

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO DE IL-17  
Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE DESARROLLO DE VITILIGO”**

**Por**

**DR. (A) NATALIA ARANZA ZAPATA SALAZAR**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

**Diciembre, 2021**

**“ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO DE IL-17 Y SU  
ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE DESARROLLO DE VITILIGO”**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dr. med Jorge Ocampo Candiani**  
Jefe del Servicio de Dermatología,  
Coordinador de Investigación y  
Director de la Tesis



---

**Dr. C. Mauricio Salinas Santander**  
Co-Director de la Tesis



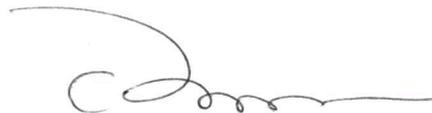
---

**Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**  
Co-Directora de la Tesis



---

**Dra. med Minerva Gómez Flores**  
Coordinadora de Enseñanza



---

**Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

Este logro quiero dedicarlo a mi esposo, Ing. Eduardo A. Elizondo Cabello, quien a lo largo de 10 años me ha visto crecer de forma personal y profesional, y de quien incondicionalmente siempre he recibido amor, paciencia y apoyo en este sueño que estoy por culminar. Gracias por nunca dejar de creer en mí, recordarme siempre lo importante de ver lo bueno de las cosas y tomarme muy fuerte de la mano en este camino, sobre todo en los momentos más difíciles. Tu ayuda ha sido fundamental para seguir adelante.

A mis padres, el Dr. Homero Zapata Chavira y la Dra. Laura Salazar Mendoza, que es por ellos que estoy aquí, quienes me han impulsado desde pequeña a lograr mis sueños, especialmente el de convertirme en doctora y ahora dermatóloga. Gracias por ser mi sustento siempre, por impulsarme a hacer mi máximo esfuerzo y sobre todo por nunca dejar de creer en mí. Son mi fuente de motivación e inspiración; sin todos los sacrificios que han hecho por mí, no estaría logrando esto.

A mi hermano Dr. Homero Diego Zapata Salazar, no hay quien me conozca como tú lo haces, gracias por todo el apoyo que me has brindado, tanto en asuntos personales y profesionales. Gracias por estar siempre presente, respaldándome e impulsándome.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco enormemente el apoyo del Dr. Mauricio Salinas Santander y Dra. Celia Sánchez Domínguez, por gran su interés en este trabajo y de quienes tuve un gran apoyo durante la realización de éste, sin ellos no habría podido lograrlo. Gracias por sus enseñanzas, consejos y sugerencias, así como por el tiempo dedicado a apoyarme con el procesamiento de muestras. Gracias por su paciencia a lo largo de este camino, estaré siempre agradecida. También al Dr. David Kubelis López, mi amigo y compañero de tesis, con quien trabajé durante estos 3 años en conjunto, gracias por tu paciencia y apoyo siempre.

También agradezco enormemente a Ana Cecilia Xolalpa y Eugenia Gómez Galindo, quienes fueron una parte esencial en este trabajo, ayudando con el reclutamiento de pacientes y procesamiento de muestras. Gracias por su apoyo y disposición.

A mis maestros del Servicio de Dermatología, por darme la oportunidad de poder hacer la residencia en este lugar del cual tanto he aprendido. Gracias por sus enseñanzas y consejos durante mi residencia, me llevo mucho de cada uno. Especialmente agradezco al Dr. Ocampo, Jefe del Servicio de Dermatología y quien además es mi tutor de esta tesis. Gracias por ser un gran ejemplo de líder para todos nosotros, quienes sentimos una gran admiración, y sobre todo por brindarme su confianza para poder llevar a cabo esto.

A mis hermanos durante esta residencia, Lucy, Kubelis, Luis y Lizz, quienes hicieron este camino mucho más feliz y bonito. Gracias por su confianza, por escucharme y apoyarme tanto durante estos años. Siempre voy a estar agradecida por su amistad, que sé que no se va a quedar aquí.

## TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I	PÁGINA
1. RESUMEN.....	1
CAPÍTULO II	
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1 DEFINICIÓN.....	3
2.2 EPIDEMIOLOGÍA .....	4
2.3 FISIOPATOLOGÍA .....	5
2.4 ROL DE LA IL-17 EN LA FISIOPATOGENIA DEL VITILIGO. . .	12
2.5 POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL VITILIGO .....	17
2.6 CUADRO CLÍNICO.....	18
2.6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	18
2.6.2 CLASIFICACIÓN.....	19
2.7 DIAGNÓSTICO.....	21
2.8 TRATAMIENTO.....	25
2.8.1 NUEVOS TRATAMIENTOS .....	26
CAPÍTULO III	
3. JUSTIFICACIÓN .....	28
CAPÍTULO IV	
4. HIPÓTESIS	
4.1 HIPÓTESIS.....	30
4.2 HIPÓTESIS NULA .....	30

## CAPÍTULO V

5. OBJETIVOS .....	31
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31

## CAPÍTULO VI

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 TAMAÑO DE LA MUESTRA Y SELECCIÓN DE PACIENTES.....	33
6.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA CASOS.....	34
6.1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA CONTROLES.....	34
6.1.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	34
6.2 DISEÑO DEL PROTOCOLO.....	34
6.3 EVALUACIÓN CLÍNICA .....	36
6.4 DESCRIPCIÓN DE PROTOCOLO EN LABORATORIO.....	36
6.4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	36
6.4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	37
6.4.3 EXTRACCIÓN DE ADN CON MUESTRA DE SANGRE VENOSA PERIFÉRICA CON TÉCNICA DE LISIS CELULAR POR TSNT .....	37
6.4.4 VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN.....	38
6.4.5 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS a) GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO IL-17 RS4711998 (A-832G).....	40

b) GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO IL-17	
RS2275913 (-197G/A) . . . . .	41
c) GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO IL-17	
RS763780 (7488A/G) . . . . .	42
6.4.6 EQUIPOS EMPLEADOS Y PROCEDIMIENTO. . . . .	44
6.4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO . . . . .	44
CAPÍTULO VII	
7. RESULTADOS. . . . .	46
7.1 ANÁLISIS CLÍNICO Y DEMOGRÁFICO. . . . .	46
7.2 ANÁLISIS GENÉTICO . . . . .	48
CAPÍTULO VIII	
8. DISCUSIÓN . . . . .	55
CAPÍTULO IX	
9. CONCLUSIÓN. . . . .	60
CAPÍTULO X	
10. ANEXOS. . . . .	61
10.1 CARTA DE APROBACIÓN. . . . .	61
CAPÍTULO XI	
11. BIBLIOGRAFÍA. . . . .	62
CAPÍTULO XII	
12. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO. . . . .	66

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Clasificación de vitiligo de la VGICC. ....	20
Tabla 2. Tratamientos potenciales del vitiligo. ....	27
Tabla 3. Estrategia PCR-RFLP para determinación de polimorfismos en IL-17A e IL-17F. ....	40
Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los participantes. ....	47
Tabla 5. Frecuencia de genotipos y subtipos de vitiligo. ....	49
Tabla 6. Comparación de genotipos contra variables continuas. ....	50
Tabla 7. Casos y Controles tablas de contingencia – Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17 rs763780 (7488A/G) ....	52
Tabla 8. Casos y Controles tablas de contingencia - Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17 rs2275913 (-197G/A) ....	53
Tabla 9. Casos y Controles tablas de contingencia - Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17A rs4711998 (-832A/G) ....	54
Tabla 10. Genes mutados asociados con mecanismos de despigmentación en vitiligo ....	57

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Prevalencia mundial del vitiligo . . . . .	4
Figura 2. Mecanismo de patogenia del vitiligo . . . . .	5
Figura 3. El melanocito y su ambiente. . . . .	11
Figura 4. El rol de la IL-17 en la destrucción de melanocitos . . . . .	13
Figura 5. Mecanismos patogénicos mediados por IL17 en la piel . . . . .	15
Figura 6. Cuadro clínico de vitiligo . . . . .	19
Figura 7. Regla de los nuevees para evaluar extensión del vitiligo . . . . .	23
Figura 8. Fórmula utilizada para el cálculo del tamaño de la muestra . . . . .	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **°C:** Centígrado
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **anti-TNF:** Tumor necrosis factor inhibitors (Inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa)
- **CAM-1:** Molécula de adhesión celular 1
- **CI:** Confidence interval (Intervalo de confianza)
- **CXCL9:** C-X-C Motif Chemokine Ligand 9 (proteína 9 inducida de interferón gamma)
- **CXCL10:** C-X-C motif chemokine ligand 10 (proteína 10 inducida de interferón gamma)
- **CXCR3:** C-X-C Motif Chemokine Receptor 3
- **dNTPs:** Desoxirribonucleotido trifosfato
- **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
- **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzimoinmunoanálisis de adsorción)
- **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- **HPS70:** Heat shock protein 70 (Proteínas de shock térmico de 70 KDa)
- **IL-17:** Interleucina 17
- **IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma
- **IMC:** Índice de masa corporal
- **JAK:** Janus kinase
- **JAK-STAT:** Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway ( Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción)
- **Kg:** Kilogramo
- **m:** metros
- **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio
- **MHC II:** Complejo mayor de histocompatibilidad

- **ml:** Mililitros
- **mM:** Milimoles
- **NaCl:** Cloruro de sodio
- **ng/uL:** nanogramos/mililitro
- **nm: Nanómetros**
- **NSV:** Vitiligo no segmentario
- **OR:** Odds ratio (Razón de momios)
- **PASI:** Psoriasis Area Severity Index
- **pb:** pares de base
- **PCR-RFLP:** Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- **ROS:** Reactive oxygen species
- **rpm:** Revoluciones por minuto
- **SNP:** Polimorfismo de nucleótido único
- **SOX9:** SRY-Box Transcription Factor 9
- **SOX10:** SRY-Box Transcription Factor 10
- **TNF-a:** Tumor necrosis factor
- **Tris-HCl:** Tris (hydroxymethyl) aminomethane (THAM) hydrochloride
- **TRP-1:** Tirosinasa relacionada a proteína 1
- **TRP-2:** Tirosinasa relacionada a proteínas 2
- **TSNT:** Dodecil sulfato de sodio:
- **μl:** Microlitro
- **UVB-nb:** Narrow band ultraviolet B
- **VASI:** Vitiligo Area Scoring Index
- **VETI:** Vitiligo Extent Tensity Index
- **VGICC:** Vitiligo Global Issues Consensus Conference

## **CAPÍTULO I**

### **1.- RESUMEN**

El vitiligo es un trastorno despigmentante crónico adquirido de la piel caracterizado clínicamente por máculas y parches acrómicos con márgenes bien definidos. Aunque la causa exacta aún se encuentra en debate, se conoce que es el resultado de la pérdida selectiva de melanocitos que a su vez provoca la dilución del pigmento en las áreas afectadas.

La evidencia sugiere que el estrés en los melanocitos puede resultar en la activación del sistema inmunológico innato, el cual desarrolla inflamación y finalmente conduce a la activación de la inmunidad adaptativa. La activación de la inmunidad adaptativa facilita la autoinmunidad, destrucción y progresión de la enfermedad. Las células T citotóxicas CD8 + activadas están involucradas en la disfunción, despigmentación y apoptosis de los melanocitos. Además, también existen alteraciones en la secreción de citocinas de los subconjuntos de las células T CD4 + que incluyen células Th1, Th2 y Th17. Se ha reportado que el aumento en el número de células Th17 circulantes se correlaciona con la extensión de la enfermedad. Además, recientemente, fue descrito un aumento del nivel de IL-17A en la piel y el suero de los pacientes con vitiligo.

Ante la incertidumbre de si las variantes en el gen de la IL-17 pueden modular la susceptibilidad al desarrollo del vitiligo, este estudio tuvo como objetivo estimar

la asociación de determinados polimorfismos del gen IL-17 con la susceptibilidad a desarrollar vitiligo en una población del noreste de México. Se incluyeron 116 pacientes con vitiligo y 116 controles sanos. El diagnóstico de vitiligo fue realizado por un dermatólogo, quien obtuvo características clínicas y heredofamiliares de los pacientes. A todos los sujetos incluidos se les tomó una muestra de sangre para la obtención de ADN.

La caracterización de los genotipos de IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A), IL-17 rs763780 (7488A/G) fue realizado utilizando la técnica de PCR-RFLP. Se realizó un análisis estadístico para determinar la relación SNP de las variables continuas y categóricas de los sujetos estudiados, mediante SPSS, considerando una  $P \leq 0.05$  como significativa. Para el polimorfismo IL-17 rs763780 (7488A/G), la combinación de los genotipos GG/GA son un factor de riesgo para el desarrollo del vitiligo (OR = 2.0943, 95% CI 1.2375-3.5445,  $p= 0.0056$ ). En cuanto a la genotipificación de IL-17A rs4711998 (-832A/G) y de IL-17 rs2275913 (-197G/A), no se encontró asociación entre estos SNP y el riesgo de desarrollo de vitiligo. En conclusión, el SNP rs763780 en el gen IL-17 es un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad en la población analizada.

## **CAPÍTULO II**

### **2.- INTRODUCCIÓN**

#### **2.1 Definición**

El vitiligo es la enfermedad despigmentante más frecuente caracterizada por máculas acrómicas, usualmente de distribución simétrica. Éstas pueden aumentar o disminuir con el tiempo e histológicamente presentan una pérdida epidérmica de melanocitos [1]. Éste se divide en vitiligo segmentario, vitiligo no segmentario y vitiligo indeterminado, con sus respectivas subclasificaciones que serán explicadas detalladamente más adelante [2]. Se deberán excluir otras enfermedades despigmentantes, como el piebaldismo, esclerosis tuberosa, linfoma, psoriasis, dermatitis atópica, micosis fungoides, pitiriasis versicolor, lepra, entre otras [3]. Múltiples desórdenes de la piel pueden enmascarar un vitiligo, por lo que algunas veces se requiere de la toma de biopsia para poder descartar otros diagnósticos [4].

El vitiligo es una enfermedad compleja que asocia factores genéticos, ambientales, metabólicos e inmunes. Se sugiere un defecto primario en los melanocitos, sin embargo, se ha estudiado un papel importante de la inflamación y autoinmunidad en la enfermedad [4].

## 2.2 Epidemiología

El vitiligo tiene una prevalencia estimada del 0.5-2% de la población mundial, sin tener una predilección de sexo [5]. Los países con el mayor índice de prevalencia son India (8,8%), México (2,6-4%) y Japón ( $\geq 1,68\%$ ) [1]. En la Figura 1 se representa la prevalencia mundial del vitiligo [1].

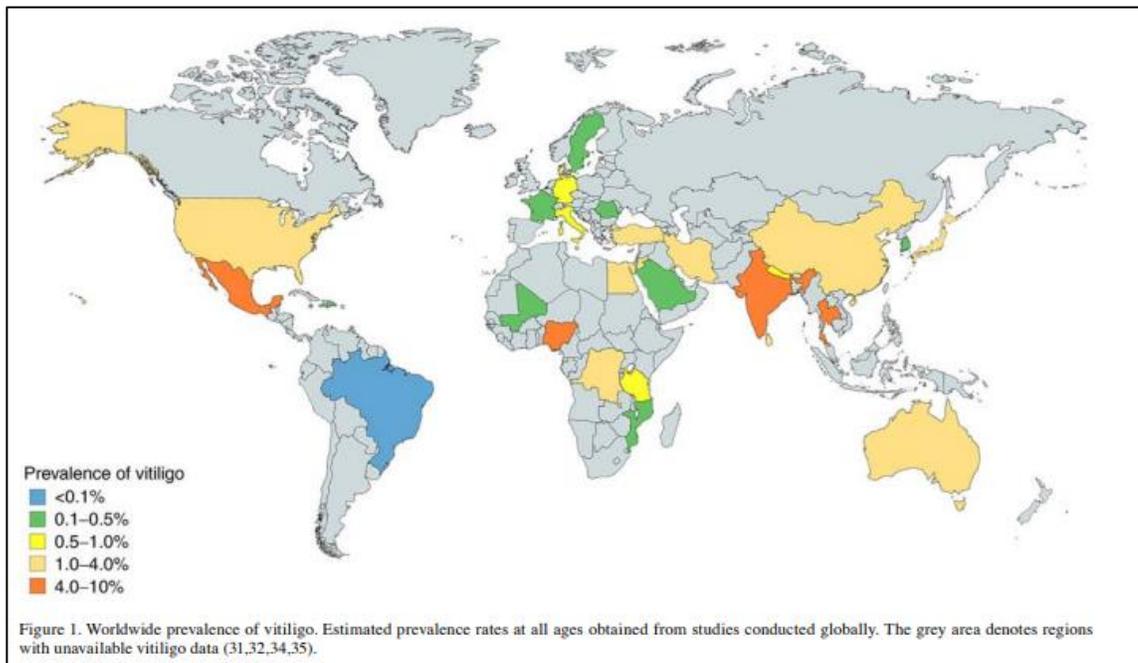


Figura 1. Prevalencia mundial del vitiligo. Adaptado de: Said-Fernández y cols. 2021. [1]

La mayor incidencia se ha observado en la infancia o adultos jóvenes, con un pico entre los 10 y los 30 años [6, 7]. Además, en 4-6% de los casos hay parientes de primera línea afectados [8, 9]. También se ha considerado la consanguinidad como un factor de riesgo importante para vitiligo, De acuerdo con estudios realizados en Arabia Saudita, se encontró que el 40,6% de los casos mostraron consanguinidad parental que fue mayor en primos (27,5%) [10]. Asimismo, en estudios donde fueron examinados gemelos monocigóticos se observó que las tasas de concordancia (probabilidad de que ambos presenten la característica

cuando esta se presenta en un miembro del par) era del 23%, lo que sugería una fuerte contribución ambiental a la patogénesis [11].

## 2.3 Fisiopatología

Existen múltiples mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad, por lo que ésta es considerada una enfermedad multifactorial. Algunos mecanismos involucrados en la desaparición de melanocitos son la predisposición genética, desencadenantes ambientales, anomalías metabólicas y algunas enfermedades autoinmunes e inflamatorias [4]. La Figura 2 representa de manera esquemática su patogénesis [2]

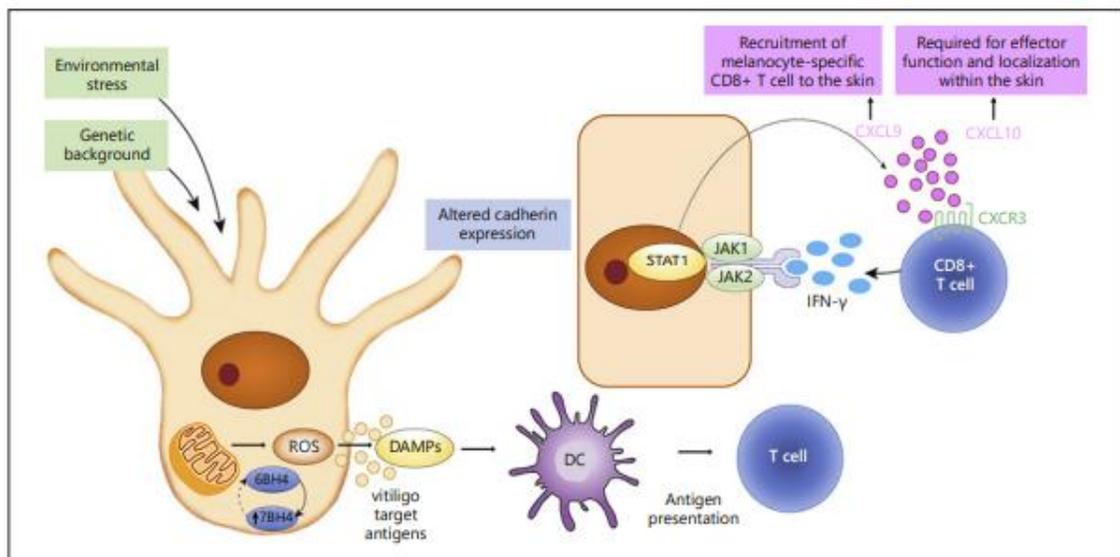


Figura 2. Mecanismo de patogénesis del vitiligo. En la figura se presenta un esquema de los factores que desencadenan el vitiligo, entre ellos el estrés oxidativo, mecanismos de señalización y respuesta inmune, entre otros factores. Adaptado de: Bergqvist C, y cols. 2020 [2]

#### a) Teoría humoral

Esta teoría hace referencia a la presencia de autoanticuerpos, ya que en pacientes con vitiligo se han encontrado diferentes autoanticuerpos, tales como los anticuerpos contra la tirosinasa y tirosinasa relacionada a proteínas 1 y 2 (TRP-1, TRP-2), SOX9 y SOX10, éstos últimos involucrados en la diferenciación de células que derivan de la cresta neural [10].

#### b) Teoría del estrés oxidativo

En la teoría del estrés oxidativo, los principales culpables del desarrollo de esta patología son la presencia de las especies reactivas de oxígeno, ya que estas provocan cambios mitocondriales conduciendo a la consiguiente apoptosis de los melanocitos [12]. En vitiligo, los melanocitos de pacientes con vitiligo tienen menor adhesividad y son más susceptibles al estrés oxidativo. El estrés ambiental adicional, en presencia de un trasfondo genético susceptible, provoca alteraciones generalizadas del sistema antioxidante. Las mitocondrias parecen ser inductores clave de ROS, y los pacientes con vitiligo tienen una alteración en la funcionalidad mitocondrial. El estrés oxidativo perjudica la función de lípidos de membrana y proteínas celulares. La síntesis de biopterina y el reciclaje también se altera, lo que lleva a un mayor estrés oxidativo y daño celular. La sobreproducción de ROS hace que los melanocitos secreten exosomas que contienen antígenos específicos de melanocitos, proteínas de choque térmico y patrones moleculares asociados a daños. Estos exosomas entregan antígenos diana del vitiligo a las células dendríticas cercanas e inducen su maduración en células presentadoras de antígenos eficientes. Esto es seguido por la activación de células Th17 impulsada por citocinas y quimiocinas. Ver Figura 2 [2].

#### c) Teoría de autocitotoxicidad

Algunos metabolitos tóxicos intracelulares (como aquellos que se forman durante la síntesis de melanina) y extracelulares (como los fenoles y quininas) pueden acumularse y causar daño a melanocitos susceptibles genéticamente, provocando daño autocitotóxico a los melanocitos. La tirosina durante la melanogénesis produce algunos productos inestables que también pueden causar daño y muerte a melanocitos [10].

#### d) Teoría de la melanocitorragia

Ésta teoría propone que el vitiligo no segmental es un trastorno primario con melanocitos que responden a la fricción y se induce una separación, apoptosis y pérdida transepidérmica, que pudiera explicar el fenómeno de Koebner [10].

Los melanocitos están pobremente unidos al colágeno tipo IV en pacientes con vitiligo inestable, mientras que se encuentran unidos firmemente en la enfermedad estable [10]. Además, se ha reportado que las dendritas de los melanocitos son pequeñas e incapaces de adherirse a la membrana basal y a los queratinocitos por lo que también participan en la pérdida transepidérmica [10].

La tenacina es una molécula que inhibe la adhesión de los melanocitos a la fibronectina y se ha demostrado que ésta se ve aumentada en los pacientes con

vitiligo, favoreciendo la pérdida de melanocitos, conocida como melanocitorragia [10].

e) Hipótesis neurohumoral

Se ha visto que diversos factores estresantes contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, debido a la liberación de neuropéptidos, como el neuropéptido Y, que desencadenan una cascada de reacciones que destruyen melanocitos. También se han encontrado niveles aumentados de norepinefrina y niveles bajos de acetilcolinesterasa, así como aumento en la expresión de la hormona liberadora de corticotropina, que tiene asociación directa con el estrés [10].

f) Teoría de la deficiencia de vitamina D

Los receptores de la vitamina D son encontrados en células involucradas en el metabolismo del calcio y los huesos, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos y células del sistema inmune y se ha estudiado como los niveles de esta vitamina aumentan la melanogénesis. En una revisión sistemática reciente se estudió la presencia de niveles deficientes de la vitamina D en pacientes con vitiligo. Esto se ve apoyado por la buena respuesta al tratamiento con los análogos de la misma, como el calcipotriol [13].

#### g) Teoría de la convergencia

Ya que ningún proceso es suficiente para poder explicar por completo la patogénesis, se han propuesto las teorías convergentes, combinando factores bioquímicos, ambientales, inmunológicos, genéticos y autocitotóxicos, que contribuyen al desarrollo del vitiligo y no son excluyentes uno del otro [14].

#### h) Teoría autoinmune/inflamatoria

Es la más apoyada debido a que se ha encontrado asociación entre el vitiligo y otros trastornos autoinmunes, como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren primario, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal. Tanto la inmunidad celular como la humoral se encuentran involucradas en la patogénesis [4]. Además, se ha reportado recientemente acerca de la pobre adaptación de los melanocitos a factores estresantes que los llevan a sufrir una inestabilidad en la capa basal y a la liberación de señales importantes para la activación del sistema inmune [4]. En la Figura 3 se representa cómo se comportan los melanocitos con el ambiente [15].

Por otra parte, las células juegan parte importante en el desarrollo con los CD8+ citotóxicos. Se ha encontrado un ratio aumentado de CD8+/CD4+ en biopsias de piel perilesional. Estas células provocan cambios degenerativos en células basales en piel perilesional aparentemente sana en enfermedad activa [10].

Además, hay un aumento en la expresión de CD25 y MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad) y de la habilidad para secretar IFN- $\gamma$  (interferon gamma) de las células T, que aumentan la expresión de la molécula de adhesión intracelular 1, con el consiguiente aumento de migración de células T a la piel [10]. El IFN- $\gamma$  tiene un papel central mediante la expresión aumentada de CXCL10, también conocido como proteína 10 inducida por interferón gamma regula la invasión de células CD8+ a epidermis y dermis. Además, se ha observado que los niveles de IFN- $\gamma$  se correlacionan con la progresión del vitiligo [10]. La unión de IFN- $\gamma$  a su receptor activa la vía JAK-STAT y conduce a la secreción de CXCL9 y CXCL10 en la piel. Mediante el receptor afín CXCR3, CXCL9 promueve el reclutamiento masivo de células T CD8 + específicas de melanocitos en la piel, mientras que CXCL10 promueve su localización dentro de la epidermis y su función efectora, que aumenta la inflamación a través de un bucle de retroalimentación positiva. Ver Figura 2 [2].

Adicionalmente, también se ha visto la participación de la IL-17 en la patogénesis del vitiligo.

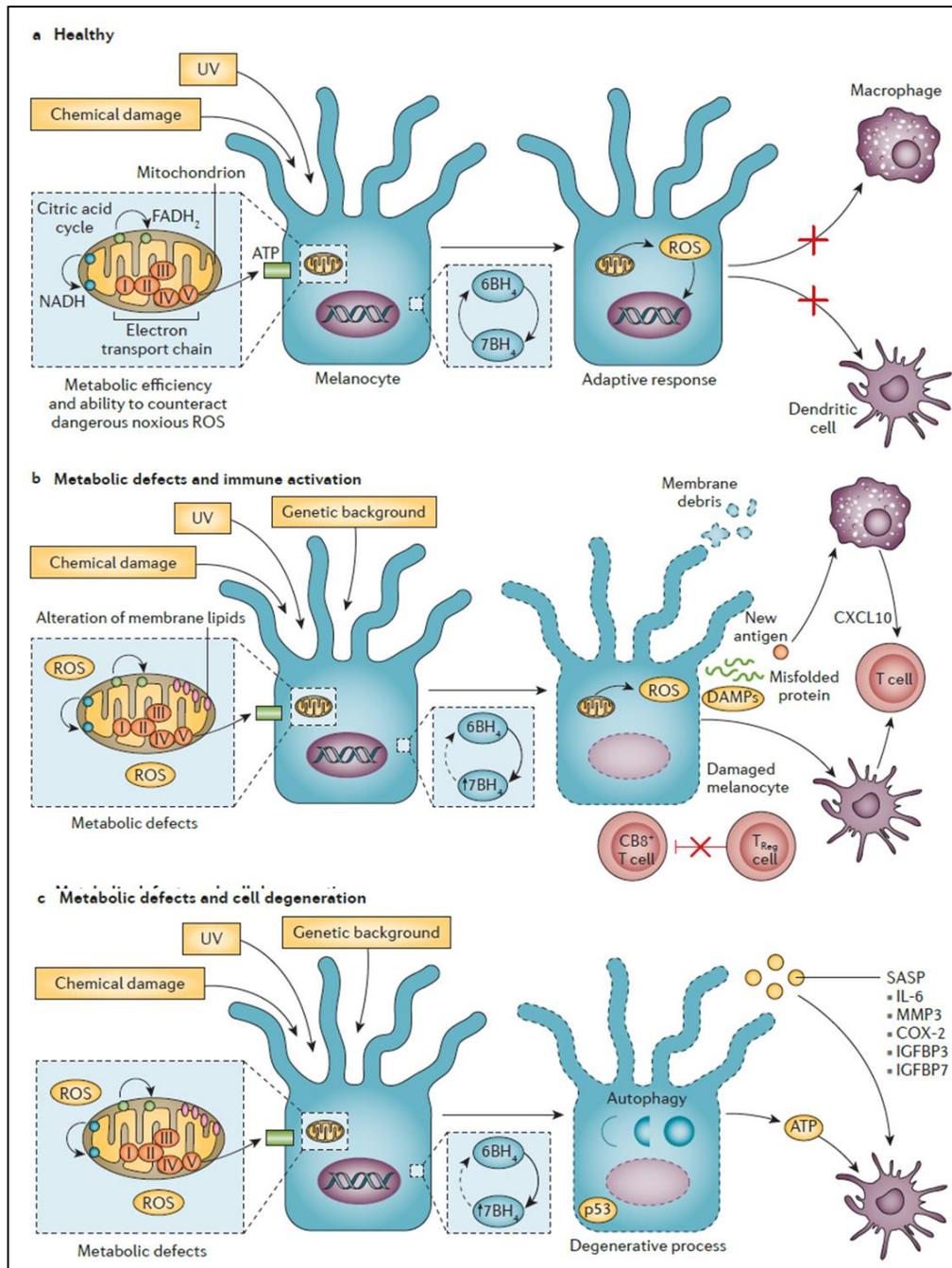


Figura 3. El melanocito y su ambiente. A) Piel sana. B) Se representa la piel con vitiligo y el proceso de activación de la respuesta inmune. C) Degeneración de melanocitos. Adaptado de: Picardo M, y cols. 2015; [15]

## **2.4 Rol de la IL-17 en la fisiopatogenia del vitiligo**

La IL-17 es una citocina proinflamatoria, miembro de la familia IL-17, cuya función más conocida es la protección contra infecciones bacterianas y fúngicas [16]. Esta pertenece a una familia de interleucinas que comprende seis: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. Los genes que codifican a las IL-17A e IL-17F se encuentran localizados en el cromosoma 6p12, y comparten 50% de homología, por lo que son similares en estructura y función, así como de regulación y transducción de señales, mientras que IL-17B, IL-17C e IL-17D solo comparten 16% -30% [16].

La IL-17 es secretada por células CD4 + T auxiliares activadas y neutrófilos, cuya función es estimular la producción de múltiples citocinas como IL-6, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y molécula de adhesión celular 1 (CAM-1) de células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos, que conduce a la producción de procesos inflamatorios [16]. Esta interleucina también es una efectora principal de las células Th17, además de que contribuye de forma importante en la fase activa de la autoinmunidad mediante su efecto sinérgico con otros mediadores inflamatorios, como la IL-1b, IL-6 y TNF-a, que inhiben la proliferación de melanocitos [17, 18]. Esto puede verse representado en la Figura 4 [16].



inflamación y finalmente conduce a la activación de la inmunidad adaptativa. La activación de la inmunidad adaptativa facilita la autoinmunidad, destrucción y progresión de la enfermedad. Las células T citotóxicas CD8 + activadas están involucradas en la disfunción, despigmentación y apoptosis de los melanocitos. Estudios han analizado la participación de la secreción de citocinas de los subconjuntos de las células T CD4 + que incluyen células Th1, Th2 y Th17 [31].

Así es como se ha demostrado el importante rol que tiene la IL-17 en la patogenia del vitiligo. Ésta suprime la melanogénesis mediante la regulación negativa de genes de las vías de la pigmentación [32]. Además, activa los macrófagos y linfocitos citotóxicos para inducir apoptosis de melanocitos [18]. En la Figura 5 se representan los efectos patogénicos de la IL-17 en la piel [16].

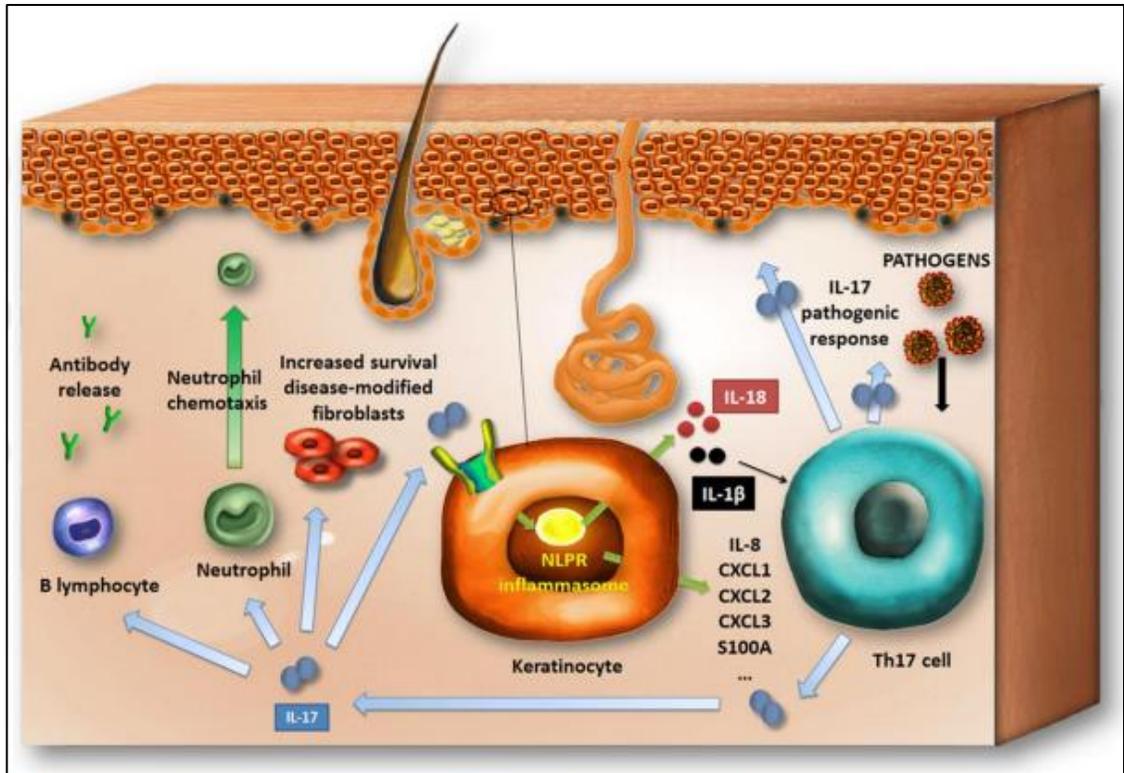


Figura 5. Mecanismos patogénicos mediados por IL17 en la piel. En la figura se presenta el proceso por el cual cada subtipo de IL17 se une a su correspondiente receptor de IL-17 ejerciendo actividades de señalización únicas. Adaptado de: Speeckaert R, y cols. (2016) [16]

En cuanto a los efectos patogénicos en la piel, la IL-17 estimula la producción de citocinas inflamatorias por parte de los queratinocitos, la actividad de los linfocitos B, la migración de neutrófilos y la supervivencia mejorada de los fibroblastos modificados por la enfermedad. Además, la producción de citocinas y quimiocinas es mediada en parte por inflammasomas, aunque se producen otros eventos no identificados no relacionados con la inflamación [16].

En un estudio que analizó el perfil de citocinas pro-inflamatorias que participan en el desarrollo del vitiligo, encontró niveles séricos significativamente mayores

en pacientes con vitiligo en comparación con controles sanos [31]. Otros han revelado que existe un aumento del nivel de IL-17A en la piel y el suero de los pacientes con vitiligo [33-35], mientras otros describen la presencia de células IL-17+ en piel lesional y perilesional en pacientes con vitiligo [17, 18, 36], así como una infiltración en dermis superior [17, 18]. En algunos de ellos se ha detectado los niveles séricos de IL-17 mediante pruebas de ELISA en pacientes con vitiligo, encontrando niveles aumentados en los pacientes con esta enfermedad [18, 37-42]. Algunos de los hallazgos se han correlacionado positivamente con la edad temprana de inicio, duración de la enfermedad, así como con el porcentaje de afección de superficie corporal total [18, 37, 43].

Además, en estudios de casos y controles donde se investigó si las células Th17 circulantes se encuentran elevadas en pacientes con vitiligo, mediante citometría de flujo, se encontró un aumento de estas células productoras de IL-17 en pacientes con vitiligo activo no segmentario (NSV ( $p = 0.001$ ) y se correlacionó positivamente con el área de superficie corporal afectada ( $r = 0.0615$ ,  $p < 0.001$ ) [38]. Otro estudio de 40 pacientes analizó los niveles séricos por ELISA, donde se demostró su correlación negativa con la edad de inicio del vitiligo ( $r = -0.397$ ,  $p = 0.011$ ) y una correlación positiva con la extensión de superficie corporal afectada [37].

Como se puede observar, todos estos estudios sugieren que la IL-17 contribuye a la despigmentación local a través de su antagonismo de factores relacionados con la función de los melanocitos, reducción de la melanogénesis e inducción de citocinas de tipo Th17 a partir de fibroblastos dérmicos y queratinocitos.

## **2.5 Polimorfismos asociados al vitiligo**

Cuando se desea realizar el abordaje molecular en una enfermedad, se pueden seleccionar genes candidato a partir de las rutas afectadas. Los estudios de asociación de variantes genéticas en pacientes y controles nos permiten encontrar aquellas que se encuentran asociadas y/o confieren riesgo o protección para su desarrollo.

Los polimorfismos son variantes génicas que ocurren frecuentemente en una población. Éstos consisten en la presencia de dos o más genotipos o alelos discretos que pueden ocurrir simultáneamente en una población. Cuando el polimorfismo se genera al nivel de regiones promotoras, pueden afectar el nivel de expresión de la proteína en cuestión; mientras que cuando esto ocurre en regiones codificantes provoca un cambio aminoacídico que podría afectar la funcionalidad de la proteína. Estas variantes se heredan, teniendo en consecuencia diferentes fenotipos. Entre las variantes génicas se encuentran el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), que son la variante de secuencia de

un solo nucleótido. Éstos son la variación más común y su estudio es una estrategia útil para investigar la relación entre genes y enfermedades [29].

En el caso de las interleucinas, se ha investigado que las modificaciones genéticas en la región promotora -197 G / A de la IL-17A alteran las secuencias de transcripción del gen y aumentan la secreción de IL-17 A [44], mientras que el polimorfismo del gen IL 17-F es responsable de la sustitución de los aminoácidos histidina a arginina, llevando a una variación en la estructura o expresión de la proteína [45]. Sin embargo, el efecto de los polimorfismos en el fenotipo de enfermedades pueden variar dependiendo de la población estudiada, debido a la composición genética de la misma, y a la contribución de la suma de ellos en forma global. Por ejemplo, se ha analizado la asociación de los polimorfismos IL-17 rs2275913 (-197G/A) y la IL-17 rs763780 (7488A/G) con la susceptibilidad a la artritis reumatoide y la colitis ulcerosa, respectivamente [46, 47].

## **2.6 Cuadro clínico**

### **2.6.1 Características clínicas**

Las lesiones cutáneas típicas del vitiligo son parches o máculas blanquecinas asintomática con bordes regulares y márgenes nítidos (Figura 6a). Rara vez, los parches tienen bordes inflamados con prurito (Figura 6b) [2, 48].

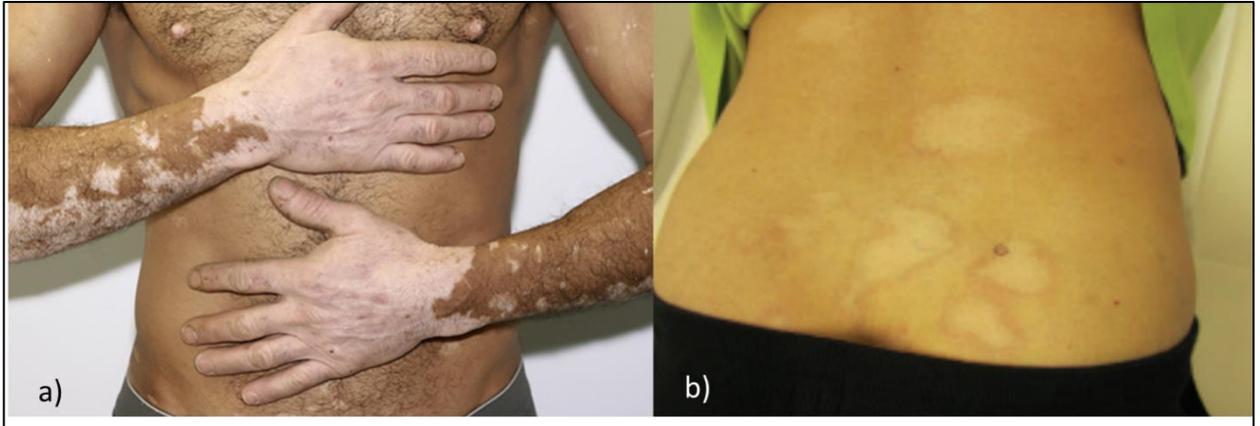


Figura 6. Cuadro clínico de vitiligo. a) Máculas acrómicas de bordes bien definidos. b) Máculas hipopigmentadas con bordes eritematosos y pruriginosos. Adaptada de: Bergqvist [2] C, y cols. 2020 ; y de: Soro LA y cols. 2013 [48].

La aparición de lesiones es progresiva y su desarrollo es impredecible. Se ha descrito que su aparición a una edad temprana de se asocia con la ocurrencia familiar y a menudo determina un pronóstico más grave. Las máculas también pueden aparecer en áreas sometidas a presión, fricción o trauma. Este tipo de estímulos son responsables de este llamado fenómeno de Koebner [49].

### 2.6.2 Clasificación

a) Según la clasificación revisada del vitiligo por la VGICC (Vitiligo Global Issues Consensus Conference) publicado en 2012, se reconocen tres formas clínicas de vitiligo: i) Vitiligo no segmentario; ii) Vitiligo segmentario; y iii) Vitiligo no clasificado/indeterminado. Cada una de estas categorías tiene subclases adicionales, que se presentan a continuación [50]. Esta clasificación de ejemplifica en la Tabla 1 [50].

<b>Tabla 1. Clasificación de vitiligo de la VGICC</b>	
<b>Tipo de vitiligo</b>	<b>Subtipos</b>
Vitiligo no segmentario	Acrofacial
	Mucoso
	Generalizado
	Universal
	Mixto
Vitiligo segmentario	Unisegmental Bisegmental Plurisegmental
Indeterminado/no clasificado	Focal
	Mucoso
Extraída de: Ezzedine y cols. (2012). [50]	

b) Vitiligo no segmentario

Este grupo engloba todas las formas no segmentarias de vitiligo, y se incluye el vitiligo generalizado, anteriormente denominado vitiligo vulgar, el cual es frecuentemente bilateral y afecta a cualquier parte del cuerpo, con mayor frecuencia en manos, cara y dedos. El vitiligo acrofacial que se limita a la cara, cabeza, manos y pies. El vitiligo universal que afecta al 80-90% de la superficie corporal. El vitiligo mucoso que es la despigmentación de las mucosas oral y

genital. El vitiligo mixto que se refiere a la presentación simultánea de vitiligo segmentario y no segmentario. También se incluyen el vitiligo generalizado y las variantes raras, que incluyen vitiligo menor, vitiligo folicular y vitiligo punctata.

c) Vitiligo segmentario

Esta subclasificación presenta máculas acrómicas unilaterales con distribución asimétrica. La forma de presentación más común es la monosegmental, la cual afecta un único lado del cuerpo y respeta la línea media. Además, es de rápida evolución y puede simular una distribución a lo largo de las líneas de Blaschko. Otra forma de presentación es la múltiple, que puede o no afectar simultáneamente ambos lados del cuerpo [4].

d) Vitiligo no clasificado/indeterminado

Este término se usa para lesiones que no evolucionan a vitiligo segmentario o no segmentario después de 1 a 2 años. Este grupo incluye el vitiligo focal, que se refiere a pequeñas máculas acrómicas.

## **2.7 Diagnóstico**

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad se requiere de una adecuada historia clínica y evaluación de antecedentes personales patológicos y familiares,

además de una completa exploración física, apoyada de la lámpara de Wood que permite ver el realce de las máculas acrómicas por la pérdida de melanocitos, dando una fluorescencia azul-blanquecina brillante. Se debe evaluar la extensión y severidad de la enfermedad, así como la presencia de factores pronósticos individuales. Otros datos a tomar en cuenta son el fototipo, duración de la enfermedad, extensión, actividad, tasa de progresión o diseminación de las lesiones, presencia del fenómeno de Koebner, tratamientos previos, episodios previos de repigmentación y calidad de vida. Es imprescindible descartar otras enfermedades despigmentantes y diagnósticos diferenciales [2].

Rara vez se requiere de estudio histopatológico para poder hacer un diagnóstico certero y se utiliza para excluir otras entidades. El análisis histológico revela pérdida de la pigmentación epidérmica con la tinción de Fontana-Masson, con ausencia de melanocitos en la capa basal, además de infiltrado de células T CD8+ citotóxicas en epidermis [51].

Debido a la discrepancia subjetiva que existe entre los pacientes al indagarse sobre si hay mejoría, se propuso una escala cuantitativa, llamada Vitiligo Area Scoring Index (VASI) que deriva de la escala Psoriasis Area Severity Index (PASI) utilizada para la psoriasis. En esta, el cuerpo es dividido en 5 zonas individuales: manos, extremidades superiores (excluyendo manos), tronco, extremidades inferiores (excluyendo pies) y pies. No se incluye cara y cuello. Para cada región, se valora el área afectada y la extensión de la despigmentación [52].

Por otra parte, recientemente se ha desarrollado el puntaje VETI (Vitiligo Extent Tensity Index) propone medir la extensión del vitiligo por una puntuación numérica y combina el análisis de extensión y severidad del vitiligo. El porcentaje de extensión se evalúa usando la regla de los nueves, que puede observarse en la Figura 7. Esta nueva herramienta puede producir un número constante y reproducible y ayudar a la investigación clínica en pacientes con vitiligo [53].

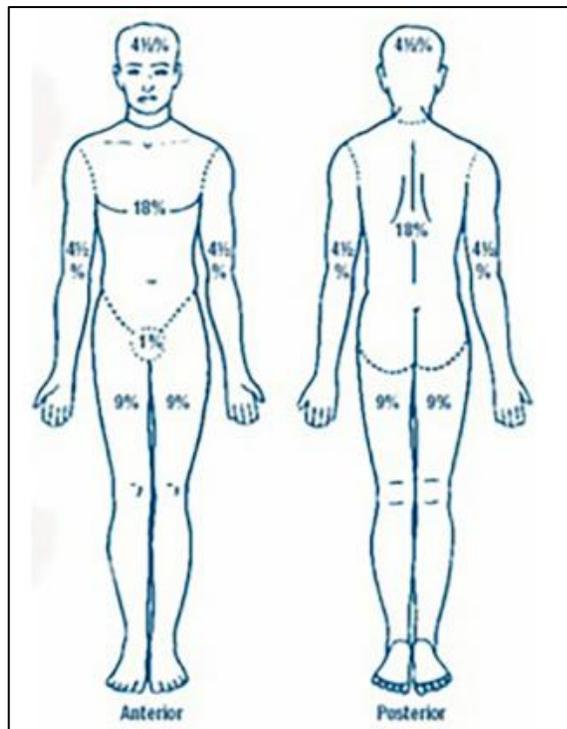


Figura 7. Regla de los nueves para evaluar extensión del vitiligo. Adaptada de: Feily A. y col.(2014). [53]

Se divide en 5 sitios afectados, que incluyen la cabeza, extremidades superiores, tronco, extremidades inferiores y genitales, que se puntuarán de acuerdo a cinco etapas de la enfermedad:

- a. Etapa 0: Piel normal
- b. Etapa 1: Hipopigmentación
- c. Etapa 2: Despigmentación completa con cabello negro y con pigmentación perifolicular
- d. Etapa 3: Despigmentación completa con cabello negro y sin pigmentación perifolicular
- e. Etapa 4: Despigmentación completa con cabello blanco y negro con / sin pigmentación perifolicular
- f. Etapa 5: Despigmentación completa más cabello blanco significativo

Los porcentajes obtenidos de cada región involucrada posteriormente son multiplicados por el grado de tensión y coeficientes ya establecidos para cada una. Finalmente estos se suman y se puede obtener un valor máximo un VETI de 55.5.

Por otra parte, es recomendada una evaluación general de las características psicológicas y la calidad de vida, que puede evaluarse con un instrumento validado de calidad de vida específico para el vitiligo [54]. A todos los pacientes con vitiligo se les debe ofrecer apoyo psicológico y asesoría.

## 2.8 Tratamiento

El tratamiento de vitiligo es un gran reto para los dermatólogos, ya que ésta enfermedad afecta seriamente la calidad de vida de los pacientes; por ello deben considerarse las preferencias personales de los pacientes al decidir la modalidad terapéutica y resolverse todas las dudas e inquietudes acerca de la etiología, tratamiento, curso y pronóstico [4].

Actualmente hay una falta de consenso sobre la definición y métodos de asesoramiento sobre esta enfermedad, lo que dificulta la comparación entre diversos estudios sobre el tratamiento [52]. Cuando la enfermedad está activa, pueden utilizarse esteroides sistémicos que ayudan a detener la progresión de la enfermedad. Aun se necesita de más estudios para avalar el uso de otros medicamentos sistémicos para mantenimiento de la enfermedad, como las dosis bajas del metotrexate o corticoesteroides sistémicos [55].

La terapia con esteroides tópicos es de utilidad en enfermedad localizada. Puede utilizarse cuando la fototerapia no tuvo éxito o en combinación con esta para acelerar los resultados. Los esteroides tópicos de clase 3 (potentes) alcanzan un 75% de repigmentación en más del 50% de los pacientes. Los inhibidores de la calcineurina, como tacrolimus o pimecrolimus, pueden promover la repigmentación sin inmunosuprimir [55]. Se ha encontrado que el uso de

tacrolimus tópico dos veces por semana en lesiones de cara pueden prevenir recurrencias y se recomienda como tratamiento de mantenimiento [56].

La terapia de luz ultravioleta de elección es la UVB-nb (narrow band ultraviolet B) de 311 nanómetros (nm), con un régimen de dos veces por semana durante 1 año, con repigmentación del 75% de las regiones afectadas. Se requieren de al menos 3 meses para clasificar a un paciente como no respondedor. Para una máxima repigmentación se requieren de 9 a 12 meses de tratamiento [57].

### **2.8.1 Nuevos tratamientos**

Debido a que el mecanismo de patogenia más estudiado es el de CXCR3, CXCL9, CXCL10 e IFN $\gamma$ , se están estudiando terapias específicas dirigidas a su inhibición, como el uso de los inhibidores JAK, como lo es el tofacitinib y ruxolitinib, los cuales pueden inducir la repigmentación [58, 59]. La inhibición de JAK puede detener la inflamación y señales inmunes involucradas en la despigmentación, por lo que esto es una terapia prometedora en estudio.

Además, los tratamientos anti-TNF, utilizados en otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias han sido estudiados para el vitiligo, ya que el bloqueo de esta citocina detiene la progresión de la enfermedad, sin embargo, no induce la repigmentación [60].

**Tabla 2. Tratamientos potenciales del vitiligo**

<b>Blanco terapéutico</b>	<b>Objetivo del tratamiento</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Mecanismos</b>
JAK	Inmunosupresión	Inhibidores del JAK <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruxolitinib (JAK 1/2)</li> <li>• Tofacitinib (JAK 1/3)</li> </ul>	Disrupción del eje IFN-γ-CXCL9/10 necesario para reclutamiento y función de células
IL-15	Inmunosupresión y eliminación de células T reguladoras	Anticuerpos contra IL y CD122	Inhibición de producción de IFN-γ por células T reguladoras
Células T reguladoras	Supresión de efectores autorreactivos	Baja dosis de IL-2	Suprime proliferación y activación de células CD8+
HPS70 (Proteínas de shock térmico de 70 KDa)	Bloquea activación de sistema inmune innato	Inyecciones de DNA mutado	Contrarresta activación del sistema inmune
Vía WNT	Estimulación de repigmentación	Agonista de inhibidores GS3b	Estimulación de proliferación de células mesenquimales, diferenciación y migración
CXCR3B	Previene apoptosis inicial de melanocitos	Anticuerpos contra CXCR3B	Inhibición de apoptosis de melanocitos y activación de células T

Extraída de: Bergqvist, C. y cols (2021). [61]

## CAPÍTULO III

### 3. JUSTIFICACIÓN

Es de gran importancia el estudio de la patogenia del vitiligo en nuestra población, debido al profundo impacto psicológico y en la calidad de vida que ésta causa en los pacientes, sobre todo cuando no se obtienen buenos resultados con los tratamientos estándar.

Las causas del vitiligo son complejas y aún no son bien comprendidas. Es por eso que se han realizado múltiples estudios con el fin de dilucidar los mecanismos involucrados en su patogénesis. Se ha sugerido que diferentes alteraciones en el sistema inmune están involucradas en la patogénesis de la enfermedad, conduciendo a la destrucción de los melanocitos, entre otras teorías. Además, como se ha encontrado una fuerte asociación entre el vitiligo y otras enfermedades autoinmunes, tales como la alopecia areata, psoriasis, patología tiroidea, etcétera, se ha propuesto que este es uno de los mecanismos involucrados en su desarrollo. Al respecto, múltiples genes han sido estudiados por su importante papel en este desarrollo de enfermedades de naturaleza autoinmune, y potencialmente en el desarrollo del vitiligo.

A la fecha existen estudios que sugieren que el cambio de la respuesta inmune hacia Th1 o Th17, y el desvío de la respuesta hacia Tregs y Th2 juegan un papel en la patogenia del vitiligo. Además, se ha descrito la participación de la IL-17 en

el desarrollo del vitiligo, debido a que provoca un ambiente pro-inflamatorio por la producción de múltiples citocinas, previamente mencionadas. Debido a esto es importante analizar el efecto de SNPs en IL-17 y el desarrollo de vitiligo y las características clínicas de los sujetos afectados por esta enfermedad.

## **CAPÍTULO IV**

### **4. HIPÓTESIS**

#### **4.1 Hipótesis**

Existe una correlación directa de los polimorfismos de nucleótido único de IL-17 y el desarrollo de vitiligo.

#### **4.2 Hipótesis nula**

No existe una correlación directa de los polimorfismos de nucleótido único de IL-17 y el desarrollo vitiligo.

## **CAPÍTULO V**

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

El presente estudio pretende investigar los loci de SNP de IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A), IL-17 rs763780 (7488A/G) en una población del noreste de México en pacientes que acudan al Hospital Universitario “José Eleuterio González” en Monterrey, Nuevo León, México para identificar si existe una asociación con su presencia o ausencia y el desarrollo de la enfermedad en un grupo de pacientes con vitiligo y en un grupo de pacientes control mediante el uso de PCR-RFLP, con el fin de poder proporcionar información relevante con respecto a la patogenia de la enfermedad a nivel genético.

#### **5.2 Objetivos específicos**

1. Obtener variables clínicas de los pacientes (peso y talla, índice de masa corporal/IMC, porcentaje de grasa corporal, fototipo, clasificación) y antecedentes heredofamiliares y personales patológicos
2. Generar un banco de muestras de ADN de pacientes con vitiligo y controles sanos.

3. Analizar los polimorfismos IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A), IL-17 rs763780 (7488A/G) en pacientes con vitiligo y controles, mediante PCR-RFLP.
4. Determinar si existe alguna asociación entre los polimorfismos estudiados de IL- 17 y el desarrollo de vitiligo su severidad y extensión.

## CAPÍTULO VI

### 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1 Tamaño de la muestra y selección de pacientes

Fueron incluidos sujetos de ambos sexos, mayores de edad, que presentaran vitiligo. Para el cálculo del tamaño de la muestra se consideró el tamaño de la población del Estado de Nuevo León es de 5.12 millones de personas, una prevalencia del 8% de esta enfermedad (P), un valor de Z de 1.96, y un poder de 97.5%, lo que permitió determinar que la población necesaria para realizar este estudio era de 113.09 sujetos, utilizando la fórmula de la Figura 8. A cada sujeto incluido en este estudio se le determinó su peso, índice de masa corporal y porcentaje de grasa corporal (por método de bioimpedancia) con la báscula Tanita Fit Scan Body Composition Monitor 585F, y se determinó su talla con el estadímetro marca Línea Médica Básculas de Nuevo León. Se recabaron antecedentes patológicos, antecedentes no patológicos y heredofamiliares; además de fototipo según la escala de Fitzpatrick, así como las terapias utilizadas previamente para los casos.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Figura 8. Fórmula utilizada para el cálculo del tamaño de la muestra.

### **6.1.1 Criterios de inclusión para casos**

Sujetos mexicanos nacidos en México o en el extranjero, cuyos padres fueran mexicanos, de ambos sexos, con diagnóstico de vitiligo (todas sus variedades clínicas) realizado por Dermatólogos en el servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, mayores de edad y dispuestos a otorgar el consentimiento informado.

### **6.1.2 Criterios de inclusión para controles**

Pacientes sin vitiligo y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes, mayores de edad y dispuestos a otorgar el consentimiento informado

### **6.1.3 Criterios de exclusión**

Para los casos: sujetos extranjeros, menores de edad y negativa a otorgar el consentimiento informado. Para los controles: pacientes con vitiligo y/o antecedentes de enfermedades autoinmunes, menores de edad y no dispuestos a otorgar el consentimiento informado

## **6.2 Diseño del protocolo**

Estudio observacional, transversal, descriptivo, comparativo de casos y controles. Este estudio y sus consentimiento informados fueron aprobados por

el “Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitarios” con título: “Análisis de polimorfismos de la e-caderina e interleucina 17 y su asociación al riesgo de desarrollo de vitiligo en una población del noreste de México” y registrado con clave DE20-0002. Se incluyeron 116 pacientes mayores de edad tratados en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Monterrey, México, que presentaran cualquier tipo de vitiligo. Además se incluyeron 116 controles sanos. A cada paciente que decidió participar, en la primera consulta, se le explicaron los alcances del protocolo de investigación, sus beneficios y riesgos. Se entregó el consentimiento de manera escrita para su lectura y se respondieron las dudas o preguntas que surgieron. Se solicitó la firma del consentimiento en 3 copias en presencia de 2 testigos los cuales también firmaron el documento; uno se anexó al expediente clínico, otro fue entregado al paciente y uno fue resguardado en la carpeta del protocolo. La decisión de participar en el estudio fue sin coerción, respetando la dignidad y libertad de cada individuo.

También se les solicitó a los pacientes firmar un segundo consentimiento informado donde se explicó y se autorizó la donación, almacenamiento y utilización de las muestras de sangre periférica (Formato de Consentimiento Informado Donación, Almacenamiento y Uso de Muestras) obtenidas para investigaciones futuras exclusivamente dentro de esta misma línea de vitiligo. Para la obtención del consentimiento un co-investigador explicó sus beneficios y

riesgos, se entregó el consentimiento de manera escrita para su lectura y se respondieron dudas o preguntas.

### **6.3 Evaluación clínica**

Posterior a la obtención de los consentimientos informados, fueron evaluados por médicos dermatólogos para confirmar el diagnóstico de vitiligo. La información recabada a partir de la entrevista incluyó edad, género, antecedentes médicos patológicos y no patológicos, antecedentes heredofamiliares, edad de inicio del vitiligo y tratamientos utilizados. Para mantener la confidencialidad de los pacientes, la información fue codificada utilizando números para identificación los datos y las muestras biológicas obtenidas en este estudio, con la intención de que no pudieran ser reconocidos por personas ajenas a la investigación.

### **6.4 Descripción de protocolo en laboratorio**

#### **6.4.1 Material biológico**

Para realizar el análisis de polimorfismos, se solicitó a cada sujeto participante una muestra de sangre de 5 ml en un tubo anticoagulado con EDTA. Los casos fueron reclutados en la Consulta de Dermatología del Hospital Universitario “José E. González”, Monterrey México desde Septiembre 2020 a Mayo 2021. Los controles fueron reclutados de la misma manera, así como de una donación de muestras de sangre obtenidas de la Universidad de Coahuila.

#### **6.4.2 Procesamiento de las muestras**

#### **6.4.3 Extracción de ADN con muestra de sangre venosa periférica con técnica de lisis celular por TSNT**

Toma de muestras sanguíneas periféricas bajo condiciones estériles en tubos con EDTA. Se centrifugaron los tubos de sangre a 4000 rpm por 5 minutos. De la interface de células blancas se recuperaron 500 microlitros y se colocaron en microtubos de 2 ml. La lisis se realizó agregando 200 microlitros de buffer TSNT (2% Tritón, 1% SDS (dodecil sulfato de sodio), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (Tris (hydroxymethyl) aminomethane (THAM) hydrochloride) (pH 8.0) y mezclando durante 30 segundos con vórtex. Se agregaron 500 microlitros de fenol saturado mezclando durante 30 segundos. Se adicionó 100 microlitros de SEVAG (cloroformo alcohol isoamílico 24:1) y mezcló por 3 minutos con vórtex. Se agregó 200 microlitros de TE1X pH 8 y se mezcló con vórtex 30 segundos. Se centrifugó el tubo por 5 minutos a 12,000 rpm. La fase acuosa superior se transfirió a un microtubo de 1.5 microlitros donde el ADN genómico se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se mezcló por inversión hasta formar hebra de ADN compacta. Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm y decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 microlitros de etanol al 70% frío. Se centrifugó 8 minutos a 10,000 rpm. Se decantó y agregó a la pastilla de ADN 500 microlitros de etanol 70%. Se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm. Se decantó el contenido y se dejó secar la pastilla de ADN 20 minutos. Se agregaron

100 microlitros de TE1X y se resuspendió, posteriormente se dejó agitación toda la noche. Se realizó una cuantificación del ADN genómica con nanodrop ND-100, para obtener concentración y pureza del ADN. Se realizó la preparación de diluciones para banco de muestras de 50 ng/uL. El stock de ADN fue guardado a 4°C.

#### **6.4.4 Verificación de la calidad del ADN**

La concentración y la calidad de los ADNs fueron analizadas en el equipo Nanodrop ND1000. Se colocaron 2 µl en el compartimiento del equipo, y se realizó la lectura. Se registró la lectura de absorbancia 260/280 para el parámetro de calidad, y la concentración en ng/µl. A partir de la concentración, se hicieron los cálculos para preparar las soluciones de trabajo a una concentración final de 50 ng/µl, utilizando la fórmula  $C1V1=C2V2$  en el excel.

Posteriormente, la integridad de los ADNs se verificó mediante electroforesis. Se mezclaron 5 µl de la solución de ADN a 50 ng/µl, y 1 µl de Gel Red, y se colocaron en un gel de agarosa al 1%. Se corrió a 100 V hasta alcanzar  $\frac{3}{4}$  de la longitud del gel. La imagen se guardó en el fotodocumentador M-26 UVP.

#### **6.4.5 Identificación de mutaciones y polimorfismos**

El estudio consiste en la detección de los polimorfismos de la IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A), IL-17 rs763780 (7488A/G) mediante la técnica de PCR-RFLP. Ésta es una técnica confiable, rápida y económica, la cual permite el estudio de muestras biológicas de una manera sencilla para que los resultados puedan estar disponibles en pocos días. Aunque los resultados de PCR-RFLP son fáciles de interpretar, este enfoque puede no ser el más adecuado para la genotipificación porque implica un extenso manejo manual.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, los programas de amplificación se realizaron en el termociclador MJ mini (BioRad). Los iniciadores empleados y el tamaño de los fragmentos esperados según el corte de las enzimas de restricción para cada polimorfismo se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Estrategia PCR-RFLP para determinación de polimorfismos en IL-17A e IL-17F**

Polimorfismo	Primers	Secuencia	Enzimas de restricción	Normal	Mutante	Referencia
<b>IL17A rs4711998 (A-832G)</b>	IL17A-832 F	5'- TTACTACTCCAGCCATTGA GTTG-3'	TaqI	206+ 152 pb G/G	359 pb A/A	Chen y cols, 2014 [62]
	IL17A-832 R	5'- TGAAAATGGGGATAGAG ACTGG-3			359 +206+ 152 pb A/G	
<b>IL17A rs2275913 (-197G/A)</b>	IL17A-197 F	5'- CAGAAGACCTACATGTT ACT -3'	XmnI	344 pb G/G	213+131 pb A/A	Du y cols, 2014 [63]
	IL17A-197 R	5'- GTAGCGCTATCGTCTCT CT -3'			344+213+13 1 pb G/A	
<b>IL17F rs763780 (7488A/G)</b>	IL17F 7488 F	5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3'	NlaIII	288+12 4 pb A/A	412 pb G/G	Wróbel y cols, 2015 [64]
	IL17F 7488 R	5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3'			412+288+12 4 pb G/A	

**a) Genotipificación del polimorfismo IL-17 rs4711998 (A-832G)**

La genotipificación del polimorfismo señalado para IL-17 rs4711998 (A-832G) fue realizada utilizando PCR-RFLP de acuerdo al estudio de Chen y colaboradores [62]. Se pipeteó 20 µl de coctel en cada tubo. Posteriormente 5 µl de agua en el control negativo, y 5 µl de ADN 50 ng/µl de pacientes y/o controles al tubo correspondiente. Además se agregaron 2.5 microlitros de buffer, 2.5 microlitros del primer IL17A-832 F para la secuencia 5'-TTACTACTCCAGCCATTGAGTTG-3', 2.5 microlitros del primer IL17A-832 R para la secuencia 5'-TGAAAATGGGGATAGAGACTGG-3, 0.5 microlitros de dNTPs (desoxiribonucleotido trifosfato), 1.5 microlitros de MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio), 10 microlitros de agua Milli Q y 0.5 U de enzima Taq1α. Las condiciones de PCR

utilizadas para la amplificación son las siguientes: desnaturalización en 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C, 30 segundos a 72 °C y un alargamiento final a 72 °C durante 5 min.

Los productos obtenidos fueron digeridos durante toda la noche a 65°C con la enzima de restricción Taq1 $\alpha$ . En la IL-17 rs4711998 (A-832G), al realizar la digestión de sus productos con la enzima Taq1 $\alpha$ , debe obtenerse 2 fragmentos de 206+152 pares de bases (pb) en la presencia del genotipo GG. Para el genotipo GA se obtienen 3 bandas, una de 359+206+152 pb. En el genotipo AA el tamaño de fragmentos esperados es de 359 pb. Los productos obtenidos a partir de las digestiones se analizaron mediante cámaras de electroforesis horizontal MiniSingle Cell Electrophoresis chamber FOTODYNE Incorporated en geles de agarosa al 3%, teñidos con gel red y posteriormente se visualizaron en el fotodocumentador de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

#### **b) Genotipificación del polimorfismo IL-17 rs2275913 (-197G/A)**

La genotipificación del polimorfismo señalado para el polimorfismo IL-17 rs2275913 (-197G/A) fue realizada de acuerdo al estudio de Du y colaboradores [63]. Se pipeteó 20  $\mu$ l de coctel en cada tubo. Posteriormente 5  $\mu$ l de agua en el control negativo, y 5  $\mu$ l de ADN 50 ng/ $\mu$ l de pacientes y/o controles al tubo correspondiente. Además se agregaron 2.5 microlitros de buffer, 2.5 microlitros del primer IL17A-197 F para la secuencia 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-

3', 2.5 microlitros del primer IL17A-197 R para la secuencia 5'-GTAGCGCTATCGTCTCTCT -3', 0.5 microlitros de dNTPs, 1.5 microlitros de MgCl<sub>2</sub>, 10 microlitros de agua Milli Q y 0.5 U de XmnI.

El ADN se amplificó durante 30 ciclos de 5 minutos a 95 ° C, 30 segundos de desnaturalización a 95 ° C, 30 segundos a 58 ° C y una extensión de 40 segundos a 72 ° C.

Los productos obtenidos fueron digeridos durante la noche a 65°C. Para la IL17A rs2275913 (-197G/A), la digestión se realiza con la enzima XmnI el genotipo AA genera 2 fragmentos de 213 pb y 131 pb, mientras que el genotipo GA tiene 3 bandas de 344+213+131 pb. El genotipo GG genera una banda de 344 pb. Los productos obtenidos a partir de las digestiones se analizaron mediante cámaras de electroforesis horizontal MiniSingle Cell Electrophoresis chamber FOTODYNE Incorporated en geles de agarosa al 3%, teñidos con gel red y posteriormente se visualizaron en el fotodocumentador de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

### **c) Genotipificación del polimorfismo IL-17 rs763780 (7488A/G)**

La genotipificación del polimorfismo señalado para el polimorfismo IL-17 rs2275913 (-197G/A) fue realizada de acuerdo al estudio de Wróbel y colaboradores [64]. Se pipeteó 20 µl de coctel en cada tubo. Posteriormente 5 ul de agua en el control negativo y 5 µl de ADN 50 ng/µl de pacientes y/o controles al tubo correspondiente. Además se agregaron 2.5 microlitros de buffer, 2.5

microlitros del primer IL17F 7488 F para la secuencia 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3', 2.5 microlitros del primer IL17F 7488 R para la secuencia 5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3', 0.5 microlitros de dNTPs, 1.5 microlitros de MgCl<sub>2</sub>, 10 microlitros de agua Milli Q y 0.5 U de NlaIII.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 94 ° C durante 3 minutos; 35 ciclos a 94 ° C durante 30 segundos, 60 ° C durante 30 segundos, 72 ° C durante 30 segundos y una etapa final de alargamiento a 72 ° C durante 7 minutos.

Los productos obtenidos fueron digeridos a 37°C durante 15 minutos con la enzima de restricción NlaIII, generando 2 fragmentos de 288+124 pb en presencia del genotipo AA. Para el genotipo AG se generan 3 fragmentos de 412+288+124 pb, y para GG de 412 pb.

Los productos obtenidos a partir de las digestiones se analizaron mediante cámaras de electroforesis horizontal MiniSingle Cell Electrophoresis chamber FOTODYNE Incorporated en geles de agarosa al 3%, teñidos con gel red y posteriormente se visualizaron en el fotodocumentador de geles (UVP modelo M-26; Upland, CA).

#### **6.4.6 Equipos empleados y procedimiento**

El ADN extraído fue cuantificado en el espectrofotómetro ND-1000 NanoDrop. La calidad de éste y el tamaño de los productos de PCR y de digestión enzimática se analizó en cámaras de electroforesis horizontal MiniSingle Cell Electrophoresis chamber FOTODYNE Incorporated, empleando fuente de poder Power/Pack 1000 de Bio-Rad. El ADN se procesó para reacciones de PCR con un termociclador modelo PT-100 de MJ Research, micropipetas de 0.1-2 uL, 0.5-10 uL, 20-200 uL, 200-1000 uL y multicanal de 0.5-10 uL de la marca Eppendorf Research y microcentrífuga Eppendorf modelo 5417C. Posteriormente los geles se documentaron con un fotodocumentador modelo M-26 UVP. Los iniciadores se sintetizaron en IDT, las enzimas de restricción se adquirieron en New England Biolabs, La Taq green DNA polimerasa se adquirió de GrenScript.

#### **6.4.7 Análisis estadístico**

Se utilizó el programa SPSS (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales) 21.0 (IBM, USA) para el análisis estadístico. Se utilizó estadística descriptiva para los datos demográficos, así como para variables definitorias. Para contrastar la normalidad, se realizarán las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. De acuerdo con el tipo de distribución presentada por los grupos (normal o no

normal), se realizaron comparaciones de 2 grupos utilizando t de student y U de Mann Whitney, respectivamente.

Las comparaciones de 3 grupos fueron realizadas utilizando las pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) para las variables con distribución normal y la prueba de H Kruskal-Wallis para las variables con distribución no normal. Adicionalmente, se aplicaron pruebas Post-Hoc para la comparación entre grupos (Tukey y Bonferroni para varianzas iguales; Tamhane y Dunnett T3 para varianzas diferentes). Se determinó la asociación entre variables, utilizando prueba de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) y prueba exacta de Fisher. Se calculó la razón de momios (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95% para identificar los factores de riesgo asociados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado como significativo.

## CAPÍTULO VII

### 7.- RESULTADOS

#### 7.1. Análisis clínico y demográfico

Las características clínicas y detalles demográficos de cada uno de los pacientes fueron obtenidos mediante entrevista personal y evaluación clínica. En base a los datos obtenidos mediante la historia clínica y la exploración física completa, fueron incluidos en el análisis 116 pacientes con vitiligo y 116 controles. Se obtuvo sangre de ambos grupos de pacientes, posteriormente se extrajo el ADN y se empleó la técnica de PCR-RFLP para determinar los polimorfismos de la IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A), IL-17 rs763780 (7488A/G).

El grupo de pacientes con vitiligo estuvo constituido por 49 hombres (42.24%) y 67 mujeres (57.75%). El grupo de controles sanos incluyó 116 pacientes, compuesto por 47 hombres (40.51%) y 69 mujeres (59.48%) que cumplieron todos los criterios de inclusión. Estos resultados se representan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Características demográficas y clínicas de los participantes.**

<b>Detalles demográficos</b>	<b>Casos con vitiligo (n=116)</b>	<b>Controles sanos (n=116)</b>
<b>Mujeres</b>	67 (57.75%)	69 (59.48%)
<b>Hombres</b>	49 (42.24%)	47 (40.51%)
<b>Edad media (años)</b>	40.79 años (mediana 40 años)	32.44 años (mediana 24 años)
<b>Fototipo</b>	I - 0%	
	II - 2 (1.72%)	
	III - 34 (29.31%)	
	IV - 73 (62.93%)	
	V - 2 (1.72%)	
<b>Tipos de vitiligo</b>	Generalizado: 110 (94.82%)	
	Acrofacial: 6 (5.17%)	
<b>Antecedentes personales patológicos</b>	Diabetes: 6 (5.17%)	
	Hipertensión arterial sistémica: 5 (4.31%)	

Como podemos observar en la tabla 5, en el caso de pacientes con vitiligo su edad media fue de 40.79 años, con una mediana de 40 años, y para los controles una media de 32.44 años con una mediana de 24 años. La media de los años de evolución fue de 10 años, con una mediana de 8.

De estos pacientes, 2 (1.72%) eran de fototipo II, 34 (29.31%) pacientes de fototipo III, 73 (62.93%) pacientes de fototipo IV y 2 (1.72%) pacientes de fototipo V. Además, 8 (6.89%) pacientes refirieron consumo de tabaco activo y 9 (7.75%) pacientes de alcohol.

De todos los pacientes, las frecuencias obtenidas para el subtipo generalizado fue de 110 (94.82%) y 6 para el vitiligo acrofacial (5.17%). Por otra parte, 24 pacientes (20.68%) relacionaron la aparición del vitiligo con un evento estresante como posible desencadenante.

En cuanto a antecedentes patológicos personales, como diabetes e hipertensión arterial sistémica, se encontraron presentes en 6 (5.17%) y 5 (4.31%) casos, respectivamente. Con respecto a antecedentes heredofamiliares, se obtuvieron 33 (28.44%) casos con historia familiar vitiligo y 18 casos (15.51%) tenían enfermedades autoinmunes, dentro de los cuales 13 (72.22%) tenían hipotiroidismo y 2 (11.11%) artritis reumatoide.

## **7.2 Análisis genético**

Los genotipificación de estos polimorfismos se obtuvo en base a estudios previos [29]. Las frecuencias para cada genotipo y los subtipos de vitiligo se representan en la Tabla 5. La distribución de genotipos no mostró diferencias significativas.

**Tabla 5. Frecuencia de genotipos y subtipos de vitiligo**

		IL-7488		IL-832			IL-197			
		AA	GA	AA	AG	GG	AA	GG	GA	Total
Tipo de vitiligo	<b>Generalizado</b>	40 (36.36%)	70 (63.63%)	11 (10%)	45 (40.90%)	54 (49.09%)	2 (1.81%)	70 (63.63%)	38 (34.54%)	110
	<b>Acrofacial</b>	2 (33.33%)	4 (66.66%)	4 (16.66%)	1 (16.66%)	1 (16.66%)	0 (0%)	3 (50%)	3 (50%)	6
	<b>Total</b>	42	74	15	46	55	2	73	41	116

Se realizó una comparación de genotipos contra las variables continuas analizadas, que incluyeron el peso (kg), talla (m), índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal y edad (Tabla 6). Al comparar las variables continuas entre casos y controles, no se observó diferencia significativa. Sin embargo, al considerar el genotipo solo de los casos, se observó que realmente no existe diferencia entre cada genotipo. Por lo tanto, se concluyó que estos genotipos no están relacionados con el peso, talla, IMC y porcentaje de grasa corporal.

**Tabla 6. Comparación de genotipos contra variables continuas**

	IL17-7488			IL17-832				IL17-197			
<b>Variable continuas</b>	<b>AA</b>	<b>GA</b>	<b>p</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>p</b>	<b>AA</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>p</b>
<b>Peso (Kg)</b>	76.12 ± 13.74	73.85 ± 17.79	0.245	81.65 ± 17.57	73.72 ± 14.60	73.56 ± 17.33	0.245	73.00 ± 5.37	73.13 ± 16.24	77.49 ± 16.91	0.531
<b>Talla (m)</b>	1.65 ± 0.094	1.64 ± 0.089	0.399	1.65 ± 0.095	1.65 ± 0.080	1.64 ± 0.099	0.867	1.68 ± 0.134	1.64 ± 0.085	1.66 ± 0.100	0.513
<b>IMC</b>	27.84 ± 4.48	27.34 ± 5.58	0.318	30.08 ± 6.16	27.11 ± 4.27	27.17 ± 5.51	0.240	26.12 ± 2.27	27.19 ± 4.89	28.18 ± 5.81	0.871
<b>% Grasa</b>	32.45 ± 8.92	31.35 ± 7.96	0.493	34.09 ± 9.05	32.02 ± 8.28	30.88 ± 8.12	0.400	29.55 ± 14.07	31.58 ± 7.87	32.15 ± 9.01	0.877

El análisis genético de IL-17 rs763780 (7488A/G) demostró su riesgo significativo para el desarrollo del vitiligo. De acuerdo a valor de chi cuadrada y valor de P, se sugiere que hay un genotipo de la IL- 7488 asociado como factor de riesgo para

desarrollo de vitiligo. En este modelo, el estudio de las frecuencias de los genotipos de GG, GA y AA fueron 0%, 63.79% y 36.20%, respectivamente en el grupo de pacientes y 1.72%, 43.96% y 54.31%, respectivamente en el grupo control, como se representa en la Tabla 7.

Para confirmarlo, se realizó un modelo genético de comparación de AA vs GG/GA. En este modelo, el estudio de las frecuencias de los genotipos de GG/GA y AA fueron 63.79% y 36.20%, respectivamente en el grupo de pacientes y 45.68% y 54.31%, respectivamente en el grupo control.

El análisis genético del polimorfismo IL-17 rs763780 (7488A/G) encontró que la mezcla de GG/GA tiene una mayor asociación, sugiriendo que predispone a un mayor riesgo de desarrollar vitiligo a nivel genotípico y alélico (OR = 2.0943, 95% CI 1.2375-3.5445,  $p= 0.0056$ ).

**Tabla 7. Casos y Controles tablas de contingencia. Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17 rs763780 (7488A/G)**

		Vitiligo	Control	Chi cuadrada	OR	Intervalo de confianza 95%	Valor <i>p</i>
<b>IL 7488</b>	<b>AA</b>	42 (36.20%)	63 (54.31%)	10.432			0.005
	<b>GA</b>	74 (63.79%)	51 (43.96%)				
	<b>GG</b>	0 (0%)	2 (1.72%)				
<b>IL 7488</b> Modelo AA vs GG/GA	<b>AA</b>	42 (36.20%)	63 (54.31%)	7.672	0.4775	0.2821- 0.8081	0.0056
	<b>GG/GA</b>	74 (63.79%)	53 (45.68%)		2.0943	1.2375- 3.5445	

Para IL-17 rs2275913 (-197G/A) las frecuencias de genotipos de GG, GA y AA fueron 62.93%, 35.34% y 1.72%, respectivamente en el grupo de pacientes y 62.06%, 34.48% y 3.44%, respectivamente en el grupo control, como se

representa en la Tabla 8. El análisis genético no encontró asociación entre este genotipo y el vitiligo, al encontrarse diferencias no significativas en chi cuadrada (0.686) y valor de p ( $p= 0.71$ ).

**Tabla 8. Casos y Controles tablas de contingencia. Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17 rs2275913 (-197G/A).**

		Vitiligo	Control	Chi cuadrada	OR	Intervalo de confianza 95%	Valor $p$
<b>IL-17 rs2275913 (-197G/A)</b>	<b>AA</b>	2 (1.72%)	4 (3.44%)	0.686			0.71
	<b>GG</b>	73 (62.93%)	72 (62.06%)				
	<b>GA</b>	41 (35.34%)	40 (34.48%)				

Por otra parte, las frecuencias de genotipos de GG, GA y AA de la IL-17A rs4711998 (-832A/G) fueron 47.41%, 39.65% y 12.93%, respectivamente en el grupo de pacientes y 44.82%, 39.65% y 12.93%, respectivamente en el grupo control, como se representa en la Tabla 9. En cuanto a la genotipificación de IL-

17A rs4711998 (-832A/G) no se encontró asociación entre este SNP y el riesgo de desarrollo de vitiligo, al no presentar una chi cuadrada (1.724) y valor de p significativo ( $p=0.422$ ).

**Tabla 9. Casos y Controles tablas de contingencia. Distribución del genotipo del locus y frecuencia alélica de IL-17A rs4711998 (-832A/G).**

		Vitiligo	Control	Chi cuadrada	OR	Intervalo de confianza 95%	Valor $p$
<b>IL-17A rs4711998 (-832A/G)</b>	<b>AA</b>	15 (12.93%)	10 (8.62%)	1.724			0.422
	<b>GA</b>	46 (39.65%)	54 (46.55%)				
	<b>GG</b>	55 (47.41%)	52 (44.82%)				

## CAPÍTULO VIII

### 8.- DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo se ha intentado dilucidar la patogenia del vitiligo y son múltiples las teorías posiblemente involucradas en la destrucción de los melanocitos con la subsecuente aparición de máculasacrómicas.

Existen múltiples factores intrínsecos y extrínsecos para el desarrollo de la enfermedad. Entre las funciones biológicas de los melanocitos se encuentra la producción de diversas citocinas, con el consiguiente desarrollo de una respuesta inmune. Se sabe que las citocinas tienen una fuerte implicación en este desarrollo y han sido múltiples las estudiadas, reforzando cada vez más la teoría autoinmune [4].

La desregulación de las interleucinas se correlacionan con la etapa de la enfermedad y la extensión de la enfermedad y esto es de relevancia no solo para conocer más sobre la patogenia del vitiligo, sino también para futuras opciones terapéuticas, con el fin de introducir terapias diana.

Además, también existen múltiples genes que tienen un rol importante en pacientes susceptibles. Existen estudios emergentes en ratones y humanos que

demuestran que los niveles celulares y tisulares de IL-17 se encuentran elevados en pacientes con vitiligo.

Jandus et al. [65] estudiaron el papel de las células Th17 en la patogénesis de ciertos trastornos autoinmunes, incluyendo el vitiligo, pero no encontraron niveles aumentados de células Th17 en la sangre periférica de pacientes con vitiligo en comparación con los controles [65]. En otro estudio de Basak et al.[37] se midieron múltiples citocinas séricas en pacientes con vitiligo, incluida la IL-17 sérica, y correlacionaron positivamente con la edad temprana de inicio y el porcentaje de participación de superficie corporal afectada. Los autores sugirieron que la IL-17 puede contribuir a la respuesta inmune en la enfermedad de inicio temprano a través de la activación por una vía diferente [37].

Múltiples estudios han establecido que varios loci genéticos están asociados con la susceptibilidad de desarrollar vitiligo. Ante la incertidumbre de si las variantes en el gen de la IL-17 pueden modular la susceptibilidad al desarrollo del vitiligo, el objetivo del estudio actual fue determinar la asociación de polimorfismos IL-17A rs4711998 (-832A/G), IL-17 rs2275913 (-197G/A) y IL-17 rs763780 (7488A/G) con el desarrollo del vitiligo.

En cuanto a variaciones genéticas relacionadas a vitiligo, existe un grupo de genes que han sido reportados cómo asociados a los mecanismos de

despigmentación en vitiligo. Algunos de los principales hallazgos se muestran en la siguiente Tabla 10.

**Tabla 10. Genes mutados asociados con mecanismos de despigmentación en vitiligo**

Gen	Función
<b>MITF</b>	Controla el desarrollo de melanina y contribuye en el color del pelo, ojos y piel.
<b>POMC</b>	Después de la escisión en péptidos, POMC tiene diferentes funciones. Los péptidos se unen a los receptores de melanocortina 1, 2, 3 y 4 (MC1R, MC2R, MC3R y MC4R), activando vías de señalización y control, supresión de la inflamación, regulación de producción de pigmentos. Además, tres péptidos similares, $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ - (MSH), se derivan de POMC, cuya función principal de $\alpha$ -MSH es estimulación de melanocitos para producir y liberar melanina.
<b>DCT</b>	Convierte el dopacromo en DHICA, que es un intermedio en la biosíntesis de melanina
<b>TYRP1</b>	Cataliza la oxidación de DHICA en presencia de enlaces de cobre. Regula el tipo de melanina sintetizado. En menor grado, puede hidroxilar la tirosina y producir melanina.
<b>MLANA</b>	Rol vital en la expresión, estabilidad y procesamiento de premelanosomas, críticos para la formación de melanosomas.

Adaptada de: Said-Fernández y colaboradores (2021) [1]

Dentro de nuestro análisis, encontramos que el vitiligo generalizado fue el subtipo clínico más común en nuestro estudio, seguido del vitiligo acrofacial. No se encontró diferencia significativa entre la distribución de genotipos y vitiligo. En este estudio, nuestro grupo identificó que el SNP de rs763780 (7488A/G) es un factor de riesgo para el desarrollo del vitiligo en población mexicana. Los resultados del presente estudio sugieren que la mezcla de alelos GG/GA de rs763780 (7488A/G) está fuertemente asociado con el riesgo de enfermedad en nuestra población con una frecuencia del 63.79% en los casos en comparación con el 45.68% en los controles ( $p < 0.0056$ , OR 2.0943; IC del 95%: 1.2375-3.5445).

El análisis genético de IL-17 rs2275913 (-197G/A) y la IL-17A rs4711998 (-832A/G) no encontró asociación entre estos genotipo y el vitiligo, al encontrarse diferencias no significativas (chi cuadrada: 0.686,  $p= 0.71$ ; chi cuadrada: 1.724,  $p=0.422$ ).

Algunas limitaciones potenciales de nuestro estudio incluyeron un tamaño de muestra pequeño. Otro aspecto importante es que toda nuestra población en estudio de pacientes con vitiligo fue de una región de nuestro país. La heterogeneidad étnica puede influir en la susceptibilidad al vitiligo o en los fenotipos clínicos, además de que el SNP de rs763780 (7488A/G) no es la variante causal de la enfermedad a pesar de su fuerte asociación. Por lo tanto, se están realizando más estudios

Para determinar el vínculo de los polimorfismos IL-17 con vitiligo, se requieren de estudios a mayor escala con un mayor número de muestra y no solo de pacientes de nuestra región del país, sino también del resto de México. Queda mucho trabajo por hacer para aclarar todos los aspectos de la patogenia de esta compleja enfermedad.

## CAPÍTULO IX

### 9.- CONCLUSIÓN

Este estudio sugiere un papel importante de IL-17 en la patogénesis del vitiligo y apoya la hipótesis de que el cambio del sistema inmunológico hacia Th1 o Th17 puede ser responsable del desarrollo de enfermedades autoinmunes.

De acuerdo con el modelo genético GG/GA del polimorfismo rs763780 (7488A/G) se observa un mayor de riesgo de padecer vitiligo en los sujetos portadores. Por otra parte, para los polimorfismos de IL-17 rs2275913 (-197G/A) y la IL-17A rs4711998 (-832A/G), no se encontró asociación con el desarrollo de esta enfermedad. Además, tampoco se encontró asociación de estas ninguna de estas variantes genéticas estudiadas con los parámetros antropométricos analizados.

# CAPÍTULO X

## 10. ANEXOS

### 10.1 Carta de aprobación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. med. JORGE DE JESÚS OCAMPO CANDIANI**  
Investigador Principal  
Servicio de Dermatología  
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"  
Presente -

Estimado Dr. Ocampo:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso **EN21-00065** con fecha del **03 de marzo de 2021**, relacionada al estudio titulado **"Análisis de polimorfismos de la e-caderina e interleucina 17 y su asociación al riesgo de desarrollo de vitiligo en una población del noreste de México"** con clave de registro **DE20-00002** recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso I, 102, 109 y 112 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.6, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NCM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de nuestra institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que el trámite con el número de ingreso antes mencionado cumple con los aspectos éticos necesarios para garantizar el bienestar y los derechos de los sujetos de investigación que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido **APROBADO**.

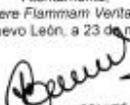
Los documentos aprobados en esta solicitud se enlistan a continuación:

- Protocolo en Extenso, versión V2, de fecha 02/Marzo/2021.
- Formato de Consentimiento Informado Controles, versión V3, de fecha 02/Marzo/2021.
- Poster DE20-00002.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, estas deberán someterse para su re-aprobación.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior se encuentre debidamente consignado. En caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el bienestar y seguridad de los sujetos en investigación.

Atentamente,  
"Alere Flammarum Veritas"  
Monterrey, Nuevo León, a 23 de marzo de 2021

  
**DR. med. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. González S/N, Col. Mitas Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L., México.  
Teléfono: 81 6520 4090, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com



## CAPÍTULO XII

### 12. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Natalia Aranza Zapata Salazar**

***Candidato para el grado de Especialidad en Dermatología***

**Tesis:** “Análisis de polimorfismos de nucleótido único de IL-17 y su asociación con el riesgo de desarrollo de vitiligo”

**Campo de Estudio:** Ciencias de la salud

**Biografía:** Nacida el 29 de julio de 1993 en Monterrey, Nuevo León México.

Hija del Dr. Homero Arturo Zapata Chavira y Dra. Laura Cecilia Salazar Mendoza.

Hermanos: Dr. Homero Diego Zapata Salazar. Abuelos paternos: Raúl Salazar

Valadez y Antonia Mendoza Vázquez. Abuelos maternos: Leocadio Zapata

Múzquiz y Oralia Elvia María del Rosario Chavira y Díaz **Educación:** Primaria y

secundaria realizada en el Instituto Laurens, en Monterrey, N.L. El bachillerato

realizado en Centro de Investigación y Desarrollo de Educación Bilingüe UANL

(CIDEB), en Monterrey, N.L. Egresada de la Facultad de Medicina de la

Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L), grado obtenido Médico

Cirujano (2010-2016). Realicé mi servicio social en el Departamento de

Dermatología del Hospital Universitario “José E. González” y actualmente estoy

por finalizar mi especialidad en esta misma institución.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

13 de Diciembre de 2021

Subdirector de Estudios de Posgrado

Presente .-

Por medio de la presente, me permito saludarlo y a su vez informar que el trabajo de tesis de la **Dra. Natalia Aranza Zapata Salazar**, con matrícula **1495597**, titulado "*Análisis de polimorfismos de nucleótido único de IL-17 y su asociación con el riesgo de desarrollo de vitiligo*" fue evaluado mediante la herramienta Turnitin para la detección de similitud y plagio.

Los resultados fueron los siguientes:

- Porcentaje de similitud: 15%
- Similitud máxima con documentos existentes: 2%

En base a lo anterior y a la reglamentación de no superar un 30% de similitud, me permito dictaminar que no considero que exista evidencia de plagio en el trabajo.

Se adjunta el dictamen de Turnitin en caso de ser requerido para su verificación.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

"Alere Flamman Veritatis"

Monterrey, NL.

---

Dra. med. Minerva Gómez Flores

Coordinadora de Enseñanza de Posgrado del  
Programa de Especialización en Dermatología  
Hospital Universitario "Dr. José E. González"

**SERVICIO DE DERMATOLOGÍA**

Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,  
C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Tel.: (81) 8348 1465,  
Conmutador: (81) 8389 1111, ext. 3198, Fax: (81) 8348 4407  
[www.dermatologiauanl.com](http://www.dermatologiauanl.com)



DERMATOLOGÍA  
HOSPITAL UNIVERSITARIO

## Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 13-dic.-2021 7:39 a. m. CST  
 Identificador: 1729111253  
 Número de palabras: 13155  
 Entregado: 2

Índice de similitud <b>15%</b>	<b>Similitud según fuente</b>	
	Internet Sources:	14%
	Publicaciones:	3%
	Trabajos del estudiante:	5%

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO...  
 Por Natalia Aranza Zapata Salazar

<a href="#">incluir citas</a> <a href="#">Excluir bibliografía</a> <a href="#">excluyendo las coincidencias &lt; 5 de las palabras</a>		modo: <input type="text" value="ver informe en vista quickview (vista clásica)"/>	Change mode
<a href="#">imprimir</a> <a href="#">actualizar</a> <a href="#">descargar</a>			
2% match (trabajos de los estudiantes desde 04-nov.-2016)	<a href="#">Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2016-11-04</a>		
1% match ()	<a href="#">Salinas Santander, Mauricio Andrés. "Análisis del perfil de expresión de pacientes con vitiligo", 2012</a>		
1% match ()	<a href="#">Ocampo Candiani, Jorge de Jesús. "Caracterización molecular del microambiente de la piel en pacientes con vitiligo, para la búsqueda de biomarcadores indicadores de respuesta a tratamiento.", 2016</a>		
<1% match (trabajos de los estudiantes desde 01-nov.-2016)	<a href="#">Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2016-11-01</a>		
<1% match (trabajos de los estudiantes desde 18-dic.-2020)	<a href="#">Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-12-18</a>		
<1% match (trabajos de los estudiantes desde 29-abr.-2014)	<a href="#">Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2014-04-29</a>		
<1% match (trabajos de los estudiantes desde 01-nov.-2016)	<a href="#">Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2016-11-01</a>		