



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Programa de Doctorado en Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina



FACTORES INMUNOLÓGICOS Y PSICOLOGICOS Y EFECTO DEL
TRATAMIENTO EN PACIENTES CON VITILIGO

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma
de Barcelona, Barcelona 2018

Jaime Piquero Casals

Director de la tesis: AGUSTÍN ALOMAR MUNTAÑOLA

Director de la tesis: LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Tutor de la tesis: LUIS PUIG SANZ

Hospital De la Santa Creu i Sant Pau

A Romina, Andrea, Gabriela y Pablo

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr Agustín Alomar**, profesor jubilado ex Director del servicio de Dermatología del Hospital de Sant Pau, Director de la tesis doctoral, por la confianza depositada y por todos los conocimientos, generosidad y apoyo que me ha dado en mi estadía en Barcelona.

Al **Dr Lluís Puig**, Director de Servicio de Dermatología del Hospital Sant Pau, tutor de la tesis doctoral, por haberme aceptado en su servicio y orientarme para la realización de este proyecto.

A la **Dra Laura Martínez**, adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital Sant Pau, directora de la tesis doctoral, por todo el trabajo aportado en la realización de este proyecto, la puesta a punto de los diferentes reactivos y pruebas para el estudio. Este trabajo lo hicimos los dos.

Al **Dr Eduardo Rozas**, adjunto del Servicio de Dermatología del Hospital Sant Pau, por su apoyo constante y por la atención periódica de los pacientes de este estudio, y sobre todo, por su amistad.

A la **Dra Sandra Ros**, psicóloga adjunto del Servicio de Dermatología del Hospital Sant Pau, por la realización y análisis de los instrumentos psicométricos de esta tesis.

Al **Dr Candido Juarez**, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Sant Pau, por ayudar a idear el proyecto y su contribución en el desarrollo del mismo.

A la **Dra. Claudia Erika Delgado**, Asociada médica Laboral, encargada del CEIC del Hospital de Sant Pau, por su ayuda y correcciones para el desarrollo del protocolo.

Al **Dr Ignasi Gich**, médico estadístico adjunto del Servicio de Epidemiología Clínica y Salud Pública del Hospital de Sant Pau, por la disponibilidad y contribución en el análisis estadístico e interpretación de los resultados de este trabajo.

A **CantabriaLabs**, por el apoyo financiero para la compra de reactivos para el estudio serológico de esta tesis doctoral.

A mi **familia** especialmente mi esposa y mis padres, por el gran apoyo recibido durante toda mi etapa académica y profesional, por estar conmigo en los buenos y sobre todo en los malos momentos, son mis grandes maestros en mi formación profesional.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
SUMMARY	13
RESUMEN	15
1 INTRODUCCIÓN	19
1.1 Epidemiología y consideraciones generales	23
1.2 Genética en vitiligo	24
1.3 Estrés celular en los melanocitos e Inmunidad en vitiligo	24
1.4 Características clínicas	29
1.5 Clasificación de vitiligo/ Nomenclatura	30
1.5.1 Vitiligo / vitiligo no segmentario	31
1.5.2 Vitiligo segmentario	32
1.6 Diagnóstico	32
1.7 Trastornos asociados con vitiligo	34
1.8 Diagnóstico diferencial	35
1.9 Tratamiento del vitiligo	36
1.9.1 Tratamiento tópico.....	38
1.9.2 Tratamiento sistémico	40
1.9.3 Tratamiento quirúrgico	43
1.9.4 Otros procedimientos en consultorio	44
1.9.5 Terapias Dirigidas –TARGET-.....	44
1.9.6 Vitiligo, apoyo psicológico y calidad de vida.....	46
2 HIPÓTESIS	47
3 OBJETIVOS	51
4 MATERIAL Y MÉTODOS	55
4.1 Pacientes	57
4.1.1 Criterios de inclusión	58
4.1.2 Criterios de exclusión	58
4.1.3 Criterios de retirada y análisis previstos de las retiradas y abandonos	59
4.2 Material de Tratamiento e instrumento	59
4.3 Evaluación dermatológica	60
4.3.1 Evaluación clínica	60
4.3.2 Vitiligo Area Severity Index (VASI).....	60
4.4 Evaluación inmunológica	62
4.4.1 Obtención de muestras	62
4.4.2 Análisis del receptor de la inmunidad innata CD91	62
4.4.3 Análisis de las células T reguladoras	66
4.4.4 Cuantificación de la quimiocina CXCL10 en plasma	69
4.5 Evaluación psicológica	70
4.6 Análisis estadísticos	72
5 RESULTADOS	73

5.1	Características demográficas de los pacientes	75
5.2	Receptor de la inmunidad innata CD91	83
5.3	Células T reguladoras	84
5.4	Quimiocina CXCL10	85
5.5	Test psicológicos	86
6	DISCUSIÓN	89
7	CONCLUSIONES.....	99
8	LÍNEAS A FUTURO QUE SE DESPRENDEN DE ESTA INVESTIGACIÓN	103
9	BIBLIOGRAFÍA.....	108
10	ANEXOS	127

ABREVIATURAS

AC: Antes de Cristo

AIS: Gen de susceptibilidad autoinmune

APC: Célula presentadora de antígeno.

CD91: *cluster of differentiation 91*

CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

DAMP: patrón molecular asociado a daño (*Damage associated molecular pattern molecules*)

DC: Célula dendrítica

DLQI: Índice de Dermatología de Calidad de Vida

FOXD3: Forkhead box D3

GWAS: Estudio de asociación genómica

H2O2: Peróxido de hidrógeno

HADS -Hospital Anxiety and Depression Scale-

HLA: Complejo del antígeno leucocitario humano

HSP: Proteínas de choque (*Heat shock proteins*)

HSP70 Proteína de choque 70i (*Heat Shock Protein 70*)

IFN γ : Interferon gamma

JAK: Janus kinase

kDa: kiloDaltons

LRP1: *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (también llamado CD91)

MOP: Methoxypsoralen

MV: Vitiligo mixto

NB-UVB: *Narrow band* ultravioleta B

NK: Células natural killer

PGA1: Síndrome poliglandular autoinmune tipo 1

PMAD: Patrones moleculares asociados a daño

PRR: Receptores de patrones de reconocimiento (*Pattern recognition receptors*)

PSS: Escala de estrés percibido (*Perceived Stress Scale*)

PTPN22: Proteína tirosina fosfatasa linfocitaria 22

PUVA: *Psoralen and ultraviolet A*

QOL: calidad de vida

QSR: Q-Switched rubí

RLR: Receptor similar al RIG-I

ROS: Especies reactivas de oxígeno - *Reactive oxygen species-*

STAT-1: Signal transducer and activator of transcription 1

TLR: Receptor tipo peaje (Toll-like-receptor)

TMP: Trimethyl psoralen

Tregs: Células T reguladoras

UPR: Respuesta de la proteína desplegada. (*unfolded protein response*)

UV: Ultravioleta

UVB-NB: Narrow band Ultraviolet

VASI: Vitiligo Area Scoring Index

VGICC: Vitiligo Global Issues Consensus Conference

VNS: Vitiligo no segmentario

VS: Vitiligo segmentario

VU: Vitiligo universalis

XPB1: Proteína X-box vinculante 1

Summary

Background vitiligo is an autoimmune disease in which melanocytes are destroyed by antigen-specific T-cell. Adaptive immunity plays an important role in progression of the disease. Additionally, the cutaneous changes of vitiligo have significant effects on quality of life and self-esteem. The gap between adaptive and cellular immunity in vitiligo requires a better understanding as well as to increase awareness of the psychological effects of vitiligo.

Objective. The aim of this study was to map the serum levels of CXCL10 and T regulatory cells as a cellular markers and CD91 an innate immune receptor in vitiligo patients to declare its role in the pathogenesis and activity of vitiligo. QoL, anxiety and depression of patients with vitiligo, their relationship with clinical presentation and disease severity before and after sixteen weeks treatment and compared with controls were evaluated regarding their role in the pathogenesis of vitiligo.

Patients and Methods A randomized monocentric study included 43 patients; 21 patients with non-segmental vitiligo and 22 healthy volunteers as the control group. CD91, CXCL10 and T regulatory cells were determined on peripheral blood before and after UVB-NB phototherapy treatment associated with topical khellin, topical tacrolimus and oral Polypodium Leucotomos supplementation.

Conclusion Our findings suggest vitiligo patients have increased levels of monocyte mCD91 and reduced levels of plasma sCD91 so, could represent an useful biomarker for diagnosis. We demonstrated increased CXCL10 levels and lower CXCL10 levels after treatment so could be a biomarker to follow-up the treatment response. For other hand, T regulatory and T regulatory memory cells are not differently expressed on vitiligo patients. However, shows a decrease after treatment taking into account the improvement variable. Our study noticed high rates of anxiety and depression and psychological improvement after the treatment even doesn't improve clinically.

Resumen

Antecedentes El vitiligo es una enfermedad autoinmune en la que los melanocitos son destruidos por células T-antígeno-específicas. La inmunidad adaptativa juega un papel importante en la progresión de la enfermedad. Además, los cambios cutáneos del vitiligo tienen efectos significativos en la calidad de vida y la autoestima de los pacientes. La brecha entre la inmunidad adaptativa y celular en el vitiligo requiere una mejor comprensión, así como también es necesario aumentar la conciencia de los efectos psicológicos en los pacientes con vitiligo.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue mapear los niveles séricos de CXCL10 y células reguladoras T como marcadores celulares y CD91 un receptor inmune innato en pacientes con vitiligo para dilucidar su papel en la patogénesis y la actividad de la enfermedad. Se evaluó DLQI, ansiedad y depresión en los pacientes con vitiligo y su relación con la presentación clínica y gravedad de la enfermedad antes y después de dieciséis semanas de tratamiento y comparándolo con controles.

Pacientes y métodos Se trata de un estudio monocéntrico aleatorizado que incluyó 43 pacientes; 21 pacientes con vitiligo no segmentario y 20 voluntarios sanos como grupo control. Se determinaron células T reguladoras, CD91, CXCL10 en sangre periférica antes y después de tratamiento con fototerapia UVB-NB asociado a khellina tópica, tacrolimus y suplementación oral de *Polypodium Leucotomus*.

Conclusión Nuestros hallazgos sugieren que los pacientes con vitiligo tienen niveles elevados de monocitos mCD91 y niveles reducidos de sCD91 en plasma, por lo que podría representar un útil biomarcador para diagnóstico. Demostramos CXCL10 elevado en pacientes con vitiligo y disminución significativa después del tratamiento, por lo que es un útil biomarcador para enfermedad y para el seguimiento al tratamiento. Por otro lado, las células T reguladoras no se expresan de forma diferente en pacientes con vitiligo, sin embargo, sí se observó una disminución luego del tratamiento teniendo en cuenta la variable mejora. Nuestro estudio evidenció alteración de la calidad de vida, ansiedad y depresión antes del tratamiento y mejoría psicológica después de realizar tratamiento aún en los pacientes que no mejoraron clínicamente.

1 INTRODUCCIÓN

El vitíligo es un trastorno adquirido de la pigmentación de la piel en el cual diversos agentes agresores o activadores en un individuo genéticamente susceptible desencadenan una respuesta inflamatoria llevando a la destrucción del melanocito (Ezzedine et al; 2015). La investigación sobre la patogénesis del vitiligo humano en los últimos 30 años ha generado controversia, ya que las pruebas de la destrucción autoinmune dirigida y las anomalías intrínsecas de los melanocitos parecían estar en desacuerdo (Palermo et al, 2001) (Ongenaes et al, 2003) (Le Poole et al, 1993). Sin embargo, los avances recientes en el campo respaldan ambas hipótesis, y la evidencia sugiere que cada una está unida a la otra a través de mecanismos inmunes innatos (Halder Taliaferro, 2008).

Diferentes factores ambientales, incluidos luz ultravioleta y fenoles químicos como monobenzona, así como también factores intrínsecos celulares desencadenan estrés oxidativo en el melanocito, lo que resulta en la producción de patrones moleculares asociados a daño (PMAD o *Damage associated molecular pattern molecules* - DAMPs) y su secreción lleva a la activación de las células dendríticas cercanas y a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Rodrigues et al, 2017). El DAMP más asociado con vitíligo, HSP70 (Proteína de choque de 70 kilodaltons -*Heat Shock Protein 70*-), es inducido en la piel perilesional y lesional con vitíligo y funcionalmente empeora la enfermedad induciendo y reclutando células dendríticas (Rashighi and Harris; 2017).

Los DAMPs actúan como ligandos para los receptores de reconocimiento de patrones innato (PRR o *Pattern recognition receptors*), que activan la inmunidad innata, seguido de la activación de las células inmunitarias adaptativas, que incluyen los linfocitos T CD8+ autoreactivos lo que facilita la destrucción del melanocito y la progresión del vitíligo.

El *cluster of differentiation 91* (CD91) también llamado de LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) es un receptor de membrana plasmática celular para la endocitosis mediada por proteínas de choque y funciona como receptor de señalización (Binder et al; 2012).

Tomando en cuenta que no ha sido estudiado en vitíligo, pero sabiendo que su coestimulación puede ser activada por diferentes HSP incluyendo la HSP70,

uno de los objetivos principales de este estudio, fue determinar los niveles del receptor de la inmunidad innata CD91, tanto su forma de membrana expresada en monocitos como su forma soluble presente en el plasma de individuos con vitiligo antes y después de un tratamiento efectivo.

Estas respuestas inmunitarias innatas activan las células dendríticas, que transportan y presentan antígenos específicos de los melanocitos a las células T. Además, las citoquinas secretadas por las células inmunes innatas probablemente actúen como la señal inicial para ayudar a las células T a localizar los melanocitos susceptibles. Esto representa el comienzo de la respuesta autoinmune en el vitiligo, consistente en la muerte celular dirigida por las células T citotóxicas CD8+ y conducido por el Interferon-gamma (IFN γ) (Richmond et al; 2013). Las células T reguladoras (Tregs) son una subclase importante de las células T responsables de atenuar la inmunidad. El número total de células T reguladoras (Tregs) en pacientes con vitiligo parece estar disminuido en comparación con controles sanos y se ha observado una asociación de éstas con la actividad de la enfermedad (Tembhre et al; 2015). En general, se acepta que el efecto supresor total de Tregs se anula en pacientes con vitiligo. El segundo objetivo de nuestro estudio fue entonces analizar las células T reguladoras del sistema inmune adaptativo en sangre periférica de individuos con vitiligo antes y después de un tratamiento efectivo. Como los melanocitos residen lejos de los vasos sanguíneos en la epidermis, existen mecanismos adicionales de señalización de quimiocinas para promover el reclutamiento de células T CD8+ circulantes al tejido periférico. Las quimiocinas son proteínas pequeñas secretadas que actúan como quimioattractores para guiar la migración de las células T. Recientemente, usando el perfil de expresión génica en la piel lesionada de pacientes y un modelo de vitiligo en ratones, se descubrió que las quimiocinas inducidas por IFN γ (CXCL9 y CXCL10) se expresaban en altas concentraciones en la piel y la sangre. Los experimentos en un modelo murino indicaron además que IFN γ y CXCL10 eran necesarios funcionalmente para la progresión de la enfermedad y el mantenimiento de la misma (Rashighi et al; 2014). Por tanto, el tercer objetivo de nuestro estudio, fue precisamente cuantificar la quimiocina CXCL10 en el plasma de individuos con vitiligo antes y después del tratamiento.

El vitiligo es un trastorno devastador psicológicamente. El hecho que por lo general ocurre en áreas expuestas como la cara y las manos tiene un gran impacto en la percepción de sí mismo (Firooz et al; 2004). Por esto, evaluar psicológicamente a los individuos con vitiligo antes y después del tratamiento fue otro de los objetivos de nuestro estudio.

1.1 Epidemiología y consideraciones generales

El vitiligo es un trastorno autoinmune adquirido de la pigmentación de la piel y las membranas mucosas. Se caracteriza por máculas acrómicas bien delimitadas secundarias a la destrucción selectiva de melanocitos afectando la autoestima y la calidad de vida de los pacientes (Taieb and Picardo 2009). La enfermedad es causada por una interacción dinámica entre el riesgo genético y ambiental que propician el ataque autoinmune a los melanocitos en la piel. (Alikhan et al; 2011)

Aproximadamente el 0,5% al 2% de la población mundial está afectada por vitiligo, y aunque puede aparecer a cualquier edad, la mayoría de las veces se inicia antes de los 20 años (Taieb and Picardo; 2007, 2009). Su prevalencia es igual entre hombres y mujeres y no hay diferencia en las tasas de ocurrencia de acuerdo al tipo de piel o raza (Lu et al, 2007). Hay un componente genético, pues en 30% de los casos se encuentra antecedentes familiares (Spritz 2008).

En 1550 AC en el papiro de Ebers ya se describían enfermedades que afectaban el color de la piel: una con tumores, la lepra, y otra sólo con cambio de color, probablemente vitiligo. La palabra vitiligo viene del latín “*vitium*” que significa mancha o defecto (Taieb and Picardo, 2013).

El vitiligo puede provocar alteración psicológica, especialmente en los individuos de piel más oscura en que es más fácilmente perceptible (Porter and Beuf; 1991).

En el vitiligo, es común observar el fenómeno isomórfico de Köebner; es frecuente observar lesiones posteriores a traumatismos en rodillas y nudillos así como en cicatrices quirúrgicas (Van Geel et al; 2012). Es un trastorno de la pigmentación crónico y persistente y su repigmentación espontánea es rara y cuando ocurre produce un patrón perifolicular (Handa and Kaur; 1999). Muchos pacientes no están bien informados sobre su enfermedad; en un estudio, el 51,3% de los pacientes creían que su vitiligo fue causado por mala

atención médica, el 30% le atribuían un papel importante al comportamiento, un 25% a la dieta, un 21,3% al estado mental, y el 20% culpó a la contaminación ambiental (Firooz et al; 2004).

Actualmente los tratamientos son moderadamente efectivos consiguiéndose en muchos casos revertir la enfermedad, inhibiendo la inflamación de la piel y promoviendo la regeneración del melanocito (Ezzedine et al; 2015).

1.2 Genética en vitiligo

Se transmite genéticamente de manera poligénica. Aunque la mayoría de los casos de vitiligo son esporádicos, no es raro observar antecedentes familiares directos afectados (Zhang et al; 2009). Se ha descrito una frecuencia entre hermanos de hasta un 6.1% lo que representa un aumento del 18% comparado con la población general (Fain et al; 2006). La concordancia del vitiligo en gemelos monocigóticos es aproximadamente del 23% lo que sugiere un componente no genético significativo. (Alkhateeb et al; 2003). Los estudios epidemiológicos indican que el vitiligo es hereditario en un patrón no mendeliano, multifactorial y poligénico, con penetrancia incompleta (Ortonne 2008). Al parecer, diversos alelos recesivos en varios locus no ligados actúan en el desarrollo de vitiligo. Además, diferentes fenotipos están asociados con susceptibilidad genética y exposición al medio ambiente (Sun et al; 2006).

El hecho de observarse grupos familiares con vitiligo generalizado asociado a otras enfermedades autoinmune es evidencia convincente de que ocurre una diátesis autoinmune, probablemente una susceptibilidad genética a una aberración inmunológica. El 20% de los pacientes con vitiligo, tiene enfermedad de la tiroides; principalmente hipotiroidismo (Pagovich et al, 2008). Esto representa un incremento de ocho veces comparado con la población general. También hay una mayor frecuencia en otras formas de enfermedades autoinmunes y síndromes poliendocrinos. (Spritz and Andersen; 2017)

1.3 Estrés celular en los melanocitos e Inmunidad en vitiligo

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diversos factores que contribuyen a la fisiopatología del vitiligo, incluyendo genéticos, ambientales e inmunológicos (Salzer and Schallreuter, 1995). La interacción entre estos factores culmina en la autoinmunidad como el principal factor en la patogénesis

de la enfermedad ejercida a través de los linfocitos T CD8 citotóxicos autorreactivos específicos de melanocitos y guiados por IFN γ (Rashighi M, Harris J;2017)

Los eventos desencadenantes iniciales que conducen a la activación del sistema inmune en el vitíligo surgen de una combinación de defectos intrínsecos de los melanocitos y de la exposición a factores ambientales específicos, como la luz ultravioleta o productos químicos, que incrementan el estrés en estas células (Schallreuter et al, 1994)(Norris et al, 1988). Esto está especialmente bien descrito en el contexto de la despigmentación en un subconjunto de pacientes que desarrollan vitíligo después de la exposición a ciertos productos químicos. Estos incluyen productos químicos fenólicos y catecolónicos que se encuentran en tintes para el cabello, resinas, adhesivos, cuero y otras sustancias (Sasaki, Kondo; 2014). La propia melanogénesis es una fuente de estrés en los melanocitos. Recientes estudios *in vitro* revelan que los productos químicos con estructuras similares a la tirosina actúan como análogos de tirosina dentro del melanocito y precipitan niveles de estrés celular más altos, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species-ROS*) y desencadenando una respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response –UPR*) dentro de las células. El análisis por microscopia electrónica de los melanocitos en el vitíligo sugiere un incremento del estrés celular y junto con los niveles elevados de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) reflejan estrés oxidativo (Gong, Li; 2015). Está bien conocido que los derivados fenólicos pueden inducir o exacerbar vitíligo, induciendo ROS y activando la respuesta UPR. La UPR se activa en respuesta a una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplasmático. En este contexto, la UPR tiene como objetivo principal recuperar el funcionamiento normal de la célula deteniendo la traducción de proteínas y activando las vías de señalización que permitan incrementar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el correcto plegamiento de las proteínas, como las proteínas del choque térmico (*heat shock proteins – HSP*). Si la célula no consigue este primer objetivo en un cierto lapso de tiempo o si la anomalía persiste, las UPR dirigen hacia la

apoptosis, que es la muerte celular programada que no comporta inflamación (Ezzedine; 2015).

Las HSP se clasifican en función de su peso molecular. La mejor estudiada y la más representativa de la familia es la Hsp70; la familia Hsp90 incluye Hsps con pesos moleculares entre 80 y 110 kDa; la Hsp60 incluye el grupo de Hsps entre 58 y 65 kDa; las Hsps de bajo peso molecular varían entre 15 y 45 kDa, y se incluyen en la familia Hsp10; por último, está la ubiquitina que es un péptido de tan solo 76 aminoácidos. La síntesis de las HSP lleva a la adquisición de tolerancia a situaciones de estrés que en otras condiciones conducirían a la apoptosis celular, sin embargo, algunas HSP se producen constitutivamente a nivel basal, llevando a cabo múltiples funciones importantes como el plegamiento y translocación de proteínas recién sintetizadas, regulación del grado de glicosilación, activación de proteínas reguladoras específicas como factores de transcripción o kinasas, degradación proteica, señalización proteica, activación de hormonas esteroideas, inmunogenicidad tumoral o presentación antigénica (Mosenson et al, 2013). Debido a este amplio espectro de funciones colaboradoras, las Hsps también han sido denominadas “chaperonas moleculares”. Como las HSP son algunas de las proteínas más abundantes en las células, su liberación en el medio extracelular ha sido mostrado como un indicador de pérdida de integridad celular y esto es reconocido rápidamente por los centinelas celulares del sistema inmunológico (Binder , Zhou; 2012J).

Concretamente en vitiligo, se sabe que HSP70i se induce por estrés causado por fenol en melanocito y que está presente en la piel de los pacientes (Mosenson, Zloza A; 2012) Además, en modelos murinos se ha visto que HSP70i es necesario para la inducción de vitíligo, y acelera la progresión de la enfermedad mediante la activación de las células dendríticas (Denman, McCracken; 2008).

En situaciones de estrés, HSP70i y otros DAMPS son secretados por los melanocitos directamente al medio o en dentro de exosomas y captados por células del sistema inmune innato, como las células dendríticas (DCs), a través de sus receptores de patrones (*pattern recognition receptors* –PRR). Uno de estos PRR es el receptor de membrana CD91, también conocido como LRP1

(*LDL receptor-related protein 1*). El papel de CD91 en la respuesta inmune no es muy conocido, sin embargo si lo es en el metabolismo de los lípidos, de ahí que se conozca más ampliamente por el nombre de LRP1. Se sabe que CD91 tiene dos formas, la forma de membrana (mCD91 o CD91) y la forma soluble (sCD91) que tienen diferentes funciones. La molécula mCD91 es un receptor endocítico necesario para la *cross*-presentación de los péptidos de las HSP y tiene un papel esencial en la inmunovigilancia de tumores (Zhou, 2014). La forma soluble, sCD91, se forma por escisión de la forma de membrana y se cree que podría tener un papel como regulador de la inflamación (Gorovoy, 2010).

La activación del receptor CD91, junto con la de otros PRR como los TLRs (*toll like receptors*), permitirá que la DC que está presentando péptidos a los linfocitos T CD8, active a estos linfocitos T CD8 citotóxicos específicos contra proteínas del melanocito. Además, estas DCs producirán y liberarán citocinas (IL-1 β , IL-18) que reclutarán a otras células del sistema inmune, como los macrófagos o las células *natural killer* (NK). A su vez, el melanocito también puede secretar estas y otras citocinas con efecto proinflamatorio como la IL-6 o la IL-8, reclutando aún más células del sistema inmune. El linfocito T CD8 citotóxico autorreactivo actuará destruyendo melanocitos, generando aún más estrés, y secretando IFN γ , que activará aún más la respuesta citotóxica. Todo este proceso está esquematizado en la figura 1 obtenida del artículo de Richmond de 2013 (Richmond et al; 2013).

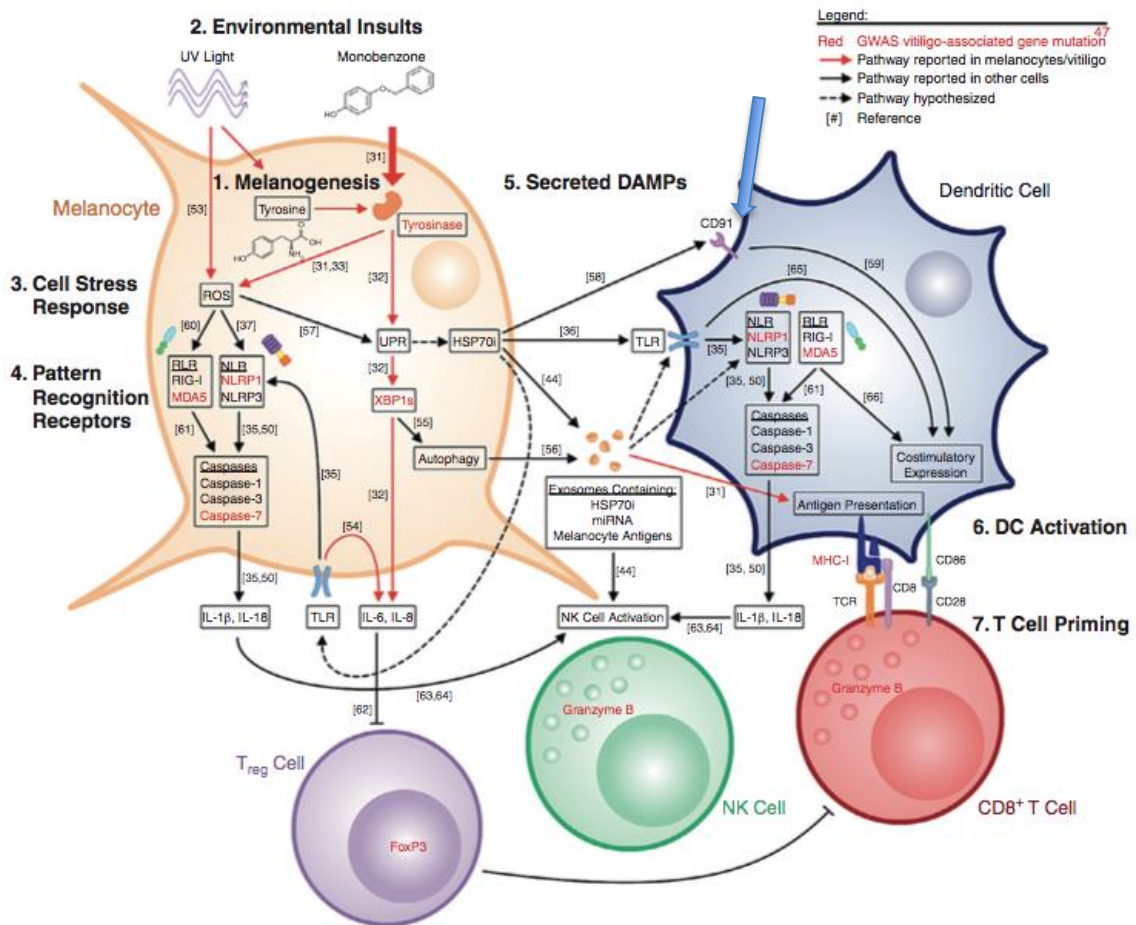


Figura 1.1. Procesos implicados en la fisiopatología del vitiligo. 1) Melanogénesis: la producción de melanina provoca estrés celular. 2) Alteraciones Medioambientales: luz UV y fenoles químicos como la monobenzona, aumentan el estrés. 3) El estrés de melanocitos se evidencia por ROS intracelular y la activación de la UPR. 4) ROS y UPR activan los receptores PRRs ya sea directamente, o a través de la producción de HSP70i y exosomas. 5) Estas señales funcionan como DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) que serán reconocidos por los PRR de las células dendríticas. 6) Activación de las células dendríticas. 7) Reclutamiento y activación de células T CD8 + autoreactivas que serán responsables del ataque autoinmune de melanocitos.

Además, las citoquinas secretadas por las células inmunes innatas probablemente actúen como la señal inicial para ayudar a las células T a localizar los melanocitos sometidos a estrés. Esto representa el comienzo de la respuesta autoinmune en el vitiligo. Como los melanocitos residen lejos de los vasos sanguíneos en la epidermis, existen mecanismos adicionales de señalización de quimiocinas para promover el reclutamiento de células T CD8 circulantes al tejido periférico. Las quimiocinas son pequeñas proteínas secretadas que actúan como quimioattractores para guiar la migración de las células T. Recientemente, usando el perfil de expresión génica en la piel lesionada de pacientes y un modelo de vitiligo en ratones, se descubrió que las quimiocinas inducidas por IFN γ (CXCL9 y CXCL10) se expresaban en altas concentraciones en la piel y la sangre (Rashighi et al; 2014). Los experimentos mecanísticos en un modelo murino indicaron además que IFN γ y CXCL10

fueron necesarios funcionalmente para la progresión de la enfermedad y el mantenimiento de la misma.

El vitiligo es por tanto, una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes son aquellas en las que el sistema inmunológico reconoce como extrañas a estructuras propias provocando su destrucción y causando enfermedad. Este fenómeno de reconocimiento de lo propio como extraño se conoce como rotura de la tolerancia. La tolerancia inmunológica es un proceso activo en el que participan diferentes procesos tanto en el timo, médula ósea como en sangre periférica. Las células T reguladoras (Treg) participan en uno de los mecanismos más importantes de tolerancia inmunológica a nivel de periferia, de ahí que su defecto esté relacionado con fenómenos de autoinmunidad (Dwivedi et al, 2015). Estas células se caracterizan por ejercer una actividad supresora de los linfocitos T autorreactivos, tanto linfocitos T CD4 colaboradores como linfocitos T CD8 citotóxicos (Moftah et al, 2014). Es por ello que la ausencia o disregulación de las células Treg es de interés en las enfermedades autoinmunes. En vitiligo se han llevado a cabo diversos estudios sobre células Treg con resultados controvertidos: algunos muestran niveles reducidos de estas células, otros inalterados y otros, incluso, incrementados respecto a la población control (Dwivedi et al; 2015). Respecto a su funcionalidad, existen estudios en los que se demuestra que las células Treg en vitiligo son capaces de inhibir la proliferación y la producción de citoquinas de linfocitos T CD8 autólogos estimulados (Lili et al; 2012).

1.4 Características clínicas

El vitiligo se caracteriza por la aparición de máculasacrómicas o hipocrómicas asintomáticas y bien delimitadas de tamaño y distribución variada (Hann et al; 1997). Puede afectar cualquier área del cuerpo aunque predomina en áreas como superficies extensoras o eminencias óseas. Además en cara, axilas, dorso de manos y alrededor de orificios naturales como boca, ojos, nariz, ombligo y genitales (Linthorst et al; 2008).

Por lo general comienza insidiosamente en áreas de exposición al sol durante los meses de primavera y verano. La aparición de las lesiones puede ser precedida de quemaduras graves de sol, embarazo, traumas de piel y estrés emocional (Howitz et al, 1977). Su aparición es generalmente lenta y

progresiva, ya sea por expansión centrífuga de las lesiones iniciales o por la aparición de nuevas lesiones. Un estudio encontró que la progresión de las lesiones ocurría en 88,8% de los pacientes, con historia familiar de presentar la enfermedad. Así como también, estos pacientes presentan mayor duración de sus lesiones, más frecuente se presentan con fenómeno de Köebner y con compromiso de membranas mucosas. La incidencia mayor de fenómeno isomórfico de Köebner y progresión de la enfermedad se ve luego de los 58 años (Hann et al; 2000).

El vitíligo se puede dividir en forma simplificada en tres tipos: localizado, generalizado y universal.

El vitíligo localizado a su vez puede presentarse en los subtipos focal, segmentario (dermatomas Blaschko o lineal), y mucoso. En el vitíligo localizado la enfermedad queda limitada a una determinada región de la piel. Suele responder bien al tratamiento y generalmente tiene una evolución estable o hacia la repigmentación con tratamiento adecuado.

El vitíligo generalizado puede ser vulgar acrofacial o mixto. Vitíligo universal implica más del 80% de compromiso cutáneo. Vitíligo generalizado es el tipo más común y de éste, el subtipo más frecuente es el vulgar. Los sitios de predilección para el vitíligo vulgar son los dedos y las muñecas, las axilas y la ingle, orificios como la boca, los ojos y genitales. Las formas generalizadas puede comenzar a finales de la vida, en los sitios sensibles a la presión, fricción o trauma. Además en esta variante hay a menudo una historia familiar o personal de enfermedad asociada como tiroiditis autoinmune y diabetes (Kakourou et al, 2005) (Lacovelli et al, 2005). Los pacientes con vitíligo universal son los que evidencian peor calidad de vida y además son los que más frecuentemente presentan comorbilidades e historia familiar de la enfermedad o de las comorbilidades asociadas (Kent and Al-abadie, 1996). Las formas punteadas o en confeti son menos frecuentes y pueden presentarse asociadas a máculas melanocíticas (Ezzedine et al; 2015).

1.5 Clasificación de vitíligo/ Nomenclatura

El vitíligo se ha clasificado según su presentación clínica en dos formas principales, vitíligo segmentario (VS) y vitíligo no segmentario (VNS), este último incluye varias variantes: Vitíligo generalizado, vitíligo acrofacial, vitíligo

universal (Taïeb and Picardo; 2007). El vitíligo no segmentario generalmente evoluciona con el tiempo, tanto en patrones de distribución como de extensión (Chun Hann, 1997). Este es el caso del vitíligo focal, que puede evolucionar a VS, a VNS o puede seguir siendo inclasificable según el paradigma de clasificación VNS/VS. Para VNS, la enfermedad puede clasificarse inicialmente como acrofacial, pero luego se clasificará mejor como generalizada o universal. Por el contrario, algunos casos de VNS pueden evitar las extremidades (vitíligo no acrofacial generalizado). Algunos casos de VNS exhiben una distribución flexural, y otros una predilección por los aspectos extensores, lo que sugiere diferentes desencadenantes o etiologías. Por lo tanto, es importante informar con precisión los sitios involucrados (Taïeb and Alomar; 2013). Más recientemente, el vitíligo mixto (MV) se ha definido como la combinación de VS inicial seguido de la aparición de parches de VNS bilateral varios meses o, más raramente, años después (Ezzedine et al., 2015).

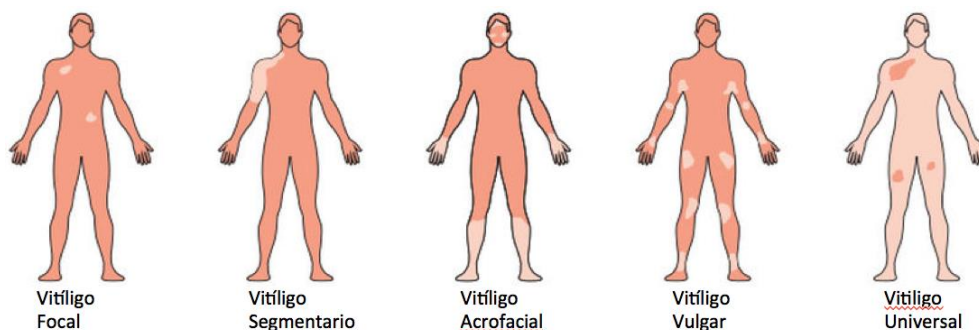


Figura 1.2. Clasificación simplificada de las presentaciones clínicas más frecuentes

1.5.1 Vitíligo / vitíligo no segmentario

Vitíligo común (antes conocido como vitíligo vulgaris)

Es la forma más común de vitíligo. Se caracteriza por máculas blancas adquiridas asintomáticas y bien circunscritas que involucran múltiples partes del cuerpo, generalmente un patrón simétrico. La enfermedad puede comenzar en cualquier sitio del cuerpo pero los dedos, las manos y la cara son con frecuencia los sitios de aparición inicial.

Vitíligo acrofacial

En el vitíligo acrofacial, los sitios involucrados generalmente se limitan a la cara, la cabeza, las manos y los pies. Una característica distintiva es la despigmentación de la porción distal de los dedos y los orificios faciales.

Posteriormente puede incluir otros sitios del cuerpo, lo que resulta en vitíligo generalizado típico.

Vitíligo universalis

Vitiligo universalis (VU) es la forma más extensa de la enfermedad y generalmente ocurre en la edad adulta. 'Universalis' se usa generalmente cuando la despigmentación es prácticamente universal (80-90% de la superficie del cuerpo), pero es posible que todavía haya algo de pigmentación. Los pelos también pueden ser parcialmente respetados. Mientras que este diagnóstico es fácil en individuos de piel oscura, puede ser difícil en personas de piel muy clara. Por lo general, el VU está precedido por un vitíligo generalizado que evoluciona gradualmente hasta la despigmentación completa o casi completa de la piel y el cabello.

Vitíligo focal

El vitíligo focal se refiere a un pequeño parche aislado que no se ajusta a una distribución segmentaria y que no evolucionó a vitíligo VNS después de un período de al menos 2 años. Esta forma de vitiligo puede evolucionar a VS o vitiligo VNS.

1.5.2 Vitíligo segmentario

El vitíligo mono-segmentario es la forma más común de VS, refiriéndose a la presencia de una o más máculas despigmentadas blancas distribuidas en un lado del cuerpo, generalmente respetando la línea media (aunque algunas lesiones pueden cruzar parcialmente la línea media), afectación folicular temprana (leucotriquia), desarrollo rápido durante algunas semanas o meses y curso prolongado. (Van Geel and Speeckaert; 2017)

1.6 Diagnóstico

Al evaluar al paciente con vitiligo se debe realizar examen completo dermatológico de la piel para detectar las áreas de despigmentación. Se debe utilizar también la luz de Wood para facilitar la evaluación y eventualmente la dermatoscopia (Alikhan, Felsten; 2011) (Kumar et al, 2018).

En general el diagnóstico clínico no presenta dificultades y la lámpara de Wood puede ser útil ya que torna las lesiones más evidentes permitiendo verificar la extensión de la lesión sobre todo en pacientes de piel muy clara así como

diferenciar con enfermedades que cursen con máculas hipocrómicas. Además permite hacer seguimiento de las lesiones durante el tratamiento (Wang, Chang; 2017).

Clásicamente, las máculas discretas, de color blanco uniforme o en parches con bordes convexos están rodeadas por piel normal. Aunque generalmente es asintomática se ha reportado prurito en algunos pacientes o sensación urente que preceden o acompañan la aparición de lesiones. Frecuentemente ocurre en sitios que normalmente están hiperpigmentados como la cara (periorifical), la superficie dorsal de las manos, los pezones, las axilas, el ombligo, el sacro, codos, rodillas, dedos y área de flexión de muñecas. A menudo está asociada leucotriquia con despigmentación de la base de la superficie pilosa.

El diagnóstico de vitiligo es generalmente clínico y con el uso de la lámpara de Wood. Las fotografías y la microscopía confocal de reflectancia en vivo también puede facilitar el seguimiento del progreso de las lesiones con el tiempo. El dermatoscopio manual o el videodermatoscopio digital con software es utilizado para evaluar islas de repigmentación y para descartar patologías como la esclerodermia (Jha, 2018).

El estudio histopatológico de la biopsia de piel en lesiones de vitiligo puede ser una herramienta útil en casos que exista duda diagnóstica con enfermedades dermatológicas que cursen con máculas acrómicas. Típicamente se evidencia un discreto infiltrado linfocitario en la dermis superficial con melanocitos escasos o ausentes (Kim et al, 2008). Los melanocitos en el borde de la lesión pueden observarse agrandados, con vacuolas y con procesos dendríticos alargados con gránulos de melanina. Los residuos de melanina pueden evaluarse con la coloración de Fontana-Masson. Puede ser útil la inmunohistoquímica con DOPA que detecta los melanocitos activos y HMB45 (anti-GP100), Mel-5 (anti-trp1), y NK1 / beteb (anti-PMEL-17), que detectan los melanocitos activos e inactivos.

Entre los estudios a realizar se debe solicitar un perfil de laboratorio completo que incluya glicemia en ayunas, curva de tolerancia a la glucosa y perfil tiroideo con niveles de Tirotopina y anticuerpos antitiroideos, hierro sérico, VSG y anticuerpos antinucleares para descartar enfermedades asociadas (Naughton et al, 1986).

Instrumentos para medir el grado de despigmentación en vitiligo

A la fecha, no existe ningún instrumento estandarizado óptimo para medir objetivamente la severidad del vitiligo y la eficacia de las terapias.

Quizás el Vitiligo *European Task Force assessment* (VETFa) y el *Vitiligo Area Scoring Index* (VASI) son las dos mejores descritas medidas para evaluar grado de despigmentación.

En un estudio comparativo entre ambos instrumentos se mostró que había variabilidad interobservador pero que ambos eran instrumentos efectivos (Komen et al; 2015).

Entre los instrumentos objetivos se puede utilizar espectrofotometría, colorimetría y videodermatoscopia digital. También se han utilizado algunos software de análisis computarizado de imágenes como Corel Draw, Image Pro Plus, AutoCad y Photoshop. (Alghamdi et al; 2012)

1.7 Trastornos asociados con vitiligo

Es frecuente observar vitiligo asociado a otras patologías dermatológicas como alopecia areata y psoriasis. También puede observarse leucotriquia o poliosis, encanecimiento prematuro y nevo halo de Sutton. Existen síndromes como en la enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada en que se asocia vitiligo con uveítis, disacusia meningitis, alopecia y poliosis (Dahir, 2018) (Hong et al, 2009) (Tsuruta et al, 2001).

Además el vitiligo frecuentemente está asociado a enfermedades tiroideas como hipotiroidismo y enfermedad de Graves, diabetes mellitus anemia perniciosa y asma.

Parece que hay una asociación de interés entre melanoma y vitiligo, porque el desarrollo de vitiligo en pacientes con melanoma metastásico indica mejor pronóstico (Nordlund and Lerner, 1979). El mecanismo fisiopatológico que lleva a la formación de vitiligo probablemente también destruye melanoma (Schallreuter et al, 1991). Por otro lado, hay evidencia de que las personas con vitiligo tienen una mayor incidencia de melanoma y viceversa (Bystryn et al, 1987).

El vitiligo además puede estar asociado con varios síndromes como el síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 (PGA1) en que el paciente presenta una combinación de vitiligo, enfermedad de Addison, hipoparatiroidismo,

displasia ectodérmica y candidiasis mucocutánea (Ahonen et al, 1990). Esta enfermedad está causada por defectos en una proteína denominada *AIRE*, que tiene una función clave en la generación de la tolerancia inmunológica en el propio timo. Este defecto provoca la generación de linfocitos T autorreactivos que serán los responsables de estas patologías. (Dittmar and Kahaly, 2003)

1.8 Diagnóstico diferencial

Los diagnósticos diferenciales del vitiligo son amplios sin embargo una exhaustiva historia clínica con examen físico adecuado usualmente facilita el diagnóstico.

Se debe tomar en cuenta que algunos químicos como reveladores fotográficos y diversos compuestos fenólicos pueden llevar a leucoderma o vitiligo ocupacional. También dermatitis de contacto o procesos inflamatorios intensos pueden provocar despigmentación o acromías residuales. Entre los químicos descritos como potenciadores o iniciadores de lesiones también se encuentran diversos tintes, perfumes, detergentes, productos de limpieza, insecticidas, los preservativos de caucho, zapatillas de goma, calcetines y zapatos. Delineador de ojos o labios, lápiz de labios, crema dental, antisépticos fenólicos y sus derivados, también algunos jabones germicidas que contienen yoduro de mercurio (Stevenson, 1981).

Los compuestos principales del vitiligo ocupacional son los derivados fenólicos principalmente el éter monobencílico de hidroquinona, que también se utiliza como terapia en paciente con lesiones extensas que comprometen más del 80% de la superficie corporal y en que se desee despigmentar al paciente. Sin embargo el tratamiento puede fracasar por la posibilidad de eccema de contacto severo al componente. También puede inducir vitiligo los pegamentos y gomas utilizados en zapatería y el contacto con arsénico (Mancuso et al, 1996).

Un diagnóstico diferencial frecuente de vitiligo es con el nevo hipocrómico que representa una hipopigmentación segmentaria detectable en el primer año de vida y estable en tamaño en proporción al crecimiento del niño. En esta entidad dermatológica, el número de melanocitos puede ser normal, pero la producción de melanina se reduce. Con la lámpara de Wood, el contraste entre la piel normal y lesionada es menos marcada que en vitiligo. Otro diferencial menos

frecuente es piebaldismo, una enfermedad congénita autosómica dominante que se presenta con despigmentación en línea media anterior y un mechón blanco (poliosis) La distribución es en la frente. También la pitiriasis versicolor y la pitiriasis alba son frecuente preocupación de padres que traen a sus hijos por la sospecha de vitiligo. En adultos la hipomelanosis guttata idiopática es quizás el principal motivo de consulta de preocupación por parte del paciente como forma de vitiligo.

1.9 Tratamiento del vitiligo

El tratamiento de vitiligo debe ser individualizado y escogido por el dermatólogo según la extensión y localización de las lesiones, tiempo de evolución y tratamientos anteriores. Además se debe conversar con el paciente y dar expectativas reales sobre la respuesta al tratamiento. Es importante conocer la opinión del paciente debido a que con el acceso a la información por internet muchas veces comparte conceptos y tratamientos que ha investigado. En líneas generales los pacientes con corta evolución de su enfermedad, jóvenes y con formas localizadas en áreas como la cara son mejores respondedores a la terapia que los pacientes con historia larga de su patología de varios años con múltiples terapias y con formas generalizadas o formas acrales que en general tienen pobre respuesta.

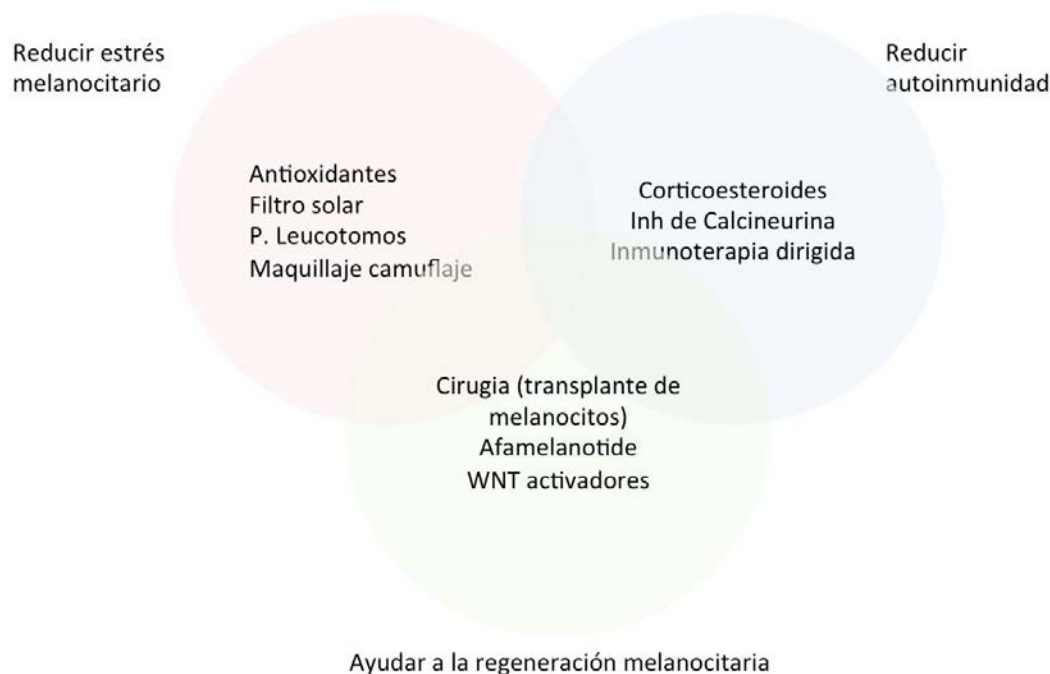
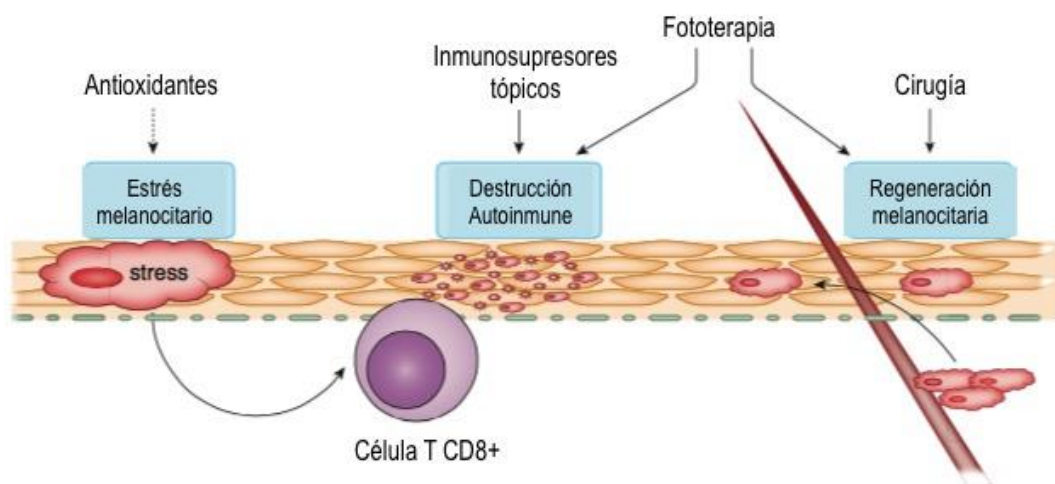


Figura 1.3. Los actuales tratamientos y los emergentes deben dirigirse a estos 3 aspectos fundamentales en el tratamiento de vitiligo. *Dermatol Clin* 35 (2017) 257–265

Existen algoritmos para decidir la terapia, pero en general depende mucho del criterio del clínico (Piquero-Casals, 2007). En las formas generalizadas la fototerapia con luz ultravioleta de banda estrecha o Narrow band (UVB-NB) de 311nm ha desplazado el 8-MOP (8-metoxipsoraleno) y exposición a lámpara UVA (PUVA) (Ortonne et al, 1979). La kellina tópica asociada a la fototerapia es útil en formas localizadas y generalizadas (Orecchia Perfetti, 1992). En el tratamiento sistémico también se utilizan los pulsos de corticoesteroides por vía oral o parenteral y algunos antioxidantes como el resveratrol y la fenilalanina. También el polipodium leucotomos se ha utilizado para mejorar la tolerancia a la exposición solar y disminuir la fotosensibilidad de las lesiones. En el caso de vitiligo localizado el tacrolimus tópico y los corticoesteroides son las mejores alternativas. El láser excimer 308nm así como la luz excimer mejoran los resultados y puede combinarse con el tacrolimus al 0.1% y con la kellina tópica 3%.

De cualquier modo, muchas veces el tratamiento es infructuoso y los resultados pueden ser frustrantes debido a que aun no se cuenta con un tratamiento efectivo para la repigmentación de todas las formas clínicas de esta patología. El tratamiento puede ser alternado o rotado y combinado para mejorar los resultados. Es importante conocer cada una de las herramientas tanto tópicos como sistémicas. (ver figura 1.4)



Modificado de: Dermatol Clin 35 (2017) 257–265 Figura 1.4. La patogénesis del vitiligo comienza con melanocitos alterados que muestran una respuesta de estrés celular elevada. Esto desencadena la autoinmunidad, que se dirige a los melanocitos para su destrucción, lo que resulta en una despigmentación focal. La repigmentación requiere el crecimiento y la migración de los melanocitos, generalmente de los folículos pilosos. Por lo tanto, hay 3 objetivos a considerar durante el tratamiento del vitiligo: (1) reducir el estrés de los melanocitos, (2) suprimir el objetivo autoinmune de los melanocitos, y (3) promover la regeneración de los melanocitos. Los tratamientos actuales, incluidos los inmunosupresores tópicos, la fototerapia y los abordajes quirúrgicos, abordan en parte estos objetivos en formas generales no focalizadas.

1.9.1 Tratamiento tópico

Corticoesteroides tópicos

En formas localizadas resulta muy efectiva la terapia tópica y los corticoesteroides continúan siendo alternativa útiles y de primera línea (Cockayne et al, 2002). Según el área corporal comprometida se puede elegir la potencia y el tiempo de duración de la terapia. En cara, párpados y genitales se debe emplear esteroides de muy baja potencia como la desonida y la hidrocortisona en forma intermitente. En tronco y miembros, esteroides de mediana potencia o los llamados “*soft-esteroides*” como la mometasona, el butirato de hidrocortisona y el aceponato de metilprednisolona (Westerhof et al, 1999). En áreas pequeñas de piel engrosada como manos, pies y codos se pueden utilizar así como el dipropionato de betametasona o el clobetasol (Kumari, 1984).

Inhibidores de la Calcineurina

El tacrolimus y pimecrolimus son macrólidos muy útiles y efectivos en formas localizadas de vitíligo. Son inhibidores de la calcineurina que atenúan la actividad de las células T y disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias. Los experimentos in-vitro documentan que mejoran la migración y pigmentación de melanocitos (Jung et al 2016). De los dos, el tacrolimus al 0.1% es el tratamiento quizás con mejores resultados y con mínimo de efectos indeseables para lograr repigmentación de vitíligo (Grimes et al, 2004). Se puede utilizar dos veces al día e inclusive asociándolo a otras terapias como la fototerapia UVB-NB o la luz excimer 308nm.

Kellina, Khellin

La kellina es un furanocromo obtenido de la planta *Amni visnaga* de la India. En principio se utilizó en forma sistémica con alta toxicidad hepática por lo que se abandonó su uso. Por otro lado, su forma tópica al 3% asociado a luz solar - KUYA-SOL- o con fototerapia acorta el tiempo de la terapia y logra excelentes resultados (Alomar, 1992)(Ortel et al, 1988). No causa fototoxicidad como los psoralenos. (Valkova et al; 2004)

Latanoprost

Es un análogo de la prostagladina E2-alpha que puede inducir repigmentación, que es un efecto secundario habitual en pacientes que lo usan para el

tratamiento del glaucoma. Su mecanismo de acción es por estimular la tirosina promoviendo la proliferación del melanocito y la melanogénesis. El bimatoprost también se ha utilizado. (Kapoor et al; 2008)

Piperine

Es un alcaloide derivado del extracto de pimienta negra. Se ha demostrado sus propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes, antiinflamatorias y estimulante de la proliferación de melanocito. Se utiliza en crema al 20% y puede asociarse a fototerapia UVB-NB (Shafiee et al 2018).

Catalasa

Los resultados son variados pero en general la respuesta es lenta y discreta. Se utiliza asociado a la exposición solar, y su base científica está orientada a la teoría del estrés oxidativo (Schallreuter et al, 2002).

Análogos de la vitamina D3

El calcipotriol es un análogo tópico de la vitamina D3 con diversos mecanismos de acción. Es utilizada en psoriasis por su efecto antiproliferativo de queratinocitos y su efecto inmunomodulador estimula al melanocito a la melanogénesis (Birlea et al, 2008). Diversos estudios presentan al calcipotriol como terapia adyuvante pero sólo algunos pequeños estudios clínicos lo muestran como monoterapia en niños mostrando tasa de repigmentación de hasta 77%. Comparado a los corticoesteroides tópicos el calcipotriol tiene menor tasa de repigmentación, pero en algunos estudios se ha utilizado combinado o asociado a fototerapia UVB-NB. (Parsad et al, 2006).

Tratamiento cosmético con maquillaje y tatuajes

El maquillaje camuflaje en forma de bases de maquillaje mejora la autoestima del individuo (Ongenaes et al, 2005). También el uso de lociones con dihidroxiacetona ayuda a disimular lesiones que no responden a tratamiento y puede ser una alternativa válida (Rajatanavin et al, 2008) (Hossain et al 2016) (Hsu, 2008). Sin embargo, el tatuaje artístico es una práctica común en pacientes con vitiligo localizado pero da una apariencia artificial y frecuentemente desarrollan fenómeno isomórfico de Köebner por lo que el dermatólogo debe aconsejar al paciente que desista de este tipo de práctica.

Terapia de Despigmentación con mono-bencil-éster de hidroquinona

Cuando el vitiligo compromete áreas superiores al 50% de la superficie cutánea la posibilidad de repigmentación es muy baja. En esta condición está indicada la despigmentación. Es realizada con monobencileter de hidroquinona al 20% en crema con una o dos aplicaciones al día (Mosher et al, 1977). Como el medicamento destruye el melanocito la despigmentación es definitiva lo que debe ser explicado al paciente que deberá usar fotoprotección siempre. Otras alternativas son el láser Q-Switched rubí QSR y el metoxifenol en crema (Njoo et al, 2000).

1.9.2 Tratamiento sistémico

Corticoesteroides sistémicos

El uso de corticoesteroides sistémicos en tratamiento de vitiligo es controversial debido a sus efectos adversos potenciales (Kim et al, 1999). Sin embargo los esquemas por pulsos o mini-pulsos pueden ser muy útiles para detener la enfermedad que está en rápida progresión o como adyuvante asociado a otras terapias (Radakovic et al, 2001). Se utiliza principalmente la dexametasona, la prednisolona, la prednisona y el deflazacort oral (Seiter et al, 2000). También se puede utilizar corticoesteroides de depósito por vía parenteral así como infiltraciones de triamcinolona intralesional en bajas dosis para evitar efectos colaterales como atrofia del área (Vasistha and Singh 1979). Entre los efectos secundarios están el aumento de peso, hipertricosis, hipertensión y efectos potenciales serios como osteoporosis y necrosis aséptica de la cabeza del fémur.

Afamelanotide

Es un análogo sintético de la hormona estimulante del melanocito α -MSH. En un estudio en cuatro pacientes se reportó su efectividad en estimular la pigmentación en pacientes con vitiligo asociado a UVB-NB pero con una pigmentación más acentuada que la piel no afectada (Grimes P, et al 2013). En 2014 se realizó el estudio con una serie de 55 pacientes doble ciego y asociado a UVB-NB. Se utilizó en infiltración subcutánea de afamelanotide al 16% y se demostró su superior comparado con UVB-NB como monoterapia (Lim H et al 2015).

Simvastatina

La simvastatina es un inhibidor de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa utilizado para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Se sabe que la droga inhibe la activación de STAT1 inducida por IFN- γ (Loi et al, 2016). Fue reportado un caso en que el tratamiento con dosis altas de simvastatina en un paciente con vitíligo e hipercolesterolemia dio como resultado una rápida repigmentación de la piel, lo que respalda el tratamiento con simvastatina como terapia potencial para el vitíligo (Noel et al., 2004).

En un estudio realizado en 15 pacientes con vitíligo no segmentario (Vanderweil et al; 2017) se les indicó simvastatina 40mg vía oral por el primer mes y luego 80mg por los cinco meses restantes; 3 pacientes tuvieron aumento de las transaminasas, cuatro de los pacientes tuvieron mialgias severas y dos diarrea. No demostró efectividad en el tratamiento de vitíligo. En los modelos en ratones si se logró revertir la enfermedad reduciendo también la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN- γ (Agarwal et al; 2015). Quizás pueda ser una alternativa a futuro en forma tópica para evitar los efectos secundarios del tratamiento sistémico.

Fototerapia

Es una de las alternativas más efectivas y prácticas que se usa cuando el compromiso es mayor al 20% de la superficie corporal (Kao and Yu, 1992). La ultravioleta A o la exposición solar asociada a psoralenos por vía oral (PUVA y PUVASOL respectivamente) constituye un tratamiento efectivo y económico pero con algunas limitaciones por los eventos adversos que produce. Se emplea el 5-MOP, 8-MOP y TMP oral 2 horas antes de la exposición UVA. Entre los eventos adversos están las náuseas, las reacciones fotolumínicas y la posibilidad de quemaduras. Entre las precauciones están la fotoprotección y el uso de lentes de sol. Está contraindicado en el embarazo en pacientes pediátricos y en pacientes con historia previa de tumores cutáneos. Actualmente se emplea más frecuentemente la kellingina o khellin, un furanocromo semejante al 8-MOP pero menos tóxico (Wu et al, 2007).

La fototerapia con ultravioleta B de banda estrecha (UVB narrow band) con un pico de 311nm ha desplazado al PUVA por su efectividad con mínimos efectos indeseables (Parsad, 2006). Puede ser utilizada en niños y se realiza dos o tres

veces por semana (Tembhre et al, 2015). Se inicia la dosis con 0.25 J/cm² y se incrementa 20% en cada sesión hasta alcanzar eritema mínimo. Constituye tratamiento de primera línea en vitiligo generalizado (Hartmann et al, 2005).

Láser excimer monocromático 308nm y luz excimer

Es tratamiento de elección en formas localizadas (Hadi, 2004). El espectro de banda es similar al de la fototerapia con UVB-NB que es de 311nm y sin embargo esta alternativa ha demostrado aún mejores resultados que la UVB-NB (Ostovari et al, 2004) (Leone et al, 2003) (Bagherani, 2016). Las sesiones se realizan dos o tres veces por semana y se mejoran los resultados asociando a otros tratamientos como la kellina tópica, el tacrolimus o los corticoesteroides. (Bapur and Adisen; 2016)

Dieta, terapia suplementaria oral y antioxidantes

Dieta

No hay estudios controlados que relacionen la dieta a la prevención o el manejo de pacientes con vitiligo. Sin embargo hay diversas publicaciones recomendando diversas dietas no documentadas para el manejo de enfermedades autoinmunes, incluyendo el vitiligo. (Grimes and Nashawati; 2017)

Suplementos orales

Se utilizan debido a que muchos alimentos no proveen cantidades suficientes o tipos de minerales y vitaminas que regulan el estrés oxidativo o el sistema inmune. Algunos de los más utilizados se encuentran resumidos y explicados en la tabla 1.1.

La fenilalanina es un aminoácido esencial importante en la melanogénesis. La L-fenilalanina oral ha demostrado que mejora los resultados de la fototerapia. (Camacho, Mazuecos, 1999).

Diversos antioxidantes pueden cumplir un rol importante para proteger a los melanocitos de la destrucción por la especies reactivas de oxígeno ROS. Se utilizan la vitamina E, vitamina C, ácido alfalipóico, ginkgo biloba y polipodium leucotomos (Parsad et al, 2003). También un antioxidante obtenido de la uva, el resveratrol tiene especial uso como adyuvante al tratamiento de vitiligo. (Dell'Anna et al, 2007)

Vitaminas y suplementos para vitiligo		
Suplemento	Propiedades in vivo	Efecto en el manejo del vitiligo
Vitamina B12 / ácido fólico	Reparación del ADN, síntesis, metilación del ADN	Puede usarse solo o con fototerapia para la repigmentación
Vitamina C	Antioxidante / inmunomodulador	0.5-2 g por día conduce a una alta actividad antioxidante
Vitamina D	Crecimiento y diferenciación de melanocitos / queratinocitos Inhibe la activación de las células T Aumenta la melanogénesis Inmunomoduladora	Los altos niveles de vitamina D pueden reducir la actividad de la enfermedad
Vitamina E	Eliminador de radicales libres / inhibe la coagulación de las plaquetas / antioxidante / antiinflamatorio	Solo o con fototerapia conduce a una rápida repigmentación con efectos fotoprotectores
Zinc	Antioxidante / regula la expresión génica / cofactor de la superóxido dismutasa	Disminuye el estrés oxidativo y aumenta la eficacia de la fototerapia
Phyllanthus emblica (fruta amla)	Antioxidante / antiinflamatorio / antimicrobiano / antiviral	Puede ofrecer un pequeño beneficio cuando se combina con esteroides tópicos
Ginkgo biloba	Factor antagonista activador de plaquetas antiinflamatorio / antioxidante	Disminución de la fototoxicidad de la fototerapia y la repigmentación de mejora
Polypodium leucotomos	Protección, antioxidante, inhibición de la apoptosis, modulación inmune, disminuye las citoquinas proinflamatorias	Disminuye la progresión de la enfermedad
Piperina (estudios con animales)	Estimula la replicación de melanocitos Induce la formación de dendritas melanocíticas	Aumento de la repigmentación en las áreas de cabeza y cuello con el uso de fototerapia
Té verde (epigallocatequina-3-galato) (estudios en animales)	Antioxidante / antiinflamatorio / antiaterogénico / anticancerígeno	Pigmentación en melanocitos recién formados

Tabla 1.1: Modificado de Dermatol Clin 35 (2017) 235–243

1.9.3 Tratamiento quirúrgico

El injerto autólogo de melanocitos es la alternativa quirúrgica de elección en formas localizadas de vitiligo estable o que no evidencien actividad inflamatoria o cambios de tamaño por un período no menor a dos años (Lee et al, 2005). El área donadora debe ser de preferencia pilosa y oculta como la región sacra y pueden obtenerse los injertos de diversas formas como por sacabocado o “punch” de 1.5 mm, por ampollas de succión utilizando una fuente de calor o luz infraroja por afeitado superficial o con cureta o por dermoabrasión (Quezada et al, 2011) (Agrawal and Agrawal, 1995).

Se debe quitar superficialmente la epidermis del área receptora con vitiligo para posteriormente injertar en forma de microinjerto o por aposición oclusiva de la suspensión de queratinocitos en el caso de la dermoabrasión o del curetaje superficial (Anbar et al, 2008). Además se puede mejorar el porcentaje de éxito con la combinación de tratamientos como el uso de pulsos de esteroides y la fototerapia con UVB-BE 311nm o luz excimer de 308nm (Khandpur et al, 2005).

1.9.4 Otros procedimientos en consultorio

Se pueden realizar diferentes procedimientos en consultorio para optimizar o acelerar resultados y asegurar adherencia al tratamiento domiciliario. Quizás el más realizado es la infiltración de betametasona o triamcinolona en diferentes concentraciones para lesiones pequeñas o localizadas. También se ha descrito el uso de láser ablativo fraccionado con CO₂ o Erbium-Yag 2940nm y el tratamiento con microagujas (*microneedle*) para revitalizar o estimular citoquinas inflamatorias (Uan et al, 2016) y también para facilitar el transporte – *delivery*- de algunos tratamientos. (Beltraminelli et al, 2011)

1.9.5 Terapias Dirigidas –TARGET-

Los recientes descubrimientos de la vía de respuesta inmune guiada por IFN γ sugieren que tomándola como “target” con sus efectores inhibidores, receptor de IFN γ , JAKs, y transductores de señales y activadores de transcripción 1 (STAT1), CXCR3 o CXCL10, se desarrollarán estrategias efectivas y nuevos tratamientos. (Figura 1.5).

Diferentes moléculas pequeñas inhibitoras han sido desarrolladas para bloquear estas moléculas y usadas en otras patologías autoinmunes incluyendo psoriasis, artritis reumatoidea y enfermedad de Cröhn.

El tofacitinib oral y el ruxolitinib son dos inhibidores JAK con diferente selectividad que han sido recientemente reportados como efectivos en vitíligo y alopecia areata (Liu et al, 2017). Debido a su administración sistémica y el hecho que podría ocasionar efectos indeseados por la inmunosupresión generalizada; por esto, se está usando en forma tópica (Craiglow; 2016).

1.9.5.1 Citrato de tofacitinib

El citrato de tofacitinib es un nuevo agente terapéutico que actúa como inhibidor Janus kinasa (JAK)-1/3 y es utilizado para diferentes patologías inflamatorias como la artritis reumatoidea.

Tiene beneficios en el tratamiento de la dermatitis atópica por inhibir la exagerada respuesta inmune de la vía Th2. La interleuquina-4 es crucial en promover la diferenciación de las células Th2 que liberan múltiples citoquinas como la IL-4, IL5, IL10, IL13. Como la señalización de IL-4 es mediada por la vía STAT-6 y JAK-1/3, este target terapéutico es inhibido por tofacitinib.

En alopecia areata y vitíligo, la citotoxicidad de las células T CD8+ y NKG2D+ y el aumento de la expresión de interferón están implicados en la inducción de enfermedad. En alopecia areata, la producción de interferón de células T CD8+ lleva al colapso del privilegio inmune y un incremento en la producción de IL-15, propagando la destrucción autoinmune del folículo piloso. Mientras que en vitíligo, la elevación de IFN- γ induce expresión de CXC que modifica a las quimioquina- CXCL10 en los queratinocitos mediando despigmentación. Como la señalización de IFN- γ ocurre a través de la vía JAK-STAT, su efecto puede ser inhibido por tofacitinib.

Los efectos adversos más comunes del tofacitinib incluyen infecciones oportunistas, diarrea, dolor de cabeza e hipertensión. Tofacitinib puede inducir hiperlipidemia, neutropenia, linfopenia, anemia y hepatitis.

Craiglow y colaboradores reportaron el primer éxito terapéutico de tofacitinib en vitíligo y alopecia areata. En un paciente con alopecia areata asociada a vitíligo extenso y progresivo, hubo una respuesta clínica a los dos meses de tratamiento con casi completa repigmentación de frente y manos a los cinco meses, mientras que en la alopecia areata, una casi completa repoblación de cabello luego de 8 meses de tratamiento (Craiglow and King, 2014).

1.9.5.2 Ruxolitinib

El Ruxolitinib es una molécula pequeña que actúa como potente inhibidor de Janus quinasa (JAK). Está actualmente aprobada para el tratamiento de la mielofibrosis y policitemia vera de riesgo intermedio o alto.

Esta molécula, interfiere con la señalización IFN- γ por inhibición preferencial de JAK 1 y JAK 2. Se demostró que ruxolitinib bloquea la vía IFN revirtiendo alopecia areata (AA) en pacientes y también en modelo murino de AA. También se comprobó con esta molécula, que la quimioquina-ligando (CXC) 10 (CXCL10), inducida por IFN γ es crítica para el reclutamiento autoreactivo de células T en la piel durante la progresión y el mantenimiento del vitíligo, y la hipótesis de que el objetivo del eje de citoquinas IFN γ - CXCL10 podría ser un tratamiento efectivo al reducir la producción de CXCL10.

En un ensayo de prueba de concepto, se utilizó con éxito ruxolitinib al 1,5% en crema de aplicación tópica y se administró a una serie de pacientes con vitíligo para usar dos veces al día durante 20 semanas (Rothstein et al, 2017).

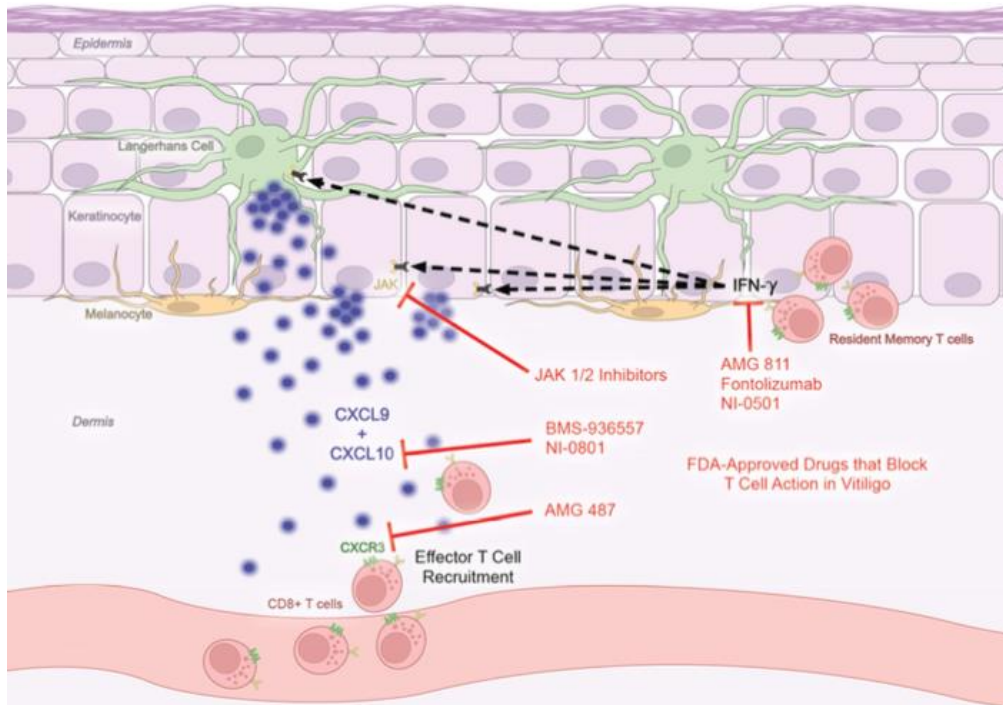


Figura 1.5. IFN- γ señala a queratinocitos y células de Langerhans, estimulando la producción de CXCL9 y CXCL10. CXCR3 reconoce estas quimiocinas, lo que lleva al reclutamiento de células T CXCR3+ CD8+. Las células T autoreactivas destruyen a los melanocitos y establecen una memoria residente de larga duración en la piel. Los medicamentos dirigidos a estas vías se muestran en rojo (Frisoli and Harris; 2017)

1.9.6 Vitiligo, apoyo psicológico y calidad de vida

Es imprescindible que el dermatólogo reconozca el estado emocional de los pacientes con esta dermatosis para su manejo en conjunto con otras disciplinas médicas que incluya psicólogo el cual eventualmente puede formar grupos de autoayuda y si se requiere, utilizar psicofármacos. El maquillaje camuflaje es utilizado también como parte de la terapia y resulta efectivo para disminuir la ansiedad y mejorar la autoestima en pacientes con lesiones en áreas expuestas como cara y manos (Tedeschi et al, 2007).

2 HIPÓTESIS

El vitíligo es una enfermedad de la piel en la que el sistema inmune juega un papel clave tanto en su inicio como en su perpetuación. Aunque existen muchas incógnitas al respecto, se cree que tanto el sistema inmune innato como el adaptativo estarían involucrados. Una de las características más importantes del vitíligo es la estigmatización que sufren los pacientes, por lo que la evaluación psicológica es un elemento importante en el seguimiento del tratamiento.

Nuestra hipótesis de trabajo es que los pacientes con vitíligo presentan elementos de la respuesta inmune innata y de la respuesta inmune adaptativa alterados respecto a los individuos control, y que estos elementos pueden normalizarse tras un tratamiento adecuado, que se verifiquen tanto clínicamente al pigmentar las lesiones como psicológicamente al finalizar el tratamiento.

3 OBJETIVOS

En consonancia con esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo principal

- 1) Estudiar factores inmunológicos y psicológicos en pacientes con vitíligo no segmentario, para poder establecer las posibles modificaciones después de un tratamiento efectivo y la utilidad de algunos de ellos como marcadores de actividad y/o de respuesta al tratamiento.

Objetivos secundarios

- 1) Determinar los niveles del receptor de la inmunidad innata CD91, tanto su forma de membrana expresada en monocitos como su forma soluble presente en el plasma de individuos con vitíligo antes y después del tratamiento.
- 2) Analizar las células T reguladoras del sistema inmune adaptativo en sangre periférica de individuos con vitíligo antes y después del tratamiento.
- 3) Cuantificar la quimiocina CXCL10 en el plasma de individuos con vitíligo antes y después del tratamiento.
- 4) Evaluar psicológicamente a los individuos con vitíligo antes y después del tratamiento.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Pacientes

En el presente estudio reclutamos 43 pacientes; 21 pacientes con vitíligo no-segmentario, 10 hombres y 11 mujeres, procedentes del departamento de dermatología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en Barcelona, España. Como individuos control se seleccionaron 22 voluntarios donantes sanos del mismo hospital. Fueron descartados cualquier paciente o voluntario sano que presentara inmunosupresión de cualquier tipo o enfermedades crónicas o que estuviera sometido a cualquier tratamiento que pudiera alterar el sistema inmunológico. El estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital y todos los pacientes completaron un informe de consentimiento.

Todos los pacientes con vitíligo tenían enfermedad progresiva, es decir, aumento de tamaño de lesiones preexistentes y/o aparición de nuevas lesiones dentro de los 6 meses previos al estudio según lo indicado por el paciente. La extensión del vitíligo se midió por el índice de puntuación del área del vitíligo (VASI), análogo al índice de gravedad del área de psoriasis utilizado para la psoriasis. El VASI total corporal se calculó usando la siguiente fórmula al considerar la contribución de todas las regiones del cuerpo (rango posible, 0-100).

$$\text{VASI} = \sum(\text{toda la superficie corporal}) (\text{unidades de mano}) \cdot (\text{despigmentación}).$$

Los pacientes con vitíligo fueron sometidos a un examen dermatológico completo al ojo desnudo y con lámpara de Wood, en nuestro departamento de dermatología que incluía piel y mucosas para excluir cualquier patología dermatológica asociada. Los datos demográficos de los pacientes incluían edad, sexo, tipo de vitíligo (generalizado, localizado o universal) y área de superficie cutánea comprometida (VASI). La evaluación fue realizada por un único especialista con la evaluación al ojo desnudo y con la ayuda de la lámpara de Wood. El grado de repigmentación fue dividido en cuatro categorías: Sin repigmentación, moderada repigmentación (<50%), buena repigmentación (51-75%) y excelente repigmentación (76-100%). Los pacientes fueron sometidos a control fotográfico y los datos demográficos y clínicos recopilados en la historia clínica como instrumento (ver anexo).

Todos los pacientes se sometieron al protocolo habitual de tratamiento descrito por el Dr Agustín Alomar (Alomar, 1992) y utilizado en el hospital de la Santa

Creu i Sant Pau, que consiste en la aplicación de Tacrolimus en pomada al 0.1% cada 12 horas en las máculas acrómicas. Además, fototerapia con Ultravioleta B de banda estrecha (UVB-BE o *ultraviolet B narrow band* UVB-NB) dos veces por semana con la aplicación previa 30 minutos antes de kellina 3% en fórmula magistral en cremagel hidrófilo y suplementación oral con Nutricéutico en cápsulas de administración oral que contienen 480mg de Polipodyum leucotomos, 5µg Vitamina D, 2 mg Luteina, 20 Vit C, 3mg Vit E y 1mg Licopeno.

Todo el protocolo del estudio fue realizado según los criterios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975. Para iniciar la fototerapia con UVB-NB 311nm se calculó la dosis eritematosa mínima. Se comenzó el tratamiento con 150mj/cm² y se incrementó en 20mj/cm² semanalmente y según tolerancia.

4.1.1 Criterios de inclusión

Sujetos con vitíligo:

- Hombres y mujeres adultos
- Sin enfermedad aparente asociada
- Diagnóstico de vitíligo no segmentario
- Enfermedad progresiva: aumento de tamaño de lesiones preexistentes y/o aparición de nuevas lesiones dentro de los 6 meses previos al estudio
- Sin uso de medicación por al menos 4 semanas y sin uso de esteroides o antiinflamatorios no esteroideos
- Firma de consentimiento informado

Sujetos controles:

- Hombres y mujeres adultos
- Sujetos sin evidencia clínica de lesiones de vitíligo y sin enfermedad autoinmune o cualquier enfermedad crónica o aguda.
- Firma de consentimiento informado

4.1.2 Criterios de exclusión

Sujetos con vitíligo:

- Pacientes < de 18 años
- Pacientes con vitiligo segmentario.
- Pacientes que estén en uso de esteroides o algún antiinflamatorio no esteroideo.
- Paciente con cualquier patología crónica, dermatológica o autoinmune asociada

Sujetos controles:

- Sujetos con alguna patología sistémica autoinmune o con lesiones de vitiligo
- Sujetos que se nieguen a firmar consentimiento informado

4.1.3 Criterios de retirada y análisis previstos de las retiradas y abandonos

- Pacientes que no acudan a controles o a la fecha combinada para extracción de muestras.
- Pacientes que evidencien patología infecciosa, crónica o autoinmune durante el estudio.
- Pacientes que no realicen el tratamiento indicado o lo realicen de una forma irregular.

4.2 Material de Tratamiento e instrumento

- Cabina Waldmann de fototerapia UVB-NB 311 nm con 24 bulbos Phillips TL-01.
- Tacrolimus ungüento 0.1%
- Kellina crema 3% formulado magistralmente en Base cremagel hidrófilo
- Nutricéutico en cápsulas de administración oral que contienen 480mg de Polipodyum leucotomos, 5µg Vitamina D, 2 mg Luteina, 20 Vit C, 3mg Vit E, 1mg Licopeno.
- Instrumento de Datos
- Historia Clinica
- Control Fotográfico

4.3 Evaluación dermatológica

4.3.1 Evaluación clínica

Se realizó evaluación dermatológica examinando el grado de extensión, el tiempo de evolución de las lesiones y su ubicación. Se utilizó además lámpara de Wood para precisar lesiones difusas y en pacientes de piel clara. También con dermatoscopio para evaluar islas de pigmento o presencia o ausencia de poliosis (leucotriquia). Se utilizó la escala VASI para medir grado de extensión de lesiones. La respuesta al tratamiento se evaluó teniendo en cuenta la repigmentación. Se consideraron los grados de repigmentación como inexistente o mínima (0 a 25%), moderada (26 a 50%), buena (51 a 75%) y excelente (mayor de 75%).

4.3.2 Vitiligo Area Severity Index (VASI)

Para calcular el VASI primero calculamos el área de superficie corporal (BSA) afectada. Para esto se divide el cuerpo del paciente en seis regiones separadas: manos, extremidades superiores, tronco, extremidades inferiores y pies. El área de la cara y el cuello se evalúan por separado.

La unidad de una mano del paciente (la palma más la superficie volar de los dedos) se usa como guía para estimar el porcentaje inicial de afectación del vitiligo en cada región del cuerpo.

Las áreas afectadas en cada región se miden en unidades de mano (una unidad de mano se define como el tamaño de la palma y es igual al 1% de la superficie del cuerpo). Por ejemplo, si el área de la piel involucrada es equivalente a cinco unidades de mano, se considera que el 5% del cuerpo está involucrado con el vitiligo.

Se debe determinar el porcentaje de despigmentación para cada área.

El porcentaje de despigmentación se calcula al más cercano de los siguientes porcentajes: 0, 10, 25, 50, 75, 90 o 100%.

1.00 (100%) - despigmentación completa, no hay pigmento presente; .90 (90%) - manchas de pigmento presentes .75 (75%) - el área despigmentada excede el área pigmentada; .50 (50%) - las áreas pigmentadas y despigmentadas son iguales .25 (25%) - el área pigmentada excede el área despigmentada; .10 (10%): solo manchas de despigmentación presentes. (Figura 4.1.)

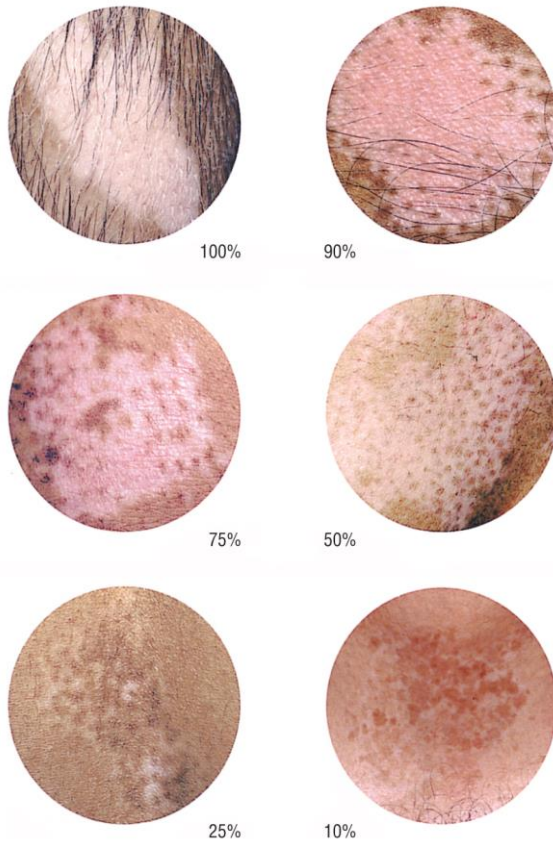


Figura 4.1. Ejemplo de evaluaciones estandarizadas para estimar el grado de pigmentación para derivar el índice de puntuación para el vitiligo. 100% de despigmentación, no hay pigmento presente; 90%, hay manchas de pigmento; 75%, el área despigmentada excede el área pigmentada; al 50%, las áreas despigmentadas y pigmentadas son iguales; al 25%, el área pigmentada excede el área despigmentada; y al 10%, solo están presentes motas de despigmentación (Hamzavi, Jain; 3004)

Luego de calcular el área de despigmentación por zonas, se puede determinar la despigmentación total de todo el cuerpo. El porcentaje total de despigmentación de todo el cuerpo, se obtiene de la sumatoria de los totales para cada región.

Vitiligo Area Severity Index (VASI) = Σ [Unidades Mano] X [Despigmentación residual]

Ejemplo de trabajo de la fórmula VASI:

Si la región de Extremidades superiores tiene 2 unidades de mano (2%) de BSA afectadas, y es 0.75 (75%) despigmentada, entonces la despigmentación total de las Extremidades superiores es 1.5% del cuerpo

(0.75 x 2 = 1.5%)

Si la región de Cara / Cuello tiene 5 unidades de mano (5%) de BSA afectadas, y las áreas despigmentadas son 1.00 (100%) despigmentadas, entonces la despigmentación total de Cara / Cuello es del 5% del cuerpo. (5 x 1 = 5%)

La despigmentación total de todo el cuerpo se encuentra al sumar los totales. En el ejemplo anterior, la despigmentación total es del 6.5% (1.5% + 5% = 6.5%)

4.4 Evaluación inmunológica

4.4.1 Obtención de muestras

La primera extracción sanguínea se realizó justo antes del inicio del tratamiento, y la segunda, a las 16 semanas después del inicio del mismo. Los controles sanos fueron sometidos a una única extracción. Todas las muestras de sangre total fueron obtenidas por punción venosa periférica con EDTA como anticoagulante. Para la obtención del plasma, se centrifugó parte de la muestra de sangre a 1600 g durante 10 minutos y se recolectó el sobrenadante. El plasma se guardó congelado hasta su procesamiento.

4.4.2 Análisis del receptor de la inmunidad innata CD91

CD91 es un receptor de la inmunidad innata que se expresa en la membrana de los monocitos y que sufre procesos de escisión que dan lugar a una forma soluble que se encuentra en el plasma sanguíneo. Para determinar la forma de membrana (mCD91) utilizamos la técnica de la citometría de flujo, mientras que para cuantificar la forma soluble (sCD91) lo hicimos por la técnica de ELISA.

4.4.2.1 *Expresión de mCD91 en monocitos mediante citometría de flujo*

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico que permite medir características físicas de células vivas. Para ello, el citómetro forma un flujo laminar y las células pasan individualmente delante de un láser. Cuando el láser incide sobre la célula los detectores miden el grado y la dirección de la luz desviada determinando así el tamaño, forma y estructura de la célula (gráfico FS:SS). Si estas células han sido previamente marcadas con una o más moléculas fluorescentes, llamadas fluorocromos, el láser las excitará dando lugar a una fluorescencia que es cuantificable. Para la determinación de proteínas de membrana como mCD91 mediante citometría de flujo, podemos

utilizar anticuerpos que reconocen la proteína de interés y que tienen unido covalentemente un fluorocromo, en nuestro caso la ficoeritrina (PE).

El protocolo utilizado para la determinación de mCD91 en monocitos fue:

1. Poner en un tubo de citometría 5 μ L del anticuerpo anti-mCD91-PE (clon A2MR-a2, *eBiosciences*) y 5 μ L del anticuerpo anti-CD4-PC7 (clon SFC112T4D11, *Beckman Coulter*).
2. Añadir 100 μ L de sangre.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lisar con el aparato *TQ-Prep* (*Beckman Coulter*) que realiza una lisis osmótica de los hematíes (ácido fórmico al 1,2%), estabiliza el pH (Na_2CO_3 50mM, NaCl 250 mM y Na_2SO_4 200mM) y fija las células (paraformaldehído 1%) de manera automática.
5. Pasar las muestras por el citómetro *Navios* y analizar en el programa *Kaluza*, ambos de *Beckman Coulter*.

Los monocitos fueron seleccionados en función de su morfología (SS) y de su positividad para CD4. Los niveles de expresión de mCD91 fueron determinados en base a la intensidad media de fluorescencia (*mean fluorescence intensity, MFI*) dentro de la población de monocitos seleccionada (Gráfico 4.1).

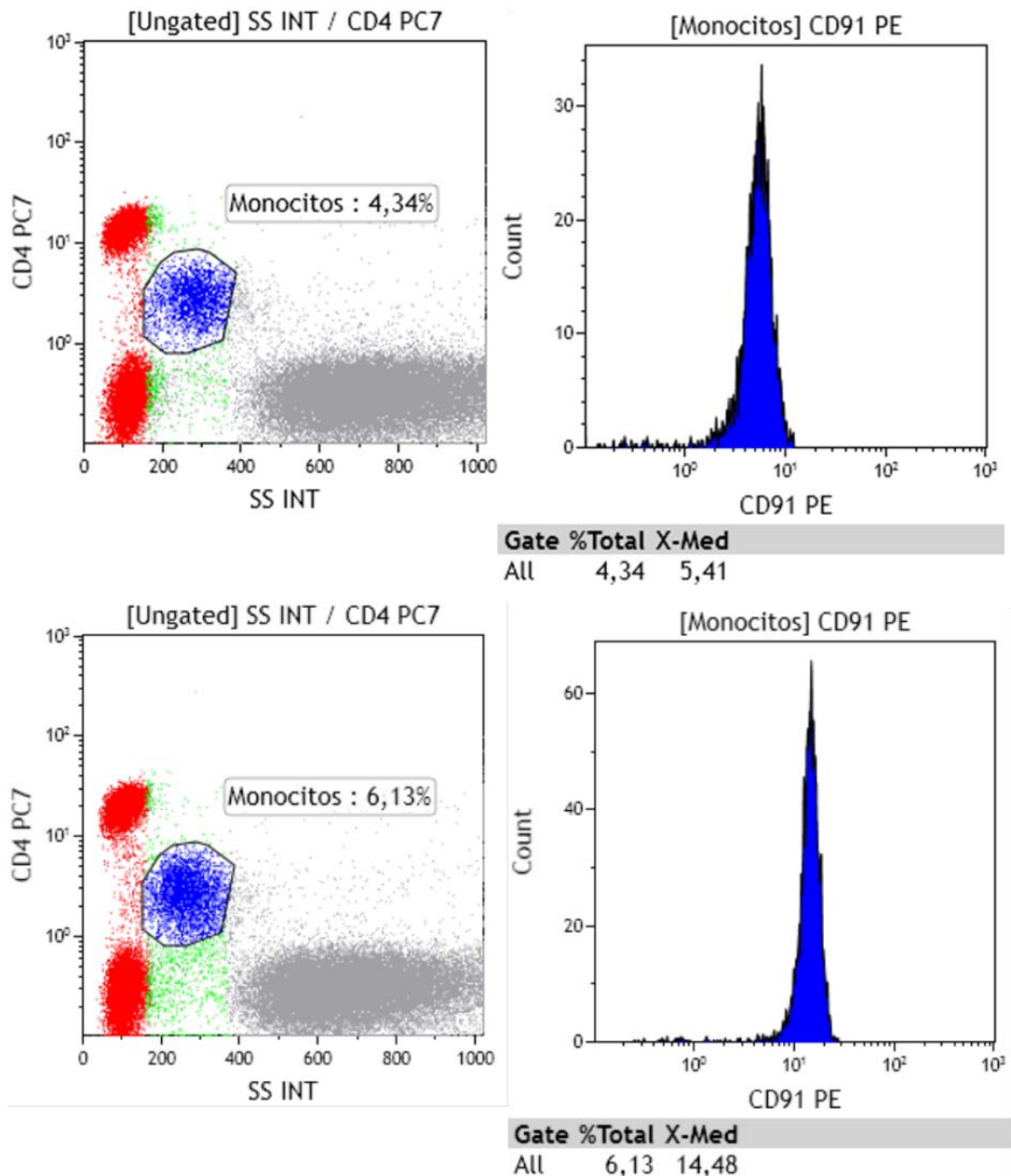


Gráfico 4.1. Imágenes representativas de dos análisis de la expresión de mCD91 en monocitos por citometría de flujo. En las imágenes de la izquierda se puede observar cómo se seleccionan los monocitos en base a su morfología (SS INT) y a la tinción con CD4 (CD4 PC7), y en las de la derecha el valor de la MFI (X-Med) de mCD91. En el primer caso este valor es de 5.41 (A) y en el segundo de 14.48 (B).

4.4.2.2 Cuantificación de sCD91 en plasma mediante ELISA

La técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) permite la determinación de moléculas, como el sCD91, mediante la unión de anticuerpos

específicos unidos a enzimas que son capaces de generar un producto estable que puedan ser cuantificado, por ejemplo, cambio de color.

El protocolo utilizado para la determinación de sCD91 en plasma fue el aconsejado por la casa comercial suministradora del kit (SEB010Hu, *USCN Life Science Inc*):

1. Preparar la curva estándar a partir del stock suministrado en el kit.
2. Diluir las muestras de plasma 1 en 5000 en PBS (Tampón fosfato 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2) mediante dilución seriada: 10 μ L de plasma más 490 μ L de PBS y de aquí coger 10 μ L y mezclar con 990 μ L de PBS.
3. Añadir 100 μ L de cada uno de los estándares, 100 μ L de PBS para el blanco y 100 μ L de cada una de las muestras diluidas 1 en 5000, a cada uno de los pocillos de la placa de ELISA.
4. Sellar e incubar la placa durante 1 hora a 37°C.
5. Aspirar el contenido de los pozos y añadir 100 μ L del reactivo A.
6. Sellar e incubar la placa durante 1 hora a 37°C.
7. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 3 veces con 350 μ L/pozo de solución de lavado, esperando 2 minutos entre lavado y lavado.
8. Secar bien la placa por inversión en papel y añadir 100 μ L del reactivo B.
9. Sellar e incubar la placa durante 30 minutos a 37°C.
10. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 5 veces con 350 μ L/pozo de solución de lavado, esperando 2 minutos entre lavado y lavado.
11. Secar bien la placa por inversión en papel y añadir 90 μ L de la solución de sustrato.
12. Sellar e incubar la placa durante 15 minutos a 37°C. Proteger de la luz.
13. Añadir 50 μ L de la solución de stop y mezclar con cuidado.
14. Leer inmediatamente en el espectrofotómetro a 450 nm con filtro de 620 nm.

La concentración de sCD91 expresada en pg/mL se obtuvo por intrapolación de los valores de absorbancia en la curva de los estándares obtenida en cada ensayo.

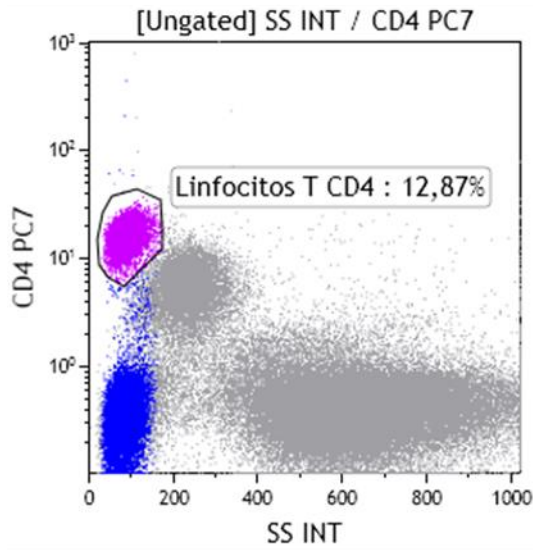
4.4.3 Análisis de las células T reguladoras

Las células T reguladoras son un elemento clave en la supresión de la respuesta inmune adaptativa. Existen diferentes metodologías para la determinación de este subtipo celular. En este estudio analizamos las células T reguladoras en base a la expresión de las moléculas de superficie CD4, CD45RO, CD25 y CD127. Para ello, utilizamos la técnica de la citometría de flujo.

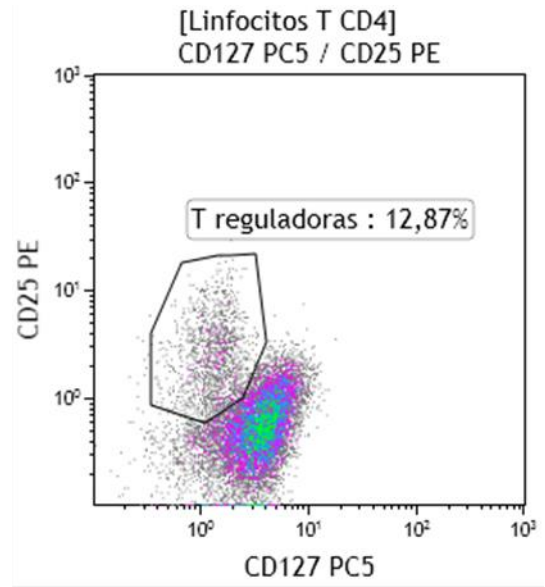
El protocolo utilizado para la determinación de las células T reguladoras fue:

1. Poner en un tubo de citometría 5 μ L del anticuerpo anti-CD4-PC7 (clon SFC112T4D11), 5 μ L del anticuerpo anti-CD25-PE (clon B1.49.9), 5 μ L del anticuerpo anti-CD127-PC5 (clon R34.34) y 5 μ L del anticuerpo anti-CD45RO-FITC (clone UCHL1) todos ellos de *Beckman Coulter*.
2. Añadir 100 μ L de sangre.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
4. Lisar con el aparato *TQ-Prep*.
5. Pasar las muestras por el citómetro *Navios* y analizar en el programa *Kaluza*.

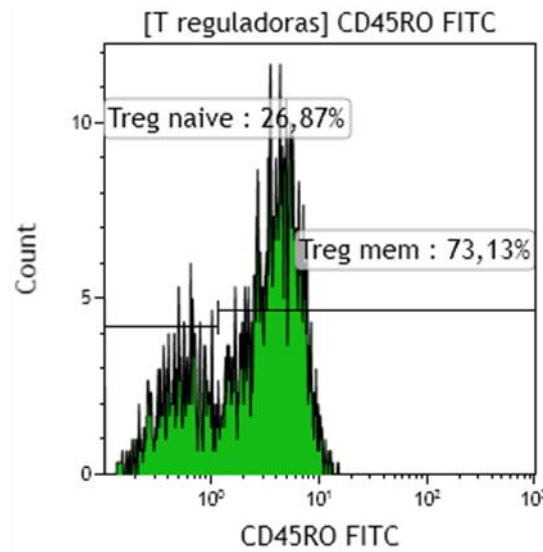
Tanto las células T reguladoras como las células T reguladoras memoria fueron seleccionadas en función de su morfología (SS), su positividad para CD4, su alta expresión de CD25 y su baja expresión de CD127 (CD4+ CD25high CD127low). Las células T reguladoras memoria, son T reguladoras que expresan el marcador CD45RO. En ambos casos se evaluó el porcentaje de estas células dentro de la población de linfocitos T CD4 (Gráfico 4.2).



Gate	Number	%Gated
All	100.000	100,00
Linfocitos T CD4	12.868	12,87



Gate	Number	%Gated
All	12.868	100,00
T reguladoras	1.656	12,87



Gate	Number	%Gated
All	1.656	100,00
Treg mem	1.211	73,13
Treg naive	445	26,87

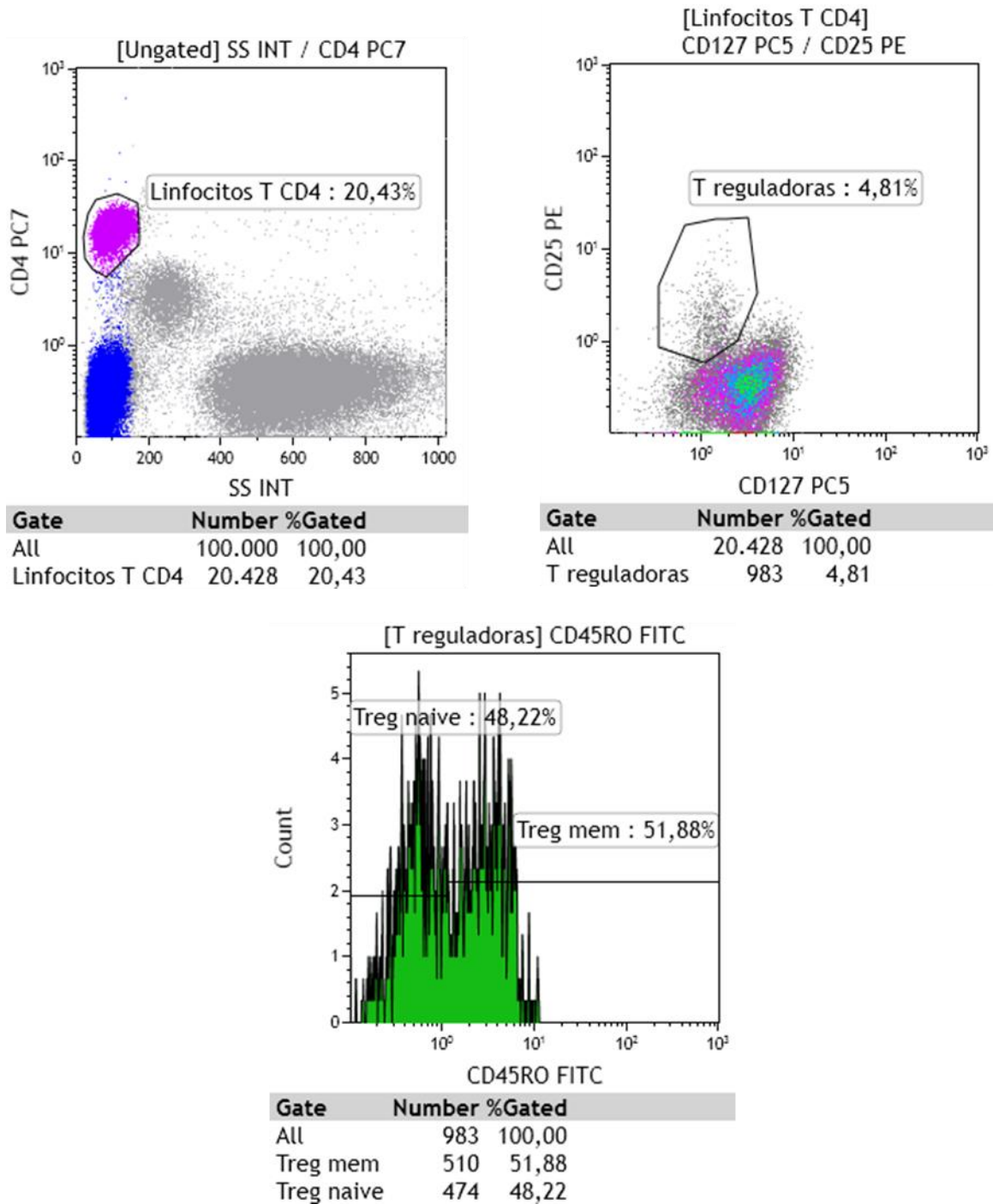


Gráfico 4.2. Imágenes representativas de dos análisis de células T reguladoras por citometría de flujo. En las imágenes de la izquierda se puede observar cómo se seleccionan los linfocitos T CD4 en base a su morfología (SS INT) y a la tinción con CD4 (CD4 PC7), y en las de la derecha cómo se seleccionan las células T reguladoras en base a su alta expresión de CD25 (CD25 PE) y su baja expresión de CD127 (CD127 PC5). En las imágenes centradas se ve cómo se diferencian las poblaciones de células T reguladoras en memoria (Treg mem) o naive (Treg naive) en función de su positividad o negatividad para CD45RO (CD45RO FITC).

4.4.4 Cuantificación de la quimiocina CXCL10 en plasma

La quimiocina CXCL10 está implicada en la señalización mediada por el interferón- γ . Su determinación indica el grado de activación y el tipo de respuesta inmune implicada. Para su cuantificación utilizamos la técnica de ELISA.

El protocolo utilizado para la cuantificación de CXCL10 en plasma fue una optimización del aconsejado por la casa comercial suministradora del kit (900-M39, *PeptoTech Inc.*):

1. Diluir el anticuerpo de captura a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS y añadir 100 μL a cada pozo de la placa de ELISA.
2. Sellar e incubar la placa toda la noche a temperatura ambiente.
3. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de lavado.
4. Secar bien la placa por inversión en papel y añadir 300 μL de solución de bloqueo.
5. Sellar e incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de lavado.
7. Preparar la curva estándar a partir del stock suministrado en el kit.
8. Añadir 100 μL de cada uno de los estándares, 100 μL de PBS para el blanco y 100 μL de cada una de las muestras sin diluir, a cada uno de los pocillos de la placa de ELISA.
9. Sellar e incubar la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.
10. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de lavado.
11. Añadir 100 μL del reactivo de detección.
12. Sellar e incubar la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.
13. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de lavado.
14. Añadir 100 μL de estreptavidina.
15. Sellar e incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
16. Aspirar el contenido de los pozos y lavar 4 veces con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de lavado.

17. Añadir 100 µL del sustrato TMB.
18. Sellar e incubar la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente. Proteger de la luz.
19. Añadir 100 µL de la solución de stop y mezclar con cuidado.
20. Leer inmediatamente en el espectrofotómetro a 405 nm con filtro de 620 nm.

La concentración de CXCL10 expresada en pg/mL se obtuvo por intrapolación de los valores de absorbancia en la curva de los estándares obtenida en cada ensayo.

4.5 Evaluación psicológica

La evaluación psicológica antes y después del tratamiento fue realizada mediante la utilización de diferentes instrumentos psicométricos y analizado por la psicóloga del Servicio de dermatología del hospital, la psicóloga Sandra Ros Abarca.

Los instrumentos psicométricos utilizados fueron la escala de estrés percibido PSS; el cuestionario HADS -Hospital Anxiety and Depression Scale- ; y el instrumento de medida de la calidad de vida en pacientes con enfermedades cutáneas *Skindex*.

El primer test psicométrico que se utilizó fue la Escala de Estrés Percibido Versión española (2.0) de la Perceived Stress Scale (PSS) (Cohen et al, 1983) adaptada por el Dr. Eduardo Remor (Remor, 2006).

Esta escala es un instrumento de auto informe que evalúa el nivel de estrés percibido durante el último mes, consta de 14 ítems con un formato de respuesta de una escala de cinco puntos (0 = nunca, 1 = casi nunca, 2 =de vez en cuando, 3 = a menudo, 4 = muy a menudo). La puntuación total de la PSS se obtiene invirtiendo las puntuaciones de los ítems 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13 (en el sentido siguiente: 0=4, 1=3, 2=2, 3=1 y 4=0) y sumando entonces los 14 ítems. La puntuación directa obtenida indica que a una mayor puntuación corresponde un mayor nivel de estrés percibido po la escala *Perceived Stress Scale* (PSS)

El segundo test fue el cuestionario Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) que se ha utilizado ampliamente en muestras de pacientes con

artrosis, cáncer, mujeres con depresión puerperal y pacientes con lesiones cerebrales traumáticas, entre otros, para medir los niveles de ansiedad y depresión en estas muestras observándose unas buenas propiedades psicométricas. Así pues, aunque existen muchos cuestionarios para evaluar la depresión y la ansiedad, el HADS ya se ha considerado útil en la evaluación de la fibromialgia. Dado el solapamiento existente en los síntomas médicos y psicológicos de la enfermedad, este cuestionario resulta más apropiado, puesto que se centra en la evaluación de los aspectos cognitivos de la ansiedad y la depresión, además de haber acreditado su sensibilidad al cambio.

Por último se empleó como instrumento para medir la calidad de vida el Skindex-29, un instrumento americano de calidad de vida orientado a pacientes con afectación cutánea y que está ampliamente validado.

El Skindex-29, fue desarrollado por la Dra. M Chren en inglés en los Estados Unidos de Norteamérica, en 1996 (Chren et al, 1996). Es un cuestionario auto administrado, que consta de 29 “ítems” agrupados en tres dominios: sintomático, emocional y funcional. Presenta 29 ítems y falta el 18, tal cual la versión original en inglés. Se excluyó el ítem 18, que se refiere al tratamiento, por considerarlo innecesario para esta evaluación.

La versión española fue adaptada transculturalmente por la Dra. María Jones-Caballero y col (Jones et al, 2000), quien proveyó toda la información y la autorización para llevar a cabo la investigación con el Skindex-29. Dicho test versión española, utiliza la misma estructura formal y de puntuación que la versión original estadounidense.

Puntuación: las opciones para responder que se brindaba a los sujetos fueron: Nunca: 0 puntos, raramente; 1 punto, a veces; 2 puntos, a menudo; 3 puntos; todo el tiempo, 4 puntos.

Se les solicitó a todos los participantes que contesten de acuerdo a sus síntomas, en las últimas cuatro semanas.

Para completar la escala se requirió de unos 5 a 10 minutos. El estudio se solicitó el consentimiento del paciente mediante una firma, aceptando realizarlo.

En el estudio, se efectuó la evaluación del Skindex-29, mediante pruebas psicométricas, para conocer la validez y confiabilidad del instrumento de

calidad de vida en los participantes, con el objetivo de saber si este test sería de utilidad.

4.6 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizaron diversas aproximaciones. Las variables analizadas fueron tanto los datos demográficos de la población a estudio, como los datos cuantificados de repigmentación, las determinaciones inmunológicas y los resultados de los test psicológicos. Para el análisis de muestras independientes se utilizó el test t-Student y el de Mann-Whitney. Para el análisis de muestras dependientes, antes y después del tratamiento, se utilizó el test Greenhouse-Geisser. En todos los casos, se consideró como p valor significativo aquellos menores de 0.05, aunque en los gráficos preferimos diferenciar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los paquetes estadísticos utilizados fueron IBM-SPSS (versión 24.0) y el GraphPad Prism (versión 5).

5 RESULTADOS

5.1 Características demográficas de los pacientes

De los 21 pacientes con vitiligo no segmentario incluidos en el estudio, 18 fueron analizados y tres abandonaron por diferentes razones. Las características demográficas y clínicas de los 18 pacientes finalmente incluidos en el estudio son mostradas en la tabla 5.1. Siete Acral/Acrofacial, diez Generalizados, uno localizado. La media de edad es 46 (rango 28-69) años. En uno de los pacientes no se observó ninguna repigmentación, moderada repigmentación en once, Buena repigmentación en cinco y excelente repigmentación (100%) en un paciente. La media de repigmentación fue de 48.6%.

Paciente	Iniciales/Edad/s exo	Tiempo de evolución (años)	Tipo de vitiligo	VASI pre-tratamiento (%)	VASI post-tratamiento (%)	Mejoría luego del tratamiento
1	JAMZ/30años/M	15	Acral/Acrofacial	14.1	4,8	65%
2	JMS/55años/M	20	Generalizado	16.8	9,2	45%
3	ALF/28años/F	15	Generalizado	22.4	6,8	70%
4	MMW/54años/F	3	Generalizado	30.0	13,6	55%
5	SBM/52años /M	<1 (6m)	Localizado	1.1	0	100%
6	OMD/32años/M	<1 (3m)	Acral/Acrofacial	2.7	1,6	40%
7	SIB/48años/M	5	Acral/Acrofacial	3.4	0,8	75%
8	CMR/47años/F	20	Generalizado	24.4	13,6	45%
9	RRM/69años/F	10	Generalizado	23.6	14	40%
10	MMS/50 años/F	19	Acral/Acrofacial	4.9	3,4	30%
11	MMR/48años/F	<1 (8m)	Generalizado	26,8	28,4	0%
12	FFS/33años/M	10	Generalizado	22,5	14,4	35%
13	JLA/40años/M	21	Acral/Acrofacial	2.6	1,7	35%
14	MCH/46años/F	1	Generalizado	21,2	10,4	50%
15	CFS/46años/F	25	Generalizado	38,8	23,2	40%
16	JGH/59años/M	5	Acral/Acrofacial	4.1	1,2	70%
17	LVT/30años/F	2	Acral/Acrofacial	4.8	2,6	45%
18	MCA/55años/F	20	Generalizado	21,0	13,5	35%
x	n= 45.6 años 8 masculino/10 femenino	n=10,7 años de aparición máculas	7 Acral/Acrofacial 10 Generalizado, 1 Localizado	n=14,07	n=9,06	n=48.6% repigmentación

Tabla 5.1 Características demográficas y clínicas y respuesta al tratamiento

La media de tiempo de duración de enfermedad fue de 10,7 años, aunque los pacientes fueron imprecisos al indicar el tiempo exacto de inicio de la patología. Se intentó correlacionar el tiempo de evolución de la enfermedad en años con la mejoría luego del tratamiento y el valor del coeficiente de correlación de

Pearson (no significativo, $R^2=0.045$) indicó que no hay relación entre las dos variables.

Algunas de las manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento se pueden observar en las figuras 5.1 a la figura 5.10.



Figura 5.1 Evaluación con lámpara de wood paciente JMS/55 años VASI 16,8



Figura 5.2 Paciente SIB/48 años VASI 3,4. Respuesta al tratamiento luego de 8 semanas y al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 0.8



Figura 5.3. Paciente ALF/28 años VASI 22,4. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 6,8



Figura 5.4 Paciente CFS/46 años VASI 38,8. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 23,2

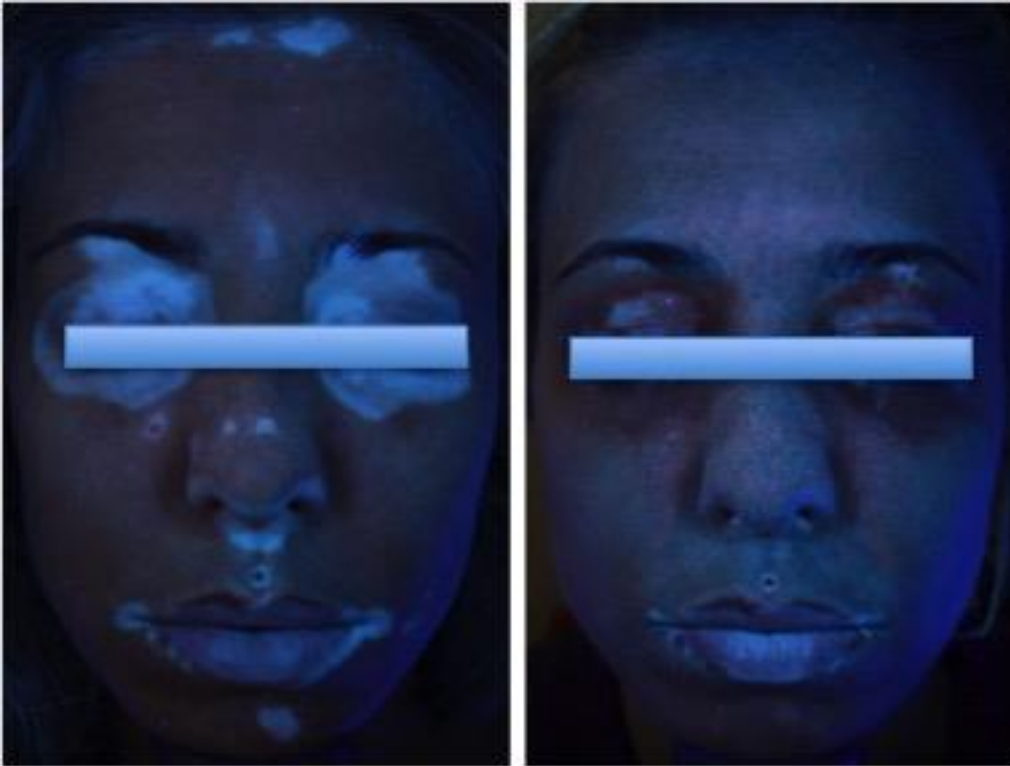


Figura 5.5. Paciente ALF/28 años VASI 22,4. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 6.8

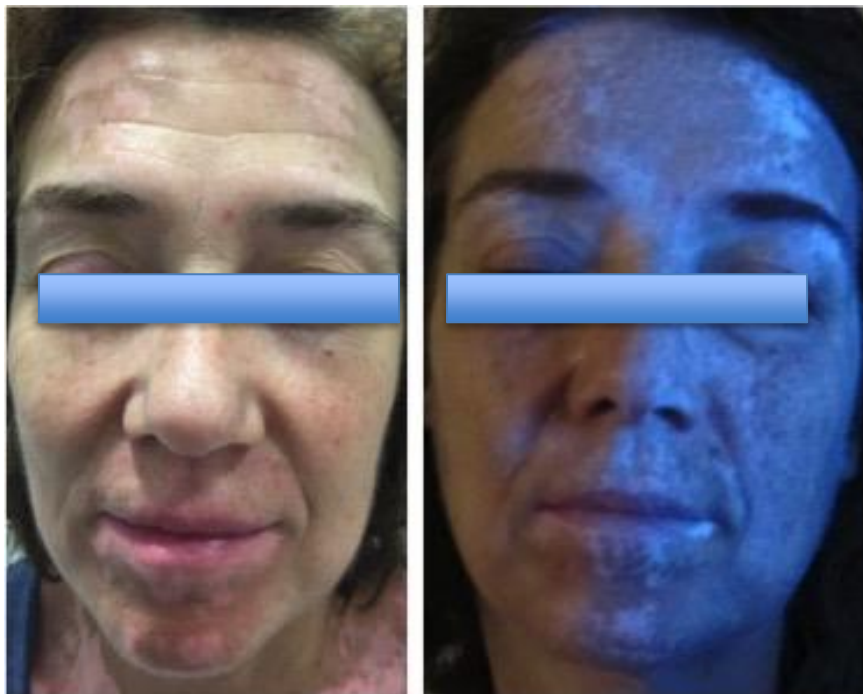


Figura 5.6. Paciente MMW/54años VASI 30. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 13.6



Figura 5.7. Paciente FFS/33años VASI 22,5. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 14,4



Figura 5.8. Paciente MCH/46años Vitiligo Generalizado VASI 21,2. Evaluación con lámpara de wood

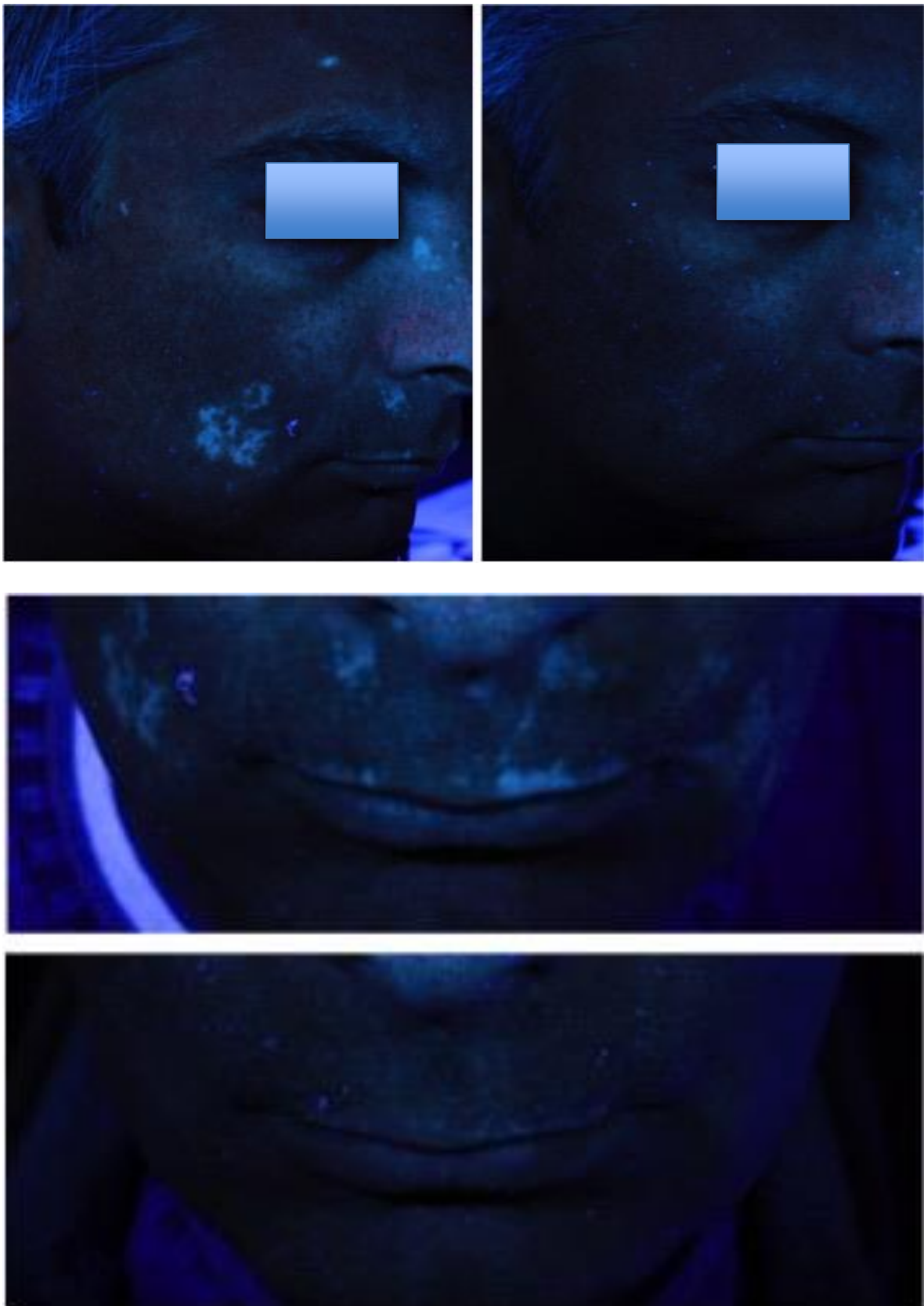


Figura 5.9. Paciente SBM/52 años VASI 1,1 Respuesta al tratamiento luego de 16 semanas VASI 0. Pigmentación del 100%



Figura 5.10 Paciente MCH/46años VASI 21,2. Respuesta al tratamiento al finalizar tratamiento luego de 16 semanas VASI 10,4



Figura 5.11 Paciente JAMZ/30años Vitiligo Acral/Acrofacial VASI 14.1



Figura 5.12. Paciente LVT/30años Vitiligo Acral/Acrofacial VASI 4.8 Respuesta al tratamiento luego de 16 semanas VASI 2,6 Repigmentación de 45%



Figura 5.13 Paciente OMD32años vitiligo Acral/Acrofacial VASI 2.7

5.2 Receptor de la inmunidad innata CD91

El análisis de CD91 en la membrana (mCD91) de los monocitos de sangre periférica mostró que los pacientes con vitíligo expresaban mayores niveles de mCD91 en términos de MFI que los individuos control ($p < 0.01$, Graf 3A). Este parámetro se mantuvo incrementado en los pacientes con vitíligo después del tratamiento (POST) con respecto a los controles ($p < 0.01$), no habiendo diferencias significativas entre antes (PRE) y después del tratamiento (POST) ($p = 0.54$, Graf. 3A). Tampoco hubo diferencias cuando teníamos en cuenta el grado de repigmentación (variable mejora), tanto si lo tomábamos como una variable continua como una discontinua, separando los pacientes en aquellos que presentaban una repigmentación superior al 50% ($>50\%$) de aquellos que presentaban igual o menor de un 50% de repigmentación ($<50\%$) (Graf 3C).

El análisis de CD91 soluble (sCD91) en plasma mostró que los pacientes con vitíligo presentaban niveles más bajos de sCD91 que los individuos control ($p < 0.05$) (Graf. 3B). Esta disminución era aún más significativa en los pacientes después del tratamiento respecto a los controles ($p < 0.01$, Graf 3B). Sin embargo, no existían diferencias significativas entre antes y después del tratamiento ($p = 0.65$, Graf 3B). Pero cuando teníamos en cuenta la variable mejora, parecía que había una mayor disminución con el tratamiento en aquellos pacientes que habían mostrado una mayor repigmentación ($>50\%$), aunque tampoco era estadísticamente significativa ($p = 0.39$, Graf 3D).

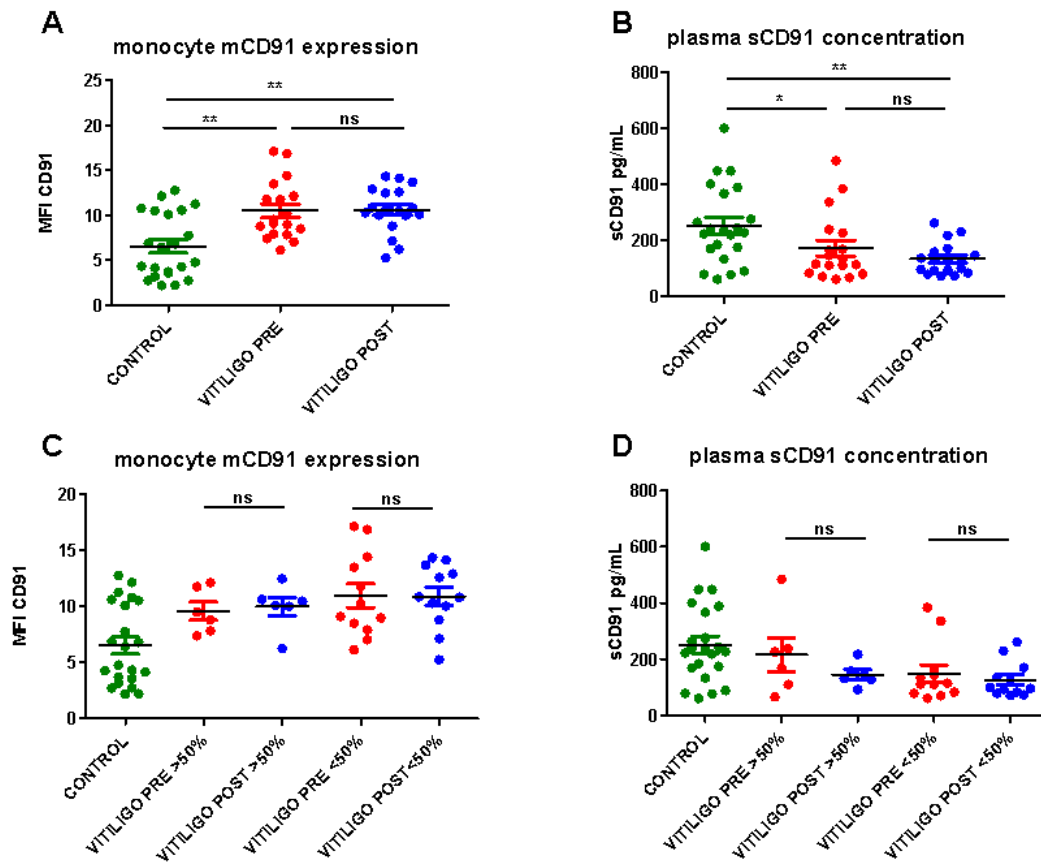


Gráfico 3. Representación gráfica de los valores de mCD91 en MFI y de sCD91 en pg/mL en los individuos control (verde) y los pacientes con vitiligo antes (PRE, en rojo) y después del tratamiento (POST, en azul). Los pacientes con vitiligo se separaron en dos grupos en función del grado de repigmentación: >50% y <50%. ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. GraphPad Prism software.

5.3 Células T reguladoras

El análisis de las células T reguladoras (Treg CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}) y de las células T reguladoras memoria (memory Treg: CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} CD45RO^{high}) en sangre periférica no mostró diferencias entre los pacientes con vitiligo y los individuos control. Tampoco se detectaron cambios al comparar estos niveles entre antes y después del tratamiento en el conjunto de los pacientes con vitiligo. Sin embargo, si teníamos en cuenta la variable mejora, tanto las células T reguladoras como las células T reguladoras memoria mostraban niveles inferiores en los pacientes que habían tenido una mayor repigmentación comparándolo con los que habían tenido una menor repigmentación ($p < 0.05$, Graf. 4A; $p > 0.05$, Graf. 4B).

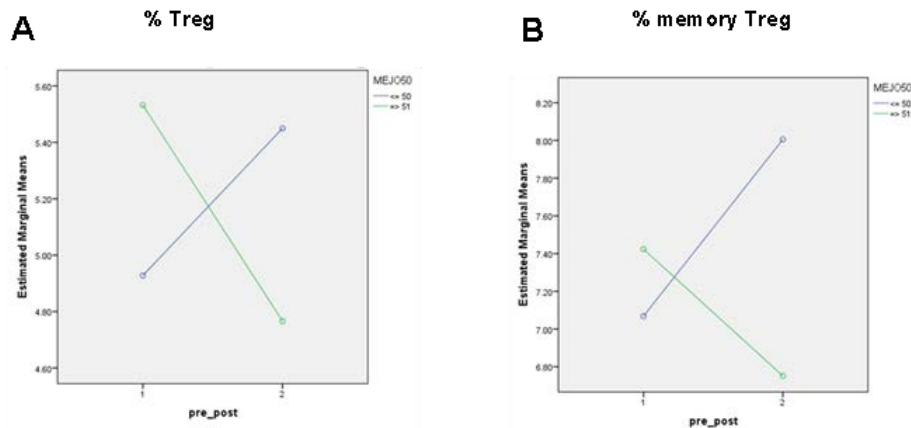


Gráfico 4. Representación gráfica de las tendencias de las células T reguladoras (Treg CD4+ CD25high CD127low) y de células T reguladoras memoria (memory Treg: CD4+ CD25high CD127low CD45ROhigh) en los pacientes con vitiligo que habían repigmentado más del 50% antes y después del tratamiento (en verde) y de los que habían repigmentado un 50% o menos (en azul). IBM-SPSS software.

5.4 Quimiocina CXCL10

El análisis de CXCL10 en plasma mostró que los pacientes con vitiligo tenían más cantidad de esta quimiocina que los individuos control ($p < 0.001$, gráfico 5A). Este incremento se daba también después del tratamiento ($p < 0.001$), no existiendo diferencias significativas entre antes y después del tratamiento en el conjunto de los pacientes con vitiligo ($p = 0.45$, gráfico 5A). Sin embargo, cuando teníamos en cuenta la variable mejora, los pacientes con una mayor repigmentación ($> 50\%$) presentaban niveles significativamente menores de CXCL10 respecto a los valores al inicio del tratamiento ($p < 0.01$, gráfico 5B). Aun así, estos valores posterior al tratamiento no se asemejaban a los de los individuos control, siendo más elevados, aunque con un menor grado de significación respecto a los pre-tratamiento vs controles ($p < 0.05$, Graf. 5B). Los pacientes con menor repigmentación no veían disminuida la cantidad de CXCL10 respecto a los valores iniciales antes del tratamiento ($p = 0.2$, Graf. 5C).

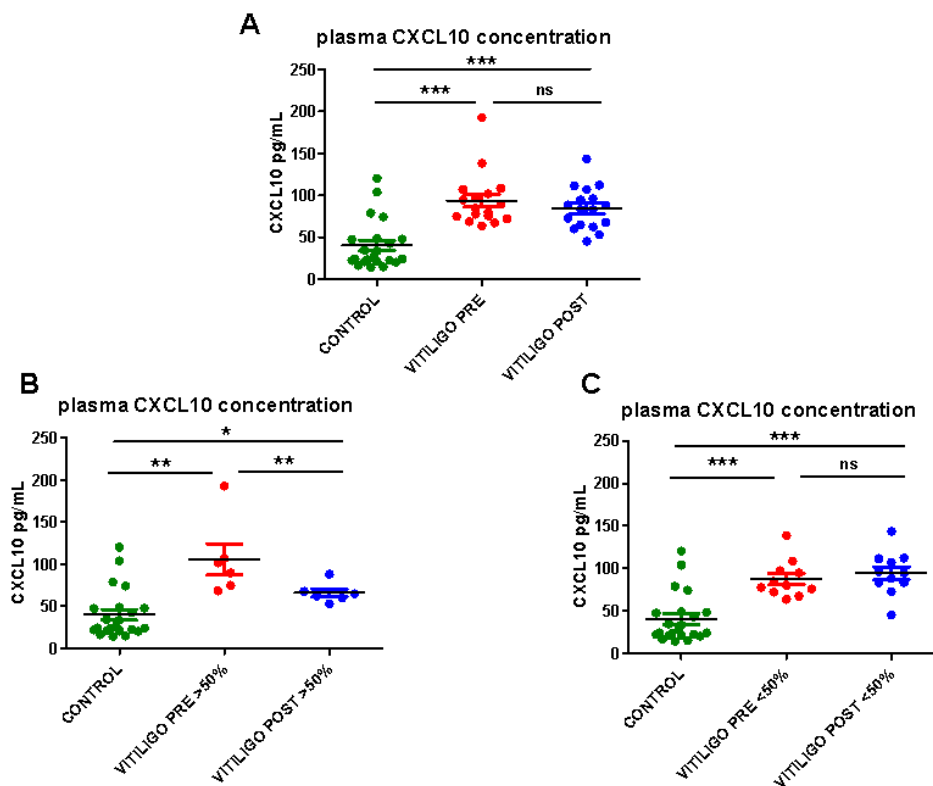


Gráfico 5. Representación gráfica de los valores de CXCL10 en pg/mL en los individuos control (verde) y los pacientes con vitiligo antes (PRE, en rojo) y después del tratamiento (POST, en azul). Los pacientes con vitiligo se separaron en dos grupos en función del grado de repigmentación: >50% y <50%. ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. GraphPad Prism software.

5.5 Test psicológicos

Doce de los dieciocho pacientes completaron la escala de estrés percibido PSS; el cuestionario HADS *-Hospital Anxiety and Depression Scale-* y el instrumento de medida de la calidad de vida en pacientes con enfermedades cutáneas Skindex-29, antes y después de 16 semanas de tratamiento.

Los resultados de los test psicológicos antes del tratamientos mostraron que diez de doce pacientes obtuvieron puntuaciones patológicas en el HADS en la visita 1. Siete de doce pacientes evidenciaron sintomatología ansiosa; nueve de doce tienen sintomatología ansiosa leve.

Dos de doce pacientes, tuvieron sintomatología depresiva. Cuatro de doce síntomas de depresión leve. Once de doce pacientes con altos niveles de estrés percibido (no definitivo).

Seis de doce pacientes evidenciaron en el Skindex alta afectación en la calidad de vida. Dos de doce pacientes tenían alguna alteración en escala sintomática previo al tratamiento, dato curioso en una enfermedad raramente con

sintomatología (se han descrito casos de escozor o picor en lesiones en aumento) y ambas pacientes tenían vitíligo generalizado con VASI por encima de 20% (21,2 y 38,8 respectivamente); diez de doce pacientes alteración en la escala emocional. Ocho de doce pacientes alteración en la escala funcional.

Luego de 16 semanas de tratamiento combinado solo uno de los doce pacientes tenía puntuación patológica en HADS total, solo un paciente evidenció signos de ansiedad y se trataba específicamente de la paciente que tenía mayor área de compromiso de vitíligo según escala VASI (paciente 15 VASI 38.8) y con una mejora de sólo 40% después del tratamiento.

Todos los pacientes superaron la depresión al finalizar las 16 semanas de tratamiento y sólo tres de los doce presentaban estrés percibido. Sólo uno de los pacientes tenía alteración en la calidad de vida.

Con respecto al Skindex ninguno presentó alteración en el área sintomática, dos en el área emocional y tres de doce en el área funcional.

El resumen de estos resultados pueden observarse en la tabla 6.

Antes de inicio del tratamiento	Luego de 16 semanas de tratamiento combinado	Significación (p)
10/12 pacientes obtienen puntuaciones patológicas en el HADS total visita 1	1/12 puntuaciones patológicas en HADS total	0.0006
7/12 pacientes sintomatología ansiosa clínicamente significativa (9/12 sintomatología ansiosa leve)	1/12 ansiedad	0.0272
2/12 pacientes sintomatología depresiva clínicamente significativa (4/12 sint depresión leve)	0/12 depresión	0.4783
11/12 pacientes con altos niveles de estrés percibido (no definitivo)	3/12 estrés percibido	0.0028
6/12 pacientes skindex con alta afectación en la calidad de vida	calidad de vida: 1/12	0.0686
Skindex escala sintomática 2/12 pacientes	skindex área sintomática: 0/12	0.4783
Skindex escala emocional: 10/12 pacientes	skindex área emocional: 2/12	0.0033
Skindex escala funcional : 8/12 pacientes	skindex área funcional : 3/12	0.0995

Tabla 6. Resultados de los test psicológicos

El estudio estadístico de las variables mostró que la mayoría disminuían de manera significativa ($p < 0,05$) a excepción de aquellas en las que se partía de un número bajo de afectados en la primera visita (pacientes con sintomatología

depresiva clínicamente significativa, incluso depresión leve; y en el skindex sintomático) y aquellos en los que la disminución fue menor (skindex emocional y funcional). Un mayor número de pacientes podría acabar de significar estas diferencias.

6 DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral evaluamos una cohorte de pacientes con vitíligo no segmentario que sometimos a un tratamiento efectivo combinado y observamos algunos factores inmunológicos como el receptor CD91, las células T reguladoras y el CXCL10 antes y después de 16 semanas de tratamiento. También realizamos test psicológicos de estrés, ansiedad, depresión y calidad de vida.

Por primera vez se estudia el CD91 en esta enfermedad. Ya había sido descrito la correlación positiva de este receptor en diferentes patologías como hemofilia A, cáncer y riesgo de trombosis venosa y arterial (Franchini, 2013).

Tomando en cuenta que no había sido estudiado en vitíligo, pero sabiendo que su coestimulación puede ser activada por diferentes HSP incluyendo la HSP-70 (Speeckaert, van Geel 2017), uno de los objetivos principales de este estudio, fue precisamente determinar los niveles del receptor de la inmunidad innata CD91, tanto su forma de membrana expresada en monocitos como su forma soluble presente en el plasma de individuos con vitíligo antes y después de un tratamiento efectivo.

CD91/LRP1

En las últimas tres décadas se ha explorado y caracterizado los diversos roles de las HSPs en el sistema inmune. Paralelo a la evolución de la respuesta innata, el organismo detecta el daño celular aberrante por la utilización de receptores pre-existentes como CD91 para identificar la presencia de abundantes moléculas intracelulares HSP. CD91 es el receptor de la respuesta innata clave para la endocitosis mediada por proteínas de choque y funciona como receptor de señalización. Tiene un papel clave en el proceso de inmunovigilancia de los tumores.

En nuestro estudio, cuantificamos el receptor de inmunidad innata CD91 en la membrana (mCD91) de los monocitos de sangre periférica evidenciando que los pacientes con vitíligo expresaban mayores niveles que los individuos controles y este parámetro se mantuvo incrementado después del tratamiento a pesar que los pacientes tuvieran una repigmentación mayor al 50%; sin embargo en el análisis del CD91 soluble en plasma (sCD91) se evidenció niveles más bajos comparado con los individuos controles y esta disminución era aún mayor después del tratamiento. El aumento en mCD91 se puede

explicar por el hecho que al haber activada una respuesta inmune, las UPR activan la producción de HSP70i y estas señales funcionan como DAMPs para activar las células dendríticas exponiendo el receptor de membrana CD91 para reclutar los linfocitos T CD8+.

Posiblemente, la mayor expresión de CD91 en membrana venga determinada genéticamente y condicione una mayor capacidad de reconocimiento y de presentación antigénica. De hecho, en infección por VIH se ha visto que los pacientes resistentes al virus tienen una mayor expresión de CD91 y que probablemente esto condicione una mayor presentación de antígenos víricos que condiciona una mejor respuesta a la infección (Kebba, et al 2005). En el caso de vitíligo podría ocurrir algo similar, en la que en un contexto de mayor presentación de antígenos del melanocito tendríamos mayor susceptibilidad al vitíligo.

Células T reguladoras Tregs

Las células Tregs tienen un rol protector importante en trastornos autoinmunes regulando la respuesta inflamatoria (Lin et al, 2014). En nuestro estudio, al analizar las células T reguladoras (Treg CD4+ CD25high CD127low) y las células T reguladoras memoria (memory Treg: CD4+ CD25high CD127low CD45ROhigh) en sangre periférica no se evidenciaron diferencias entre los pacientes con vitíligo y los controles. Tampoco se detectaron cambios al comparar estos niveles antes y después del tratamiento de los pacientes con vitíligo. Sin embargo, si teníamos en cuenta la variable mejora, tanto las células T reguladoras como las células T reguladoras memoria mostraban niveles inferiores en los pacientes que habían tenido una mayor repigmentación comparándolo con los que habían tenido una menor repigmentación. Este resultado puede parecer contrario a lo que quizás podríamos esperar, que sería que en pacientes que estén repigmentando tengan los niveles de células Tregs altos. Por otro lado, esto podría explicarse porque quizás en estos pacientes lo que ocurre es que hay mayor actividad de enfermedad y a pesar de tener niveles periféricos de Tregs bajos, tienen más posibilidad de pigmentar cuando se utiliza un tratamiento efectivo. Otra posibilidad es que las células Tregs estén bajas en sangre periférica porque se han ido a la piel y allí estén elevados.

En los estudios publicados en la literatura científica, hay resultados contrastantes (Macaluso et al, 2013). En un estudio en un grupo de pacientes en Egipto (Hegab et al; 2015), se encontró que había una disminución en el número de células Tregs en sangre periférica durante la fase inflamatoria del vitíligo.

Por otro lado, en un estudio realizado en Roma, Italia en 2013 (Richetta et al; 2013) se evidenció que el porcentaje de CD4+ CD25bright FOXP3+ T periférico se redujo en once de dieciséis pacientes con vitiligo estudiados en comparación con controles sanos, lo que sugiere que esta desregulación puede estar implicada en la patogénesis del vitíligo. También respalda la hipótesis de que una disminución en la biología de las células T reguladoras que ocurre en un microambiente inflamatorio puede jugar un papel clave en la pérdida de control de las células T autorreactivas. La reducción de Tregs en este estudio de Richetta se asoció con una mayor puntuación VASI, es decir, con una enfermedad más extensa y la proporción de dichas células se redujo ligeramente en pacientes con vitiligo progresivo en comparación con aquellos con enfermedad estable. Por el contrario, cinco pacientes no mostraron cambios o tuvieron aumento en el número de células Tregs, lo que se correlaciona con una puntuación VASI alta. Este hallazgo, de acuerdo con los datos de la literatura, podría explicarse a través de la hipótesis de la disfunción Treg en lugar de un defecto en su número o puede indicar un desafío del sistema inmune que compensa una respuesta efectora a autoantígenos, respectivamente.

El estudio de Dwivedi en 2013 (Dwivedi et al, 2013) también mostró que había una correlación inversa en los pacientes con vitíligo, es decir, que a medida que el vitíligo aumentaba, los pacientes tenían una disminución de células Tregs.

Sin embargo, en otro informe, los Tregs no se relacionaron con la actividad de la enfermedad o la extensión del vitíligo y fueron incluso más altos en comparación con los controles (Mahmoud et al 2002). Estos hallazgos hacen suponer que las células Tregs pueden no ser biomarcadores fiables o no están suficientemente alterados en sangre periférica para ser un evidente biomarcador de vitíligo o debe precisarse o correlacionarse más con la actividad clínica de la enfermedad.

Quimiocina CXCL10

En el estudio del equipo de John Harris en Massachusetts, USA (Rashighi et al, 2014) se describió por primera vez el rol crítico del CXCL10 tanto en la progresión como en el mantenimiento de la despigmentación en un modelo murino de vitíligo. Más recientemente, un estudio demostró que CXCL10 en el suero de pacientes con vitíligo no solo era más alto en comparación con controles sanos, sino que su nivel se asoció con la actividad de la enfermedad y disminuyó significativamente después del tratamiento exitoso con inhibidores JAK, sugiriendo que el CXCL10 puede usarse como biomarcador para monitorear actividad de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Speeckaert et al; 2017).

En nuestro estudio, pudimos reproducir los hallazgos de Wang y colaboradores (Wang et al; 2016) en los que se evidencia que la quimiocina CXCL10 sérica está en niveles muy altos en los pacientes con vitíligo. En ésta investigación además pudimos comprobar que al hacer un tratamiento efectivo, diferente a los tratamientos diana como los inhibidores JAK, pero usando la asociación de antioxidantes orales, fototerapia UVB-NB con kellingina tópica y el tacrolimus tópico, logramos disminuir los niveles de CXCL10 significativamente, aunque se continuaban manteniendo por encima de los controles; constituyendo un útil biomarcador de enfermedad y de respuesta al tratamiento.

Cuando tuvimos en cuenta la variable mejora en los pacientes con una mayor repigmentación (>50%), observamos que presentaban niveles significativamente menores de CXCL10 respecto a los valores al inicio del tratamiento. Aun así, estos valores posterior al tratamiento no se asemejaban a los de los individuos control, siendo más elevados, aunque con un menor grado de significación respecto a los pre-tratamiento vs controles. Probablemente esto sea debido a que sólo los medimos a las 16 semanas de tratamiento. Una evaluación a más largo plazo quizás hubiera constatado la normalización de los valores. Los pacientes con menor repigmentación no veían disminuida la cantidad de CXCL10 respecto a los valores iniciales antes del tratamiento.

Es decir, que sin lugar a dudas la quimiocina CXCL10 es un muy interesante biomarcador de enfermedad poco invasivo al obtenerse la muestra de suero de sangre periférica y funciona también para monitorizar respuesta inmune al tratamiento.

En un estudio (Ferrari et al, 2017) se realizó un comparativo de niveles séricos de CXCL10 en pacientes con vitíligo no segmentario (VNS) con pacientes con vitíligo no segmentario y que además tenían tiroiditis autoinmune y con un grupo control y se demostró que los pacientes que tenían VNS asociado a tiroiditis autoinmune tenían los niveles de CXCL10 aún más elevado, pero demostrando también que aun funciona como un biomarcador específico comparándolo con controles. Sería interesante ampliar nuestro estudio a grupos de pacientes con vitíligo asociados a patologías autoinmune como la tiroiditis para corroborar esta investigación.

Quizás podríamos decir que el CXCL10 ya estaba suficientemente descrito como biomarcador de vitíligo, pero en nuestra investigación en particular nos sirvió además de para corroborar las investigaciones anteriores, para tener un biomarcador conocido que nos indicara que los pacientes estaban adecuadamente seleccionados y respondiendo al tratamiento y también para describir el comportamiento de esta citoquina en tratamientos combinados tradicionalmente utilizados y quizás de más bajo coste que los nuevos medicamentos diana.

Tests psicológicos

El vitíligo deteriora significativamente la calidad de vida de las personas que lo padecen y su entorno familiar. Es un trastorno devastador psicológicamente. El hecho de que por lo general ocurre en áreas expuestas como la cara y las manos tiene un gran impacto en la percepción de sí mismo (Linthorst et al, 2009). En muchas sociedades, el vitíligo es mal entendido y se cree que es una variante de lepra o de alguna enfermedad de transmisión sexual (Borimnejad et al, 2006). En estas sociedades particularmente las mujeres con vitíligo tienen dificultades para conseguir pareja así como disminuyen sus oportunidades profesionales (Dolatshahi et al, 2008). Muchos pacientes se preocupan acerca del empeoramiento de su enfermedad y refieren que ésta ha afectado su vida social, sienten vergüenza y depresión.

La evaluación de calidad de vida (QOL) debe ser realizada durante la primera consulta, ya que puede haber una diferencia entre la percepción de gravedad entre el paciente y el médico, así como, se debe continuar monitoreando la calidad de vida durante el tratamiento para evaluar la satisfacción del paciente

(Parsad et al, 2006). Las puntuaciones en el Índice de Dermatología de Calidad de Vida (DLQI) van de 4,82 a peor comparativamente a otras dermatosis estigmatizantes como la psoriasis en subescalas como sentimientos, hábitos al vestir, sociales y de ocio. Los estudios sugieren que el vitiligo imparte una carga comparable mental y emocional al del eczema severo de las manos o a la psoriasis y las mujeres tienden a sufrir más que los hombres. Los pacientes con vitiligo también presentan frecuentemente dificultades para tener experiencias sexuales así como una variedad de problemas psicológicos, tales como trastorno de adaptación, trastornos del sueño, depresión, y ansiedad (Linthorst et al, 2008).

En nuestro estudio, los tests psicológicos de los doce pacientes que completaron la escala de estrés percibido, el cuestionario HADS -Hospital Anxiety and Depression Scale- y el instrumento de medida de la calidad de vida en pacientes con enfermedades cutáneas *Skindex*, antes y después de 16 semanas de tratamiento, mostraron que diez de los doce pacientes con vitiligo que completaron el test tenían puntuaciones patológicas en el HADS clínicamente significativa antes del tratamiento y luego de realizar 16 semanas del régimen terapéutico, sólo uno de ellos se mantenía con puntuaciones patológicas. Además, nueve, de los 12 pacientes tenían sintomatología ansiosa y luego del tratamiento sólo una paciente tenía ansiedad patológica y se trataba de la paciente con mayor extensión de vitiligo de los sujetos estudiados según la escala de medición VASI.

Dos pacientes tenían depresión clínicamente significativa y dos con sintomatología depresiva leve y luego de 16 semanas ninguno tenía depresión. Este dato es muy interesante tomando en cuenta que algunos de estos pacientes con depresión no mejoraron o mejoraron poco. Lo que sugiere es que el sólo hecho de hacer tratamiento, incluso en caso de pacientes en los que la perspectiva de mejora es muy baja, como pacientes con vitiligo estable acral y de muchos años de evolución, igual es importante tratarlos para mejorarlos psicológicamente.

Once de los 12 pacientes tenía alto nivel de estrés percibido y luego del tratamiento solo tres de ellos se mantenían con altos niveles de estrés percibido. Seis de los doce pacientes tenían afectada su calidad de vida y luego del tratamiento sólo uno tenía afectada su calidad de vida.

Si tomamos algunos casos en particular, podemos decir que pacientes como JAM, con vitíligo acrofacial VASI 4.7 y que mejoró un 65% pasó de tener estrés patológico a no tener estrés. Tenía sintomatología depresiva y luego del tratamiento no tenía síntoma de depresión. Presentaba ansiedad patológica y mejoró después del tratamiento. En el caso más leve del estudio, SB de 52 años con vitíligo localizado. VASI 1.1. Tuvo mejoría de 100% después de tratamiento. Tenía alteración de estrés percibido que se resolvió después del tratamiento. No tenía ninguna otra alteración.

Los dermatólogos tenemos que tomar conciencia de la importancia de tratar todos los pacientes que acudan a la consulta. No se puede asumir que la enfermedad es discreta o leve sin puntualizar y medir cuanto los está afectando psicológicamente y más aun ahora, tomando en consideración este estudio.

Resultado terapéutico

En nuestro estudio, la media de repigmentación fue de 48.6%, de los 18 pacientes que completaron las 16 semanas de tratamiento, sólo uno (1) de los pacientes no tuvo ninguna respuesta al tratamiento, los otros todos tuvieron una respuesta moderada (11), buena (5) o excelente (1).

El dermatólogo tiene que ser consciente que la enfermedad no debe ser considerada cosmética y que existen tratamientos seguros y efectivos para el vitíligo. A diferencia de otras patologías autoinmunes, los tratamientos actuales son capaces de revertir la enfermedad suprimiendo el sistema inmunológico y estimulando el crecimiento del reservorio natural de las células madre melanocitarias. Estas células madres pueden sobrevivir al ataque autoinmune por su localización en el folículo piloso que tiene un privilegio inmunológico similar al de otros órganos como los ojos y el cerebro. Como resultado al tratamiento adecuado, se puede observar éxito terapéutico con repigmentación inicial de patrón perifolicular. Ciertas áreas anatómicas con escasos folículos son difíciles de tratar como los nudillos y la punta de los dedos, los pies, prominencias óseas, labios y genitales. Además, en áreas donde el pelo está despigmentado hay peor pronóstico (Taieb et al; 2009). Es importante tener esta información en consideración para manejar las expectativas del paciente.

7 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, las conclusiones de esta tesis son las siguientes:

- 1) El receptor de membrana CD91 está más elevado en los pacientes con vitíligo que en individuos sin la enfermedad y el análisis de CD91 soluble (sCD91) es más bajo, por lo que se podría utilizar para diagnóstico. No hay diferencias de los valores luego del tratamiento.
- 2) El análisis de las células T reguladoras y de las células T reguladoras memoria en sangre periférica no mostró diferencias entre los pacientes con vitíligo y los individuos control. Sin embargo, sí mostró una disminución luego del tratamiento teniendo en cuenta la variable mejora.
- 3) El análisis de CXCL10 en plasma mostró que los pacientes con vitíligo tenían más cantidad de esta quimiocina que los individuos control y los pacientes con una repigmentación mayor al 50% presentaban niveles significativamente menores de CXCL10 respecto a los valores al inicio del tratamiento lo que indica, que el CXCL10 es un biomarcador efectivo para diagnóstico y seguimiento del tratamiento.
- 4) El vitíligo produce estrés, ansiedad, depresión y afecta la calidad de vida de los pacientes que lo padecen y el realizar tratamiento, aunque en ocasiones no sea efectivo para repigmentar las lesiones, demostramos que puede revertir la afección psicológica.

8 LÍNEAS A FUTURO QUE SE DESPRENDEN DE ESTA INVESTIGACIÓN

1. Hay una oportunidad de continuar o extender la investigación. Sería muy interesante aumentar la población estudiada, para obtener significancia en algunos valores en los que se observaba una tendencia. También el extender en el tiempo el estudio hasta completar, por ejemplo, un año, quizás podría llegar a normalizar los niveles de CXCL10.

2. Se podrían evaluar otras variables o grupos específicos de pacientes que no fueron incluidos, como en el caso de asociación con patologías autoinmune como tiroïditis autoinmune.

3. Apertura de nuevas vías de trabajo. Se podría realizar este estudio con otros grupos de pacientes, con el uso de nuevos agentes terapéuticos diana como el tofacitinib y ruxolitinib en forma oral y tópica y observar como se modifican los biomarcadores. Especialmente CD91, que no ha sido estudiado con estas nuevas alternativas de tratamiento.

4, Continuar investigando posibles biomarcadores con un protocolo similar a este, midiendo por ejemplo HSP70, para continuar indagando en nuevos marcadores inmunológico que permita un seguimiento poco invasivo de la respuesta al tratamiento.

5. A partir de los resultados de las pruebas psicológicas de esta tesis, podríamos afirmar, que es necesaria una mayor sensibilización del dermatólogo hacia el paciente con vitiligo y su posible afectación psicológica. Entendiendo que en todos los casos, es necesario tratar al paciente, aún en individuos que de antemano se sabe que responden poco al tratamiento, debido a que, aunque no haya respuesta dermatológica favorable, podrá tener una mejoría en su calidad de vida.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal P, Rashighi M, Essien KI, et al. Simvastatin prevents and reverses depigmentation in a mouse model of vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2015;135(4):1080-1088.
- Agrawal K, Agrawal A. Vitiligo: repigmentation with dermabrasion and thin split-thickness skin graft. *Dermatol Surg* 1995;21:295-300.
- Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990;322:1829-36.
- Alghamdi K, Khurram H. Methotrexate for the treatment of generalized vitiligo. *Saudi Pharm J* 2013; 21:423–4.
- Alghamdi KM1, Kumar A, Taïeb A, Ezzedine K. Assessment methods for the evaluation of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Dec;26(12):1463-71.
- Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V: Vitiligo: a comprehensive overview Part I Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol* 2011, 65:473-491.
- Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz RA. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res*. 2003 Jun;16(3):208-14.
- Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, Talbert J, Uhlhorn C, Taylor M, Fox A, Miller C, Dills DG, Ridgway EC, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. *Hum Mol Genet*. 2002 Mar 15;11(6):661-7.
- Alomar A. Some new treatment of vitiligo vulgaris: phototherapy with topical Khellin *Dermatology: Progress and Perspectives*. Proceedings of the 18th World Congress of Dermatology. New York 1992:517-20
- Anbar TS, Westerhof W, Abdel-Rahman AT, Ewis AA, El-Khayyat MA. Effect of one session of ER:YAG laser ablation plus topical 5Fluorouracil on the outcome of short-term NB-UVB phototherapy in the treatment of non-segmental vitiligo: a left-right comparative study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008 Dec;24(6):322-9.

- Bapur Erduran F, Adışen E. Comparison of the efficacy of 308-nm excimer lamp monotherapy with topical tacrolimus or clobetasol 17-propionate combination therapies in localized vitiligo. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2016 Sep;32(5-6):247-253.
- Bagherani N. The efficacy of 308 nm UV excimer light as monotherapy and combination therapy with topical khellin 4% and/or tacrolimus 0.1% in the treatment of vitiligo. *Dermatol Ther*. 2016 Mar;29(2):137-8.
- Barnes L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Dermatol Clin* 1988;6:229-39.
- Beltraminelli H1, Dietrich N, Hunziker T. Fractional transepidermal delivery: a histological analysis. *Dermatology*. 2011;223(4):321-4.
- Binder R, Zhou Y, Messmer M, Pawaria S. CD91-Dependent Modulation of Immune Responses by Heat Shock Proteins: A Role in Autoimmunity. *Autoimmune Dis*. 2012; 2012: 863041.
- Birlea SA, Costin GE, Norris DA. Cellular and molecular mechanisms involved in the action of vitamin D analogs targeting vitiligo depigmentation. *Curr Drug Targets* 2008;9:345-59.
- Borimnejad L, Parsa Yekta Z, Nikbakht-Nasrabadi A, Firooz A. Quality of life with vitiligo: comparison of male and female Muslim patients in Iran. *Gend Med* 2006;3:124-30.
- Bystryń JC, Rigel D, Friedman RJ, Kopf A. Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1987;123:1053-5.
- Camacho F, Mazuecos J. Treatment of vitiligo with oral and topical phenylalanine: 6 years of experience. *Arch Dermatol* 1999;135:216-7.
- Chren MM, Lasek RJ, Quinn LM, Mostow EN, Zyzanski SJ. Skindex, a quality-of-life measure for patients with skin disease: reliability, validity, and responsiveness. *J Invest Dermatol*. 1996 Nov;107(5):707-13
- Chun WH, Hann SK. The progression of nonsegmental vitiligo: clinical analysis of 318 patients. *Int J Dermatol* 1997;36:908-10.
- Cockayne SE, Messenger AG, Gawkrödger DJ. Vitiligo treated with topical corticosteroids: children with head and neck involvement respond well. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:964-5.

- Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*,. 1983; 24, 385-396.
- Craiglow BG, Tavares D, King BA. Topical Ruxolitinib for the Treatment of Alopecia Universalis. *JAMA Dermatol*. 2016;152(4):490-491.
- Craiglow BG, King BA. Killing two birds with one stone: oral tofacitinib reverses alopecia universalis in a patient with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2014 Dec;134(12):2988-2990.
- Dahir AM, Thomsen SF. Comorbidities in vitiligo: comprehensive review. *Int J Dermatol*. 2018 May 28.
- Dell'Anna ML, Mastrofrancesco A, Sala R, Venturini M, Ottaviani M, Vidolin AP, et al. Antioxidants and narrow band-UVB in the treatment of vitiligo: a double-blind placebo controlled trial. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:631-6.
- Denman CJ, McCracken J, Hariharan V, Klarquist J, Oyarbide-Valencia K, Guevara-Patiño JA, Le Poole IC. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2008 Aug;128(8):2041-8. doi: 10.1038/jid.2008.45. Epub 2008 Mar 13.
- Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes: immunogenetics and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2983-92.
- Dolatshahi M, Ghazi P, Feizy V, Hemami MR. Life quality assessment among patients with vitiligo: comparison of married and single patients in Iran. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:700.
- Dwivedi M, Kemp EH, Laddha NC, Mansuri MS, Weetman AP, Begum R. Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics. *Autoimmun Rev*. 2015 Jan;14(1):49-56.
- Dwivedi M, Laddha NC, Arora P, Marfatia YS, Begum R. Decreased regulatory T-cells and CD4(?) /CD8(?) ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26:586–91.
- Ermis O, Alpsoy E, Cetin L, Yilmaz E. Is the efficacy of psoralen plus ultraviolet A therapy for vitiligo enhanced by concurrent topical

- calcipotriol? A placebo-controlled double-blind study. *Br J Dermatol* 2001;145:472-5.
- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, et al. Vitiligo. *Lancet* 2015;386(9988):74–84.
 - Ezzedine K, Gauthier Y, Léauté-Labrèze C, Marquez S, Bouchtnei S, Jouary T, Taieb A. Segmental vitiligo associated with generalized vitiligo (mixed vitiligo): a retrospective case series of 19 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov;65(5):965-71.
 - Fain PR, Babu SR, Bennett DC, Spritz RA. HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and early disease onset. *Pigment Cell Res* 2006;19:51-7.
 - Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V. Vitiligo: A comprehensive overview Part II: Treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Sep;65(3):493-514.
 - Ferrari SM, Fallahi P, Santaguida G, Virili C, Ruffilli I, Ragusa F, Centanni M, Antonelli A. Circulating CXCL10 is increased in non-segmental vitiligo, in presence or absence of autoimmune thyroiditis. *Autoimmun Rev*. 2017 Sep;16(9):946-950.
 - Firooz A, Bouzari N, Fallah N, Ghazisaidi B, Firoozabadi MR, Dowlati Y. What patients with vitiligo believe about their condition. *Int J Dermatol* 2004;43:811-4.
 - Foley LM, Lowe NJ, Misheloff E, Tiwari JL. Association of HLADR4 with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:39-40.
 - Franchini M, Urbani S, Amadei B, Rivolta GF, Di Perna C, Riccardi F, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C, Formentini A, Quintavalla R, Tagliaferri A. LRP1/CD91 is up-regulated in monocytes from patients with haemophilia A: a single-centre analysis. *Haemophilia*. 2013 May;19(3):e126-32.
 - Frisoli ML, Harris JE, Vitiligo: Mechanistic Insights Lead to Novel Treatments, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2017), doi: 10.1016/j.jaci.2017.07.011.

- Gauthier Y, Cario Andre M, Taieb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res* 2003;16:322-32.
- Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J Dermatol* 2008;159:1051-76.
- Ghosh S, Mukhopadhyay S. Chemical leucoderma: a clinicoaetiological study of 864 cases in the perspective of a developing country. *Br J Dermatol* 2009;160:40-7.
- Gilhar A, Zelickson B, Ulman Y, Etzioni A. In vivo destruction of melanocytes by the IgG fraction of serum from patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1995;105:683-6.
- Gong Q, Li X, Sun J, Ding G, Zhou M, Zhao W, Lu Y. The effects of calcipotriol on the dendritic morphology of human melanocytes under oxidative stress and a possible mechanism: is it a mitochondrial protector? *J Dermatol Sci.* 2015 Feb;77(2):117-24.
- Gorovoy M, Gaultier A, Campana WM, Firestein GS, Gonias SL. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. *J Leukoc Biol.* 2010 Oct;88(4):769-78.
- Grimes PE, Nashawati R. The Role of Diet and Supplements in Vitiligo Management. *Dermatol Clin.* 2017 Apr;35(2):235-243.
- Grimes P, Hamzavi I, Lebwohl M, Ortonne J, Lim H. The Efficacy of Afamelanotide and Narrowband UV-B Phototherapy for Repigmentation of Vitiligo. *JAMA Dermatol.* 2013;149(1):68-73.
- Grimes PE, Morris R, Avaniss-Aghajani E, Soriano T, Meraz M, Metzger A. Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. *J Am Acad Dermatol* 2004;51: -61.
- Hadi SM, Spencer JM, Lebwohl M. The use of the 308-nm excimer laser for the treatment of vitiligo. *Dermatol Surg* 2004;30:983-6.

- Halder RM, Taliaferro SJ. Vitiligo. In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Lefell D, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 72.
- Handa S, Kaur I. Vitiligo: clinical findings in 1436 patients. *J Dermatol* 1999;26:653-7.
- Hann SK, Chun W. autocytotoxic hypothesis for the destruction of melanocytes as the cause of vitiligo. In: Hann SK, Nordlund J, editors. Vitiligo. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2000.
- Hann SK, Chun WH, Park YK. Clinical characteristics of progressive vitiligo. *Int J Dermatol* 1997;36:353-5.
- Hann SK, Lee HJ. Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:671-4.
- Hartmann A, Lurz C, Hamm H, Brocker EB, Hofmann UB. Narrow-band UVB311 nm vs. broad-band UVB therapy in combination with topical calcipotriol vs. placebo in vitiligo. *Int J Dermatol* 2005;44:736-42.
- Hegab DS, Attia MAS. Decreased Circulating T Regulatory Cells in Egyptian Patients with Nonsegmental Vitiligo: Correlation with Disease Activity. *Dermatol Res Pract* 2015;2015:145409.
- Hong CK, Lee MH, Jeong KH, Cha CI, Yeo SG. Clinical analysis of hearing levels in vitiligo patients. *Eur J Dermatol* 2009;19: 50-6.
- Hossain C, Porto DA, Hamzavi I, Lim HW. Camouflaging Agents for Vitiligo Patients. *J Drugs Dermatol*. 2016 Apr;15(4):384-7.
- Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol* 1977;113:47-52.
- Hsu S. Camouflaging vitiligo with dihydroxyacetone. *Dermatol Online J* 2008;14:23.
- Iacovelli P, Sinagra JL, Vidolin AP, Marena S, Capitano B, Leone G, et al. Relevance of thyroiditis and of other autoimmune diseases in children with vitiligo. *Dermatology* 2005; 210:26-30.
- Jha AK, Sonthalia S, Lallas A. Dermoscopy as an evolving tool to assess vitiligo activity. *J Am Acad Dermatol*. 2018 May;78(5):1017-1019.

- Jones-Caballero M, Penas PF, Garcia-Diez A, Badia X, Chren MM. The Spanish version of Skindex-29. *Int J Dermatol*. 2000 Dec;39(12) 907-912
- Jung H, Oh E-S. FK506 positively regulates the migratory potential of melanocyte-derived cells by enhancing syndecan-2 expression. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29:434–43.
- Jung H, Chung H, Chang SE, Kang D-H, Oh E-S. FK506 regulates pigmentation by maturing the melanosome and facilitating their transfer to keratinocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29:199–209.
- Kakourou T, Kanaka-Gantenbein C, Papadopoulou A, Kaloumenou E, Chrousos GP. Increased prevalence of chronic autoimmune (Hashimoto's) thyroiditis in children and adolescents with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:220-3.
- Kao CH, Yu HS. Comparison of the effect of 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus UVA (PUVA) on human melanocytes in vitiligo vulgaris and in vitro. *J Invest Dermatol* 1992;98:734-40.
- Kapoor R, Phiske MM, Jerajani HR. Evaluation of safety and efficacy of topical prostaglandin E2 in treatment of vitiligo. *Br J Dermatol* 2009;160: 861–3.
- Kebba A, Stebbing J, Rowland S, Ingram R, Agaba J, Patterson S, Kaleebu P, Imami N, Gotch F. Expression of the common heat-shock protein receptor CD91 is increased on monocytes of exposed yet HIV-1-seronegative subjects. *J Leukoc Biol*. 2005 Jul;78(1):37-42.
- Kent G, al-Abadie M. Factors affecting responses on Dermatology Life Quality Index items among vitiligo sufferers. *Clin Exp Dermatol* 1996;21:330-3.
- Khandpur S, Sharma VK, Manchanda Y. Comparison of minipunch grafting versus split-skin grafting in chronic stable vitiligo. *Dermatol Surg* 2005;31:436-41.
- Kim SM, Lee HS, Hann SK. The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. *Int J Dermatol* 1999;38:546-50.
- Kim YC, Kim YJ, Kang HY, Sohn S, Lee ES. Histopathologic features in vitiligo. *Am J Dermatopathol* 2008;30:112-6.

- Komen L, da Graça V, Wolkerstorfer A, de Rie MA, Terwee CB, van der Veen JP. Vitiligo Area Scoring Index and Vitiligo European Task Force assessment: reliable and responsive instruments to measure the degree of depigmentation in vitiligo. *Br J Dermatol*. 2015 Feb;172(2):437-43.
- Kumar Jha A, Sonthalia S, Lallas A, Chaudhary RKP. Dermoscopy in vitiligo: diagnosis and beyond. *Int J Dermatol*. 2018 Jan;57(1):50-54.
- Kumari J. Vitiligo treated with topical clobetasol propionate. *Arch Dermatol* 1984;120:631-5.
- Le Poole IC, Das PK, van den Wijngaard RM, Bos JD, Westerhof W. Review of the etiopathomechanism of vitiligo: a convergence theory. *Exp Dermatol* 1993;2:145-53.
- Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol* 2005;124:976-83.
- Leone G, Iacovelli P, Paro Vidolin A, Picardo M. Monochromatic excimer light 308 nm in the treatment of vitiligo: a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:531-7.
- Lili Y, Yi W, Ji Y, Yue S, Weimin S, Ming L. Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS One*. 2012;7(5):e37513.
- Lim H, Grimes P, Agbai O, Hamzavi I, Henderson M, Haddican M, Linkner R, Lebwohl M. Afamelanotide and Narrowband UV-B Phototherapy for the Treatment of Vitiligo
- Lin M, Zhang B-X, Shen N, Dong X-J, Zhang C, Qi X-Y, et al. Regulatory T cells from active non-segmental vitiligo exhibit lower suppressive ability on CD8+CLA+ T cells. *Eur J Dermatol* 2014;24:676–82.
- Linthorst Homan MW, Sprangers MA, de Korte J, Bos JD, van der Veen JP. Characteristics of patients with universal vitiligo and health-related quality of life. *Arch Dermatol* 2008;144:1062-4.
- Linthorst Homan MW, Spuls PI, de Korte J, Bos JD, Sprangers MA, van der Veen JP. The burden of vitiligo: patient characteristics associated with quality of life. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:411-20.

- Linthorst MW, Sprangers MA, de Korte J, Bos JD, van der Veen JP. Characteristics of patients with universal vitiligo and health-related quality of life. *Arch Dermatol* 2008;144:1062-4.
- Liu LY, Craiglow BG, Dai F, King BA. Tofacitinib for the treatment of severe alopecia areata and variants: A study of 90 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jan;76(1):22-28.
- Loi C, Starace M, Piraccini BM. Alopecia areata (AA) and treatment with simvastatin/ezetimibe: Experience of 20 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2016 May;74(5):e99-e100.
- Lu T, Gao T, Wang A, Jin Y, Li Q, Li C. Vitiligo prevalence study in Shaanxi Province, China. *Int J Dermatol* 2007;46:47-51.
- Mahmoud F, Abul H, Haines D, et al. Decreased total numbers of peripheral blood lymphocytes with elevated percentages of CD4+ CD45RO+ and CD4+ CD25+ of T-helper cells in non-segmental vitiligo. *J Dermatol* 2002; 29: 68-73.
- Mancuso G, Reggiani M, Berdondini RM. Occupational dermatitis in shoemakers. *Contact Derm* 1996;34:17-22.
- Moftah NH, El-Barbary RAH, Ismail MA, Ali NAM. Effect of narrow band-ultraviolet B on CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-lymphocytes in the peripheral blood of vitiligo patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014;30:254–61.
- Mosenson JA, Eby JM, Hernandez C, Le Poole IC. A central role for inducible heat-shock protein 70 in autoimmune vitiligo. *Exp Dermatol*. 2013 Sep;22(9):566-9.
- Mosenson JA, Zloza A, Klarquist J, Barfuss AJ, Guevara-Patino JA, Poole IC. HSP70i is a critical component of the immune response leading to vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012 Jan;25(1):88-98.
- Mosher DB, Parrish JA, Fitzpatrick TB. Monobenzylether of hydroquinone. A retrospective study of treatment of 18 vitiligo patients and a review of the literature. *Br J Dermatol* 1977;97:669-79.
- Naughton GK, Reggiardo D, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:978-81.

- Njoo MD, Vodegel RM, Westerhof W. Depigmentation therapy in vitiligo universalis with topical 4-methoxyphenol and the Q-switched ruby laser. *J Am Acad Dermatol* 2000;42(5 pt 1):760-9.
- Noel M, Gagne C, Bergeron J, et al. Positive pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vitiligo. *Lipids Health Dis.* 2004;3:7.
- Nordlund JJ, Lerner AB. Vitiligo and melanoma. *Arch Dermatol* 1979;115:636.
- Norris DA, Kissinger RM, Naughton GM, Bystryn JC. Evidence for immunologic mechanisms in human vitiligo: patients' sera induce damage to human melanocytes in vitro by complement-mediated damage and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Invest Dermatol* 1988;90:783-9.
- Ongenaes K, Dierckxsens L, Brochez L, van Geel N, Naeyaert JM. Quality of life and stigmatization profile in a cohort of vitiligo patients and effect of the use of camouflage. *Dermatology* 2005;210:279-85.
- Ongenaes K, Van Geel N, Naeyaert JM. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* 2003;16:90-100.
- Orecchia G, Perfetti L. Photochemotherapy with topical khellin and sunlight in vitiligo. *Dermatology* 1992;184: 120-3.105.
- Orozco-Topete R, Cordova-Lopez J, Yamamoto-Furusho JK, Garcia-Benitez V, Lopez-Martinez A, Granados J. HLA-DRB1*04 is associated with the genetic susceptibility to develop vitiligo in Mexican patients with autoimmune thyroid disease. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:182-3.
- Ortel B, Tanew A, Honigsmann H. Treatment of vitiligo with khellin and ultraviolet A. *J Am Acad Dermatol* 1988;18(4 pt 1): 693-701.
- Ortonne JP, MacDonald DM, Micoud A, Thivolet J. PUVA-induced repigmentation of vitiligo: a histochemical (split-DOPA) and ultrastructural study. *Br J Dermatol* 1979;101:1-12.
- Ortonne JP. Vitiligo and other disorders of hypopigmentation. In: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, editors. *Dermatology*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p. 928.

- Ostovari N, Passeron T, Zakaria W, Fontas E, Larouy JC, Blot JF, et al. Treatment of vitiligo by 308-nm excimer laser: an evaluation of variables affecting treatment response. *Lasers Surg Med* 2004;35:152-6.
- Pagovich OE, Silverberg JI, Freilich E, Silverberg NB. Thyroid abnormalities in pediatric patients with vitiligo in New York City. *Cutis* 2008;81:463-6.
- Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme E, Brazzelli V, et al. Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan-A/MART1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: the role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001;117:326-32.
- Parsad D, Kanwar A. Oral minocycline in the treatment of vitiligo a preliminary study. *Dermatol Ther* 2010;23:305–7.
- Parsad D, Kanwar AJ, Kumar B. Psoralen-ultraviolet A vs. narrow-band ultraviolet B phototherapy for the treatment of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:175-7.
- Parsad D, Pandhi R, Dogra S, Kanwar AJ, Kumar B. Dermatology Life Quality Index score in vitiligo and its impact on the treatment outcome. *Br J Dermatol* 2003;148:373-4.
- Parsad D, Pandhi R, Juneja A. Effectiveness of oral ginkgo biloba in treating limited, slowly spreading vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:285-7.
- Parsad D, Saini R, Nagpal R. Calcipotriol in vitiligo: a preliminary study. *Pediatr Dermatol* 1999;16:317-20.
- Piquero-Casals J. Tratamiento de Vitiligo. *Derm Venez* 2007; 45(1): 27.
- Porter JR, Beuf AH. Racial variation in reaction to physical stigma: a study of degree of disturbance by vitiligo among black and white patients. *J Health Soc Behav* 1991;32: 192-204.
- Quezada N, Machado Filho CA, De La Sotta P, Uribe P. Melanocytes and keratinocytes transfer using sandpaper technique combined with dermabrasion for stable vitiligo. *Dermatol Surg.* 2011 Feb;37(2):192-8.

-
- Radakovic-Fijan S, Furnsinn-Friedl AM, Honigsmann H, Tanew A. Oral dexamethasone pulse treatment for vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:814-7.
 - Rajatanavin N, Suwanachote S, Kulkollakarn S. Dihydroxyacetone: a safe camouflaging option in vitiligo. *Int J Dermatol* 2008;47:402-6.
 - Rashighi M, Agarwal P, Richmond J, Harris T, Dresser K, Su M, Zhou Y, Deng A, Hunter C, Luster A, Harris J. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci Transl Med*. 2014 Vol 6 Issue 223.
 - Rashighi M, Harris J. Vitiligo pathogenesis and emerging treatments. *Dermatol Clin* 35 (2017) 257–265.
 - Richetta A, D'Epiro S, Salvi M, Campoli M, Giancristoforo S, Mattozzi C,
 - Macaluso L, Luci C, Cantisani C, Carboni V, Zanniello R, Zampetti M, Milana B, Morrone S, Calvieri S. Serum levels of functional T-regs in vitiligo: our experience and mini-review of the literature. *Eur J Dermatol* 2013; 23(2):154-9.
 - Richmond J, Frisoli M, Harris J. Innate immune mechanisms in vitiligo: Danger from within. *Current Opinion in Immunology* 2013, 25:676–682.
 - Remor E. Psychometric Properties of a European Spanish Version of the Perceived Stress Scale (PSS). *Spanish J Psychol*. 2006, Vol. 9, No. 1, 86-93.
 - Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE. Vitiligo Working Group. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jul;77(1):1-13.
 - Rothstein B, Joshipura D, Saraiya A, Abdat R, Ashkar H, Turkowski Y, Sheth V, Huang V, Au SC, Kachuk C, Dumont N, Gottlieb AB, Rosmarin D. Treatment of vitiligo with the topical Janus kinase inhibitor ruxolitinib. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jun;76(6):1054-1060.
 - Salzer BA, Schallreuter KU. Investigation of the personality structure in patients with vitiligo and a possible association with impaired catecholamine metabolism. *Dermatology* 1995;190:109-15.
 - Sanclemente G, Garcia JJ, Zuleta JJ, Diehl C, Correa C, Falabella R. A double-blind, randomized trial of 0.05% betamethasone vs. topical

- catalase/dismutase superoxide in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:1359-64.
- Sandra A, Pai S, Shenoi SD. Unstable vitiligo responding to methotrexate. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 1998;64:309.
 - Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K, Inoue S. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Sep;27(5):754-63.
 - Schallreuter KU, Buttner G, Pittelkow MR, Wood JM, Swanson NN, Korner C. Cytotoxicity of 6-biopterin to human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:43-8.
 - Schallreuter KU, Levenig C, Berger J. Vitiligo and cutaneous melanoma. A case study. *Dermatologica* 1991;183:239-45.
 - Schallreuter KU, Moore J, Behrens-Williams S, Panske A, Harari M. Rapid initiation of repigmentation in vitiligo with dead sea climatotherapy in combination with pseudocatalase (PCKUS). *Int J Dermatol* 2002;41:482-7.
 - Seiter S, Ugurel S, Tilgen W, et al. Use of high-dose methylprednisolone pulse therapy in patients with progressive and stable vitiligo. *Int J Dermatol* 2000;39:624–7.
 - Seiter S, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Use of high-dose methylprednisolone pulse therapy in patients with progressive and stable vitiligo. *Int J Dermatol* 2000;39:624-7.
 - Shafiee A, Hoormand M, Shahidi-Dadras M, Abadi A. The effect of topical piperine combined with narrowband UVB on vitiligo treatment: A clinical trial study. *Phytother Res.* 2018 May 21.
 - Siadat AH, Zeinali N, Iraj F, et al. Narrow-Band Ultraviolet B versus Oral Minocycline in Treatment of Unstable Vitiligo: A Prospective Comparative Trial. *Dermatol Res Pract.* 2014; 2014: 240856
 - Singh A, Kanwar AJ, Parsad D, et al. Randomized controlled study to evaluate the effectiveness of dexamethasone oral minipulse therapy

- versus oral minocycline in patients with active vitiligo vulgaris. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2014;80:29–35.
- Speeckaert R, Speeckaert M, De Schepper S, van Geel N. Biomarkers of disease activity in vitiligo: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2017 Sep;16(9):937-945.
 - Speeckaert R, van Geel N. Vitiligo: An Update on Pathophysiology and Treatment Options. *Am J Clin Dermatol* (2017) 18:733–744
 - Spritz RA, Andersen GH. Genetics of Vitiligo. *Dermatol Clin.* 2017 Apr;35(2):245-255.
 - Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:244-57.
 - Stevenson CJ. Occupational vitiligo: clinical and epidemiological aspects. *Br J Dermatol* 1981;105(suppl 21):51-6.
 - Taieb A, Alomar A, Bohm M et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. *Br J Dermatol.* 2013. 168:5–19
 - Taieb A, Picardo M. Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J Med* 2009;360(2):160–9.
 - Taieb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res* 2007;20:27-35.
 - Tedeschi A, Dall'Oglio F, Micali G, Schwartz RA, Janniger CK. Corrective camouflage in pediatric dermatology. *Cutis* 2007; 79:110-2.172.
 - Tembhre M, Parihar A, Sharma V, Sharma A, Chattopadhyay P, Gupta S. Alteration in regulatory T cells and programmed cell death 1-expressing regulatory T cells in active generalized vitiligo and their clinical correlation. *Br J Dermatol* (2015) 172, pp940–950.
 - Tembhre MK, Sharma VK, Sharma A, Chattopadhyay P, Gupta S. T helper and regulatory T cell cytokine profile in active, stable and narrow band ultraviolet B treated generalized vitiligo. *Clin Chim Acta* 2013;424:27–32.
 - Tsuruta D, Hamada T, Teramae H, Mito H, Ishii M. Inflammatory vitiligo in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:129-31.

- Valkova S, Trashlieva M, Christova P. Treatment of vitiligo with local khellin and UVA: comparison with systemic PUVA. *Clin Exp Dermatol* 2004;29:180-4.
- Van Geel N, Speeckaert R. Segmental Vitiligo. *Dermatol Clin*. 2017 Apr;35(2):145-150.
- Van Geel N, Speeckaert R, De Wolf J, Bracke S, Chevolet I, Brochez L, Lambert J. Clinical significance of Koebner phenomenon in vitiligo. *Br J Dermatol*. 2012 Nov;167(5):1017-24.
- Vanderweil SG, Amano S, Ko WC, Richmond JM, Kelley M, Senna MM, Pearson A, Chowdary S, Hartigan C, Barton B, Harris JE. A double-blind, placebo-controlled, phase-II clinical trial to evaluate oral simvastatin as a treatment for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Jan;76(1):150-151
- Vasistha LK, Singh G. Vitiligo and intralesional steroids. *Indian J Med Res* 1979;69:308–11.
- Wang X, Wang Q, Wu J, Jiang M, Chen L, Zhang C, Xiang L. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br J Dermatol*. 2016, 174, 1318-26.
- Wang YJ, Chang CC, Cheng KL. Wood's lamp for vitiligo disease stability and early recognition of initiative pigmentation after epidermal grafting. *Int Wound J*. 2017 Dec;14(6):1391-1394.
- Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L, Mulder PG, Glazenburg EJ. Left-right comparison study of the combination of fluticasone propionate and UV-A vs. either fluticasone propionate or UVA alone for the long-term treatment of vitiligo. *Arch Dermatol* 1999;135:1061-6.
- Wu CS, Lan CC, Wang LF, Chen GS, Wu CS, Yu HS. Effects of psoralen plus ultraviolet A irradiation on cultured epidermal cells in vitro and patients with vitiligo in vivo. *Br J Dermatol* 2007;156:122-9.
- Yuan J, Chen H, Yan R, Cui S, Li YH, Wu Y, Gao XH, Chen HD. Fractional CO2 lasers contribute to the treatment of stable non-segmental vitiligo. *Eur J Dermatol*. 2016 Dec 1;26(6):592-598.

- Zhang Z, Xu SX, Zhang FY, Yin XY, Yang S, Xiao FL, et al. The analysis of genetics and associated autoimmune diseases in Chinese vitiligo patients. *Arch Dermatol Res* 2009;301:167-73.
- Zhou YJ, Binder RJ. The heat shock protein-CD91 pathway mediates tumor immunosurveillance. *Oncoimmunology*. 2014 Apr 25;3:e28222.

11 ANEXOS

Anexo 1. Hoja de información al participante

**HOJA DE INFORMACIÓN AL POSIBLE PARTICIPANTE**

Título del estudio: RESPUESTA A TRATAMIENTO DE RECEPTOR DE INMUNIDAD INNATA LRP1 (CD91) Y TREGS EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON VITILIGO NO SEGMENTAR

Código del estudio: IIBSP-VIT-2015-69

Promotor: Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau – IIB Sant Pau

Investigador Principal: Dr. Jaime Piquero. Servicio de Dermatología. Tel: 935537007

Centro: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio tiene como propósito evaluar algunas diferencias del sistema inmunológico que existen entre pacientes con vitiligo y pacientes sin la enfermedad.

Estas diferencias serán evaluadas mediante la extracción de 20ml (2 tubos) de sangre periférica que será analizada antes del tratamiento y 20ml (2 tubos) después del tratamiento que de forma habitual reciben los pacientes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Es decir, los pacientes al aceptar participar del estudio los someteremos a extracción de dos tubos de sangre periférica y luego de 12 a 16 semanas de tratamiento a criterio del dermatólogo responsable les realizaremos nuevamente la extracción de dos tubos de 10ml cada uno.

Por tanto, ni el tratamiento, ni las visitas de seguimiento se modificarán por su participación, sino que será los mismos tanto si participa o no en este estudio.

En el caso de los controles serán sometidos a extracción de 20ml de sangre periférica en participación única.

En los pacientes con vitiligo se les indicará además completar test para medir depresión, percepción de enfermedad, stress (PSS-10, Skindex, HADS, Likert) antes y luego de 12 a 16 semanas de intervención terapéutica.

En este estudio se incluirán a 20 pacientes con vitiligo no segmentario activo y a 10 controles sin la enfermedad. La duración de la participación en este estudio será de 12 a 16 semanas para los pacientes con vitiligo y de una participación única (extracción de 20 ml de sangre venosa periférica) para los controles.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El propósito de este estudio es únicamente observar los cambios en la sangre y no probar nuevos tratamientos o medicamentos. El tratamiento y las visitas de seguimiento de los pacientes serán las mismas tanto si participa o no en el estudio.

Por dicho motivo, no se esperan beneficios ni riesgos adicionales por la participación en este estudio. No obstante los resultados del mismo, podrían ser de utilidad para ampliar el conocimiento de algunos aspectos inmunológicos del vitiligo.

CONFIDENCIALIDAD

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

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El tratamiento no será proporcionado por los investigadores. El paciente que acepte participar del estudio deberá costear su tratamiento, tal como lo realizaría si no participara en el estudio.

Debido a que se trata de tratamiento convencional y habitual y no experimental, los investigadores no costearán el tratamiento o gastos consecuencia de alguna complicación que pueda surgir de este.

No se dará ninguna compensación económica por la participación en este estudio.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Una vez finalizado el estudio, las muestras recogidas serán destruidas.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquier caso, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Si tiene alguna duda o desea mayor información, puede contactar con el Investigador Principal del estudio.

Muchas gracias por su colaboración.

Anexo 2. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: RESPUESTA A TRATAMIENTO DE RECEPTOR DE INMUNIDAD INNATA LRP1 (CD91) Y TREGS EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON VITILIGO NO SEGMENTAR

Yo (nombre y apellidos).....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

.....

Firma del paciente

Fecha:

.....

Firma del investigador

Fecha:

De conformidad con lo dispuesto en el art. 5.1 L0 15/1999, de 13 de diciembre, la Fundació de Gestió Sanitaria de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en cotitularidad con el Institut de Recerca pone en su conocimiento que dispone de un fichero con datos de carácter personal denominado "Investigació i Recerca".

La finalidad de su creación es la realización de estudios de investigación y ensayos clínicos. Los destinatarios de la información son todos los profesionales intervinientes en los estudios de investigación y ensayos clínicos del hospital.

En cualquier caso, puede ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición mediante comunicación escrita, adjuntando una fotocopia del DNI del participante, a la dirección del responsable del fichero: c/Sant Antoni Maria Claret, 167. 08025 Barcelona, indicando como referencia "ensayo clínico".

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

Anexo 3. Instrumentos psicológicos

HADS

1

Los médicos conocen la importancia de los factores emocionales en la mayoría de enfermedades. Si el médico sabe cuál es el estado emocional del paciente puede prestarle entonces mejor ayuda.
Este cuestionario ha sido confeccionado para ayudar a que su médico sepa cómo se siente usted afectiva y emocionalmente. No es preciso que preste atención a los números que aparecen a la izquierda. Lea cada pregunta y subraye la respuesta que usted considere que coincide con su propio estado emocional en la última semana.
No es necesario que piense mucho tiempo cada respuesta; en este cuestionario las respuestas espontáneas tienen más valor que las que se piensan mucho.

A.1. Me siento tenso/a o nervioso/a:
3. Casi todo el día
2. Gran parte del día
1. De vez en cuando
0. Nunca

D.1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre:
0. Ciertamente, igual que antes
1. No tanto como antes
2. Solamente un poco
3. Ya no disfruto con nada

A.2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder:
3. Sí, y muy intenso
2. Sí, pero no muy intenso
1. Sí, pero no me preocupa
0. No siento nada de eso

D.2. Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas:
0. Igual que siempre
1. Actualmente, algo menos
2. Actualmente, mucho menos
3. Actualmente, en absoluto

A.3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones:
3. Casi todo el día
2. Gran parte del día
1. De vez en cuando
0. Nunca

D.3. Me siento alegre:
3. Nunca
2. Muy pocas veces
1. En algunas ocasiones
0. Gran parte del día

A.4. Soy capaz de permanecer sentado/a tranquilo/a y relajado/a:
0. Siempre
1. A menudo
2. Raras veces
3. Nunca

D.4. Me siento lento/a y torpe:
3. Gran parte del día
2. A menudo
1. A veces
0. Nunca

A.5. Experimento una desagradable sensación de «nervios y hormigueos» en el estómago:
0. Nunca
1. Sólo en algunas ocasiones
2. A menudo
3. Muy a menudo

HADS2

	Nunca	Raramente	A veces	A menudo	Todo el tiempo
La piel me duele.					
Mi enfermedad de la piel afecta a mi sueño.					
Me preocupa que mi enfermedad de la piel pueda ser algo grave.					
Mi enfermedad de la piel dificulta mi trabajo o aficiones.					
Mi enfermedad de la piel afecta a mi vida social.					
Mi enfermedad de la piel me deprime.					
Mi enfermedad de la piel quema o escuece.					
Tiendo a quedarme en casa debido a mi enfermedad de la piel.					
Me preocupa que me queden cicatrices por mi enfermedad de la piel.					
La piel me pica.					
Mi enfermedad de la piel afecta a mi relación con las personas queridas.					
Me avergüenzo de mi enfermedad de la piel.					
Me preocupa que mi enfermedad de la piel empeore.					
Tiendo a hacer cosas en solitario por culpa de mi enfermedad de la piel.					
Estoy enfadado por mi enfermedad de la piel.					
El agua empeora mi enfermedad de la piel (baño, lavado de manos).					
Mi enfermedad de la piel me dificulta mostrar mi afecto.					
Mi piel está irritada.					
Mi enfermedad de la piel afecta mi relación con los demás.					
Mi enfermedad de la piel me produce situaciones embarazosas.					
Mi enfermedad de la piel es un problema para las personas que quiero.					
Estoy frustrado por mi enfermedad de la piel.					
Mi piel está sensible.					
Mi enfermedad de la piel afecta a mi deseo de estar con gente.					
Encuentro humillante mi enfermedad de la piel.					
Mi enfermedad de la piel sangra.					
Me enoja mi enfermedad de la piel.					
Mi enfermedad de la piel interfiere con mi vida sexual.					
Mi enfermedad de la piel me produce cansancio.					

PSS

Las preguntas en esta escala hacen referencia a sus sentimientos y pensamientos durante el **último mes**. En cada caso, por favor indique con una "X" cómo usted se ha sentido o ha pensado en cada situación.

	Nunca	Casi nunca	De vez en cuando	A menudo	Muy a menudo
1. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado afectado por algo que ha ocurrido inesperadamente?	0	1	2	3	4
2. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido incapaz de controlar las cosas importantes en su vida?	0	1	2	3	4
3. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido nervioso o estresado?	0	1	2	3	4
4. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha manejado con éxito los pequeños problemas irritantes de la vida?	0	1	2	3	4
5. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que ha afrontado efectivamente los cambios importantes que han estado ocurriendo en su vida?	0	1	2	3	4
6. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado seguro sobre su capacidad para manejar sus problemas personales?	0	1	2	3	4
7. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las cosas le van bien?	0	1	2	3	4
8. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que no podía afrontar todas las cosas que tenía que hacer?	0	1	2	3	4
9. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar las dificultades de su vida?	0	1	2	3	4
10. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido que tenía todo bajo control?	0	1	2	3	4
11. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado enfadado porque las cosas que le han ocurrido estaban fuera de su control?	0	1	2	3	4
12. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha pensado sobre las cosas que le quedan por hacer?	0	1	2	3	4
13. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar la forma de pasar el tiempo?	0	1	2	3	4
14. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las dificultades se acumulan tanto que no puede superarlas?	0	1	2	3	4

SKINDEX

D.5. He perdido el interés por mi aspecto personal:

3. Completamente
2. No me cuido como debería hacerlo
1. Es posible que no me cuido como debiera
0. Me cuido como siempre lo he hecho

A.6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme:

3. Realmente mucho
2. Bastante
1. No mucho
0. En absoluto

D.6. Espero las cosas con ilusión:

0. Como siempre
1. Algo menos que antes
2. Mucho menos que antes
3. En absoluto

A.7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o temor:

3. Muy a menudo
2. Con cierta frecuencia
1. Raramente
0. Nunca

D.7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión:

0. A menudo
1. Algunas veces
2. Pocas veces
3. Casi nunca

Anexo 4.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo observacional, prospectivo, unicéntrico, con grupo control.

El estudio evaluó en 40 individuos adultos de ambos sexos, 20 controles sanos y 20 pacientes con vitíligo no segmentario y activo (en crecimiento en los últimos 6 meses a juicio del paciente). Ninguno de los pacientes estaba en uso de antiinflamatorios o corticoesteroides.

Se realizó la determinación en sangre periférica del receptor LRP1/CD91 mediante fluorescencia directa para ver la cantidad expresada en la superficie de los monocitos y en plasma para cuantificar la forma soluble mediante técnica de ELISA.

Se realizó además la determinación de CD4, CD25, CD45RO y CD127 (células T reguladoras) en sangre periférica antes y 16 semanas después de intervención terapéutica a criterio del responsable clínico.

Los pacientes con vitíligo se les entregó para completar los test para medir depresión y percepción de enfermedad, stress PSS-10, Skindex, HADS y escala de Likert de 1 a 7 (de mucho peor a mucho mejor)

Título del estudio: RESPUESTA A TRATAMIENTO DE RECEPTOR DE INMUNIDAD INNATA LRP1 (CD91) Y TREGS EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON VITILIGO NO SEGMENTAR

Promotor del estudio: Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau – IIB Sant Pau

Centro participante: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Investigador principal: Jaime Piquero Casals

Investigadores colaboradores: Dr Agustín Alomar Muntañola, Dr Eduardo Rozas, Dra Sandra Ros del servicio de Dermatología del HSCSP. Dra Laura Martínez Martínez del servicio de Inmunología del HSCSP.

Investigador coordinador: Dr Luis Puig Sanz, Director del servicio de Dermatología del HSCSP.

Comité ético de investigación clínica: C.E.I.C. del HSCSP

Código del estudio: IIBSP-VIT-2015-69

Enfermedad a estudio: Vitíligo no segmentario en actividad

Duración Prevista del estudio

La duración estimada del periodo de inclusión fue de 6 meses. El último paciente finalizó el estudio al cabo de 16 semanas tras la inclusión.

Primer paciente incluido: 28 de Septiembre 2015

Inclusión del último paciente: 28 de Marzo 2016

Finalización del último paciente en el estudio: 28 de Agosto 2016

Finalización del estudio: Septiembre 2016

Duración total del estudio: 1 año

Consideraciones Éticas

El estudio se llevó a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para investigación en humanos.

El investigador explicó al paciente la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimientos, duración estimada, los potenciales riesgos y beneficios relacionados con la participación en el estudio, así como cualquier inconveniente que éste le pudiera suponer. Cada uno de los participantes fue advertido de que su participación en el estudio era voluntaria y de que podía abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afectase a su tratamiento posterior, ni a su relación con los profesionales que le tratan.

Para ello se diseñó una hoja de información /consentimiento para el paciente.

El estudio no modificaba el tratamiento de los pacientes, ya que recibieron el tratamiento indicado habitual hasta ahora para el control y reducción de la enfermedad. Además se trata de un tratamiento inocuo y todos fueron sometidos a estudios en sangre periférica para evaluación de su status inmunológico.

En el estudio se permitieron las monitorizaciones, auditorias, revisiones del CEIC e inspecciones reguladoras relacionadas con el estudio, facilitando el acceso directo a los documentos/datos originales.

Reclutamiento de Pacientes

Se estableció una forma de derivación temprana para el reclutamiento de estos pacientes. Se planteó una forma de derivación, en los cuales, los pacientes de consulta externa del Servicio de Dermatología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau adultos, hombres o mujeres, con vitiligo no segmentario activo se invitaron a participar. Además, se invitó a médicos de atención primaria que se encuentran en la provincia de Barcelona para referir pacientes que presenten lesiones acrómicas en piel sugestivas de vitiligo.

Procedimientos del estudio

Posterior a la autorización por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, se realizó el reclutamiento de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión de este estudio.

Se obtuvo un consentimiento informado por parte del paciente tras la explicación del estudio y de los riesgos y beneficios de participar.

De manera basal, se realizó un examen físico básico y de las lesiones dermatológicas. Evaluación al ojo desnudo y con lámpara de Wood, historia clínica y documentación fotográfica.

Se realizaba extracción de sangre venosa periférica para determinación del estado de activación del receptor CD91 (LRP1) y células Tregs en células mononucleares en 10 controles adultos sin enfermedad aparente o uso de antiinflamatorios y 20 pacientes adultos con vitiligo no segmentario activo, en situación basal y nuevamente se realizará extracción en los pacientes con

vitíligo a las 12-16 semanas de intervención terapéutica a criterio del responsable clínico.

Los pacientes con vitíligo se les indicaba para completar test para medir depresión, percepción de enfermedad, stress (PSS-10, Skindex, HADS, Likert) antes y luego de 12 a 16 semanas.

En cada una de las visitas, se evaluaba a cada paciente siguiendo la práctica habitual.

Una vez finalizado el estudio, los pacientes siguieron el tratamiento y controles habituales.

Análisis estadístico

Se trata un estudio piloto en el que se tomó en consideración el número de muestras por kit de reactivos LRP1, CXCL10, CD4, CD25, CD45, CD127 para decidir el número de participantes.

Acontecimientos Adversos

El investigador debía notificar al promotor todos los casos de sospechas de reacciones de reacciones adversas graves (SRAG) que ocurrieron tanto con el/los medicamentos en estudio, como con los comparadores, identificando el nombre comercial cuando era posible, sino lo era indicando el principio activo. El promotor, a su vez, debía notificarlo al Sistema Español de Farmacovigilancia.

En el caso de que surgiera una SRAG con un medicamento que no formara parte del estudio era el investigador quien lo notificaba mediante el envío de tarjeta amarilla, al centro autonómico de farmacovigilancia.

Se define como reacción adversa grave aquella que:

- Provoque la muerte,
- Amenace la vida del paciente,
- Provoque su hospitalización, o la prolongue,
- Ocasione incapacidad laboral o escolar,
- Induzca defectos congénitos, o
- Sea importante bajo criterio médico

Aspectos Éticos

Consideraciones Generales

El estudio se llevó a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para investigación y ensayos clínicos en humanos. El investigador era responsable de garantizar que el ensayo clínico se realizara de acuerdo con las normas recogidas en la Declaración de Helsinki y siguiendo las recomendaciones del Ministerio de Sanidad español en materia de estudios observacionales.

El estudio se desarrolló de acuerdo con el protocolo y con los Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNTs) que aseguraban el cumplimiento de las normas de Buena Práctica Clínica (BPC), tal como se describe en las Normas Tripartitas Armonizadas de la ICH para Buena Práctica Clínica 1996.

Se le informó al CEIC de cualquier enmienda posterior al protocolo y se solicitó su opinión en el caso de que fuera necesario una nueva evaluación de los aspectos éticos del ensayo.

Hoja de información al paciente y consentimiento

Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes. El paciente no participó en ningún procedimiento específico del estudio antes de firmar su consentimiento.

Antes del comienzo del estudio y antes de la obtención del consentimiento informado, el investigador o la persona designada por el mismo, explicó al sujeto participante los objetivos, métodos y riesgos potenciales del estudio y cualquier molestia que éste pudiera ocasionarle.

La explicación acerca de la naturaleza, alcance y posibles consecuencias del estudio se realizaron en un lenguaje entendible.

Se le dio tiempo suficiente para meditar su participación en el estudio, y tener la oportunidad de formular preguntas. Después de esta explicación, y antes de entrar en el estudio, el consentimiento quedó adecuadamente registrado mediante la firma del sujeto. Como Anexo se presenta el Modelo de Hoja de Información al Paciente y de Formulario de Consentimiento.

Evaluación de los beneficios y riesgos previsibles para los sujetos del estudio y otros posibles pacientes

Los beneficios fueron los propios del tratamiento indicado por el responsable clínico, además de la evaluación serológica de la respuesta inmune.

El riesgo es el propio de cualquier paciente que se someta a tratamiento en vitíligo.

Es decir, dado que se trata de un estudio observacional en el que no se modifica el tratamiento indicado en la patología los posibles riesgos y beneficios para el paciente fueron los mismos que si no participara en el estudio.

Tratamiento de muestras biológicas

En lo referente al tratamiento de muestras biológicas, fue de aplicación lo dispuesto en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007, de 3 de julio, específicamente en los capítulos III y IV del título V, así como lo dispuesto en el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, específicamente en el capítulo I del título II, por el que se establece el tratamiento de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica.

Una vez finalizado el estudio, las muestras biológicas fueron destruidas.

Confidencialidad de los datos

Para preservar la confidencialidad de los datos personales de los sujetos, únicamente el investigador principal, sus colaboradores y el personal técnico que participaron en el estudio tuvieron acceso a la identidad de los mismos. Por el mismo motivo, los datos completos de filiación y el consentimiento por escrito se guardaron en el archivo del investigador del centro.

En lo referente a la confidencialidad de los datos del estudio se sigue lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de "Protección de Datos de Carácter Personal". De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter personal, los datos personales que se requieren de los pacientes fueron los necesarios para cubrir los objetivos de este estudio. En ninguno de los informes del estudio apareció su nombre y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de

carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada por medios informáticos en condiciones de seguridad por los investigadores del estudio. El acceso a dicha información será restringido y se realizará siempre bajo condiciones de confidencialidad. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica, sin que la identidad de los sujetos participantes conste en ningún caso.

De acuerdo con la ley vigente, el sujeto participante en el estudio tiene derecho al acceso de sus datos personales y, si está justificado, tiene derecho a solicitar su rectificación o cancelación.

La información referente a la identidad de los pacientes será considerada confidencial a todos los efectos. La identidad de los pacientes no podrá ser desvelada ni divulgada. Los datos de los pacientes recogidos en el Cuaderno de Recogida de Datos durante el estudio, deberán documentarse de manera anónima y disociada, vinculándose a un código (número de paciente), de manera que únicamente el investigador podrá asociar tales datos a una persona identificada o identificable.

La base de datos que genere el estudio no contendrá identificación alguna del paciente, más que un código numérico por el que no será posible desvelar su identidad. La información recogida en el estudio, siempre se tratará como datos agrupados y nunca como datos individuales o personales, manteniendo de esta forma el anonimato y la confidencialidad.

Consideraciones Prácticas

Responsabilidad de los Participantes en el estudio

Investigadores

El investigador principal se responsabilizaba de llevar a cabo el estudio de acuerdo con las normativas correspondientes. El investigador principal y sus colaboradores se comprometieron a practicar a todos los sujetos incluidos en el ensayo, todas y cada una de las exploraciones y pruebas complementarias que se especifican en el protocolo.

Responsabilidades del personal auxiliar

El personal auxiliar que colaboró en el estudio cumplió las normas generales establecidas para la realización del ensayo y siguió en todo momento las instrucciones del investigador.

Condiciones de Archivo de los Datos y Correcciones

Los datos obtenidos se transcribieron en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) y estos datos se consideraron la información válida para la evaluación posterior de los resultados del estudio. Los Cuadernos se cumplimentaron correctamente y en caso de que deban corregirse datos ya transcritos estos se tacharán anotándose al lado el valor correcto. Las correcciones han estado siempre fechadas y validadas por la firma del investigador principal.

Los documentos correspondientes a este estudio se archivarán hasta cinco años tras la finalización del ensayo clínico. En cualquier caso, siempre se mantendrá una lista de identificación de los participantes. El promotor, el Institut

de Recerca, mantendrá un archivo principal del estudio durante un periodo de cinco años.

Correcciones al Protocolo del Estudio Clínico

Cualquier cambio realizado en el protocolo del estudio adoptó siempre la forma de enmienda o addendum por escrito. Para su formalización, se requirió la aprobación de todas las personas responsables del estudio que también firmaron el protocolo. Y si hubiesen sido modificaciones relevantes, era necesaria la aprobación expresa del Comité Ético y de las autoridades sanitarias.

Condiciones de Publicación

Los resultados obtenidos como consecuencia de la investigación clínica fueron revisados y discutidos por el equipo investigador y el promotor para su posterior publicación.

Los datos obtenidos no se dieron a conocer a terceras partes hasta llegar a un acuerdo con el promotor para su divulgación, bien sea en forma de conferencia, comunicación a congreso, o publicación. Como excepción, los investigadores podrán incluir el título del ensayo en sus respectivos Curriculum Vitae, siempre que no incluyera ningún dato del promotor.

Elaboración del Informe Final

Tras obtener las conclusiones del estudio, se elaboró un informe final en colaboración con el promotor. Dicho informe incluyó el análisis estadístico y una valoración médica de los resultados. Este informe se basó en los objetivos señalados en el protocolo del estudio.

Financiación

Este estudio fue financiado con fondos propios del investigador principal.

