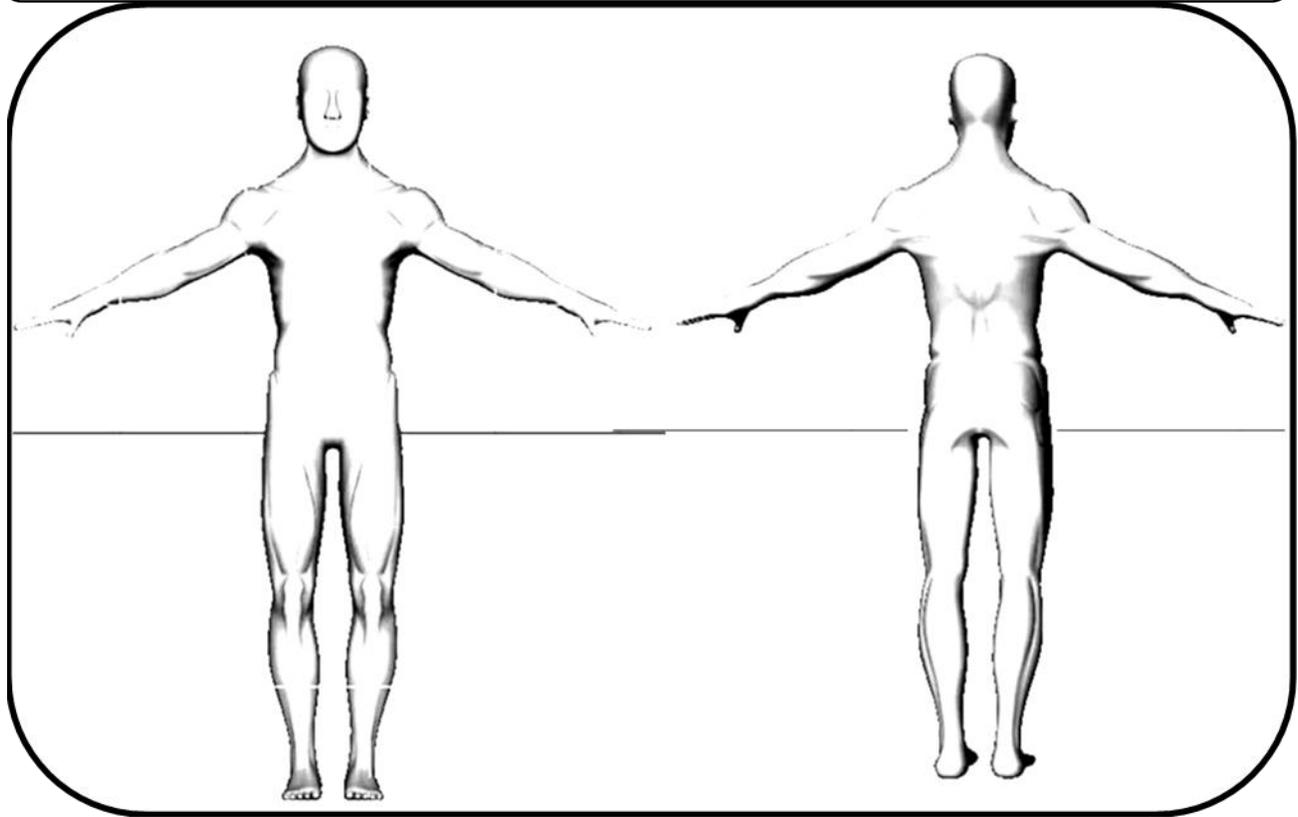
¿Hay algún factor Estresante actualmente?

SÍ NO

Describe: _____

EXPLORACIÓN FÍSICA

(Señale sólo el sitio anatómico de las lesiones acrómicas observadas compatibles con Vitiligo.)



GENEALOGÍA

Use para familiares de género masculino y para familiares de género femenino. En caso de sufrir de Vitiligo, rellenar la figura correspondiente. Anote el lugar de nacimiento y la nacionalidad para cada uno, y enfermedades que presente.