

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**Efecto de los polimorfismos en los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* además de
beta-defensina 1, vitamina D y catalasa en pacientes con vitiligo**

TESIS

Que para el obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. en C. Luis Antonio Ochoa Ramírez

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Jesús Salvador Velarde Félix

Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho

Culiacán, Sinaloa, Diciembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales el día 26 del mes Febrero del año 2019, el (la) que suscribe Luis Antonio Ochoa Ramírez alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con número de cuenta 9815444-3, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Jesús Salvador Velarde Félix y Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho y cede los derechos del trabajo titulado “Efecto de los polimorfismos en los genes DEFB1, VDR y CAT además de beta-defensina 1, vitamina D y catalasa en pacientes con vitiligo”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Luis Antonio Ochoa Ramírez

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa por su paciencia y su apoyo incondicional que me otorga la seguridad para lograr mis objetivos no sólo en mis estudios sino en mi vida en general.

A mis hijos por enorgullecerme día con día y brindarme la motivación para seguir adelante.

A mi madre por siempre haber sido un verdadero pilar en mi vida como madre, consejera e impulsora de mis metas y ahora también por ser quien más consiente a mis hijos.

Al Dr. Salvador Velarde por ser mi mentor en el camino académico y por brindarme un espacio en su equipo de trabajo, siempre exigiendo y fomentando mi mejora.

A la Dra. Sylvia Paz Díaz por su valiosa asesoría académica y en infraestructura contribuyendo en el desarrollo del proyecto y de mí persona.

A mis compañeros por contribuir en la mejora del proyecto a través de crítica constructiva y captando sujetos de estudio; además de compartir sus experiencias profesionales y su amistad haciendo llevadera la estancia en el laboratorio.

A los médicos dermatólogos por su asesoría clínica y su colaboración en el reclutamiento del grupo de pacientes.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad en Ciencias Químico Biológicas por darme la oportunidad de cumplir una más de mis metas académicas.

Al CONACYT por otorgarme una vez más beca de posgrado.

A PROFAPI/UAS por brindar el apoyo económico para la adquisición de los insumos requeridos para la realización del proyecto.

A los individuos que desinteresadamente participaron en el estudio por contribuir no sólo en el buen término del mismo sino también en el conocimiento científico del vitiligo en general pero sobre todo a nivel regional.

ÍNDICE

Resumen	6
Abstract	8
1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1. Vitiligo	12
2.1.1. Epidemiología	13
2.1.2. Clasificación	13
2.1.3. Diagnóstico	16
2.1.4. Etiopatogenia	17
2.1.5. Tratamiento	22
2.1.6. Bases genéticas del vitiligo	23
2.2. Beta-defensina 1	25
2.2.1. Biología	25
2.2.2. Aspectos genéticos	28
2.2.3. Beta-defensina 1 y enfermedades autoinmunes	29
2.3. Vitamina D y su receptor	30
2.3.1. Biología de la vitamina D	30
2.3.2. Efecto de la vitamina D en el sistema inmune	34
2.3.3. Aspectos genéticos (VDR)	36
2.3.4. Vitamina D y VDR en vitiligo	38
2.4. Catalasa	38
2.4.1. Biología y bioquímica	38

2.4.2. Aspectos genéticos	42
2.4.3. Catalasa en vitiligo	43
3. Justificación	46
4. Hipótesis	47
5. Objetivos	48
5.1. Objetivo general	48
5.2. Objetivos específicos	48
6. Materiales y métodos	49
6.1. Diseño del estudio	49
6.1.1. Tipo de estudio	49
6.1.2. Sujetos de estudio	49
6.1.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	50
6.2. Análisis	51
6.2.1. Análisis genéticos	51
6.2.2. Análisis séricos	51
6.2.3. Análisis estadístico	53
7. Resultados	55
7.1. Características de los sujetos de estudio	55
7.2. Hallazgos para beta-defensina 1 y su gen <i>DEFB1</i>	56
7.2.1. Polimorfismos en <i>DEFB1</i> y susceptibilidad a vitiligo	56
7.2.2. Polimorfismos en <i>DEFB1</i> y características clínicas de vitiligo	58
7.2.3. Niveles de beta-defensina 1 y vitiligo	60
7.2.4. Niveles de beta-defensina 1 y características clínicas de vitiligo	61

7.2.5. Relación polimorfismos-niveles séricos	62
7.3. Hallazgos para vitamina D y el gen de su receptor (<i>VDR</i>)	64
7.3.1. Polimorfismos en <i>VDR</i> y susceptibilidad a vitiligo	64
7.3.2. Polimorfismos en <i>VDR</i> y características clínicas de vitiligo	66
7.3.3. Niveles de vitamina D y vitiligo	69
7.3.4. Niveles de vitamina D y características clínicas de vitiligo	70
7.3.5. Relación polimorfismos-niveles séricos	70
7.4. Hallazgos para catalasa y su gen	72
7.4.1. Polimorfismos en <i>CAT</i> y susceptibilidad a vitiligo	72
7.4.2. Polimorfismos en <i>CAT</i> y características clínicas de vitiligo	74
7.4.3. Actividad de catalasa y vitiligo	78
7.4.4. Actividad de catalasa y características clínicas de vitiligo	78
7.4.5. Relación polimorfismos-actividad en suero	78
8. Discusión	81
8.1. Características clínicas de vitiligo	81
8.2. <i>DEFBI</i> , <i>HBD-1</i> y vitiligo	81
8.3. <i>VDR</i> , vitamina D y vitiligo	85
8.4. <i>CAT</i> , catalasa y vitiligo	87
9. Conclusiones	92
10. Perspectivas	93
11. Referencias	94
12. Anexos	104
12.2. Carta de consentimiento informado	104

13. Siglas y abreviaturas	109
Índice de figuras	113
Índice de cuadros	114
Publicaciones y participación en congresos	117

RESUMEN

Antecedentes. El vitiligo es un trastorno de la pigmentación caracterizado por la destrucción autoinmune de los melanocitos de piel y mucosas. Diversos genes y moléculas han sido vinculados con su patogénesis destacando moduladores de la inmunidad adaptativa tales como la beta-defensina 1 (HBD-1) y la vitamina D, ambas relacionadas a enfermedades autoinmunes aunque el vínculo con vitiligo no se ha investigado para la primera y para la segunda sólo se ha descrito en poblaciones europea y asiática. Además, debido al vínculo del estrés oxidativo con vitiligo, enzimas del sistema antioxidante como la catalasa han sido estudiadas aunque su papel en la enfermedad en población mexicana se desconoce. **Objetivo.** Evaluar el efecto de los polimorfismos en los genes de la HBD-1, receptor de vitamina D y catalasa (*DEFB1*, *VDR* y *CAT*) y de sus moléculas (HBD-1, vitamina D y catalasa) sobre la susceptibilidad a vitiligo y/o a sus características clínicas. **Material y métodos.** Se incluyeron 173 pacientes con vitiligo y 184 controles sanos con ancestría del noroeste de México. Los polimorfismos -52 G/A, -44 C/G y -20 G/A del gen *DEFB1*; *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* del gen *VDR* y -89 A/T, 389 C/T y 419 C/T del gen *CAT* fueron analizados mediante PCR-RFLP. Se determinaron los niveles séricos de HBD-1 y vitamina D por ELISA y la actividad enzimática de catalasa por método colorimétrico. Para las comparaciones casos-contróles se utilizó regresión logística condicional y prueba de Wilcoxon y para el resto, regresión logística y U de Mann-Whitney. **Resultados.** Para *DEFB1*, el polimorfismo -44 C/G mostró aumentar el riesgo de vitiligo ($p=0.02$) mientras que el -20 G/A resultó de protección ($p=0.04$). Los niveles de HBD-1 fueron menores en el grupo de pacientes ($p<0.01$), particularmente en aquellos con vitiligo activo ($p=0.02$). Los polimorfismos en *VDR* se asociaron con la presencia de fenómeno de Koebner ($p=0.02$). Los niveles de vitamina D fueron menores en pacientes sin

asociarse con las variables clínicas ($p=0.02$, $p>0.05$, respectivamente). Para *CAT* el polimorfismo -89 A/T se asoció al aumento de riesgo ($p=0.02$), mientras que el 389 C/T y el haplotipo AT se asociaron a protección contra vitiligo y el haplotipo AC con protección contra vitiligo activo ($p<0.05$). La actividad de catalasa fue menor en pacientes sin asociarse con las características clínicas ($p<0.01$, $p>0.05$, respectivamente). Finalmente, el haplotipo AT de *CAT* se asoció con menor actividad de catalasa en pacientes ($p=0.04$). **Conclusiones.** En conclusión, HBD-1, vitamina D y catalasa se encuentran involucrados en la susceptibilidad y/o patogénesis del vitiligo en población del noroeste de México. Estos resultados contribuyen en el mejor entendimiento de la epidemiología genética del vitiligo y podrían coadyuvar en la toma de decisiones terapéuticas que impliquen a las moléculas aquí estudiadas.

Palabras clave: Vitiligo, vitiligo activo, HBD-1, *DEFB1*, vitamina D, *VDR*, catalasa, *CAT*

ABSTRACT

Background. Vitiligo is an acquired pigmentation disorder characterized by autoimmune destruction of skin and mucosal melanocytes. Various genes and molecules have been linked to its pathogenesis highlighting adaptive immunity modulators such as beta-defensin 1 (HBD-1) and vitamin D, both related to autoimmune diseases although the link with vitiligo have not been studied for the first and for the second has been described only in European and Asian populations. Furthermore, due to the relationship of oxidative stress with vitiligo, enzymes of the antioxidant system such as catalase have been studied but its role in the disease in Mexican population is unknown. **Objective.** To evaluate the effect of beta-defensin 1 (HBD-1), vitamin D receptor and catalase gene (*DEFB1*, *VDR* and *CAT*) polymorphisms, and their molecules (HBD-1, vitamin D and catalase) in the susceptibility to vitiligo and/or its clinical characteristics. **Material and methods.** A total of 173 vitiligo patients and 184 healthy controls with Northwestern Mexican ancestry were included. *DEFB1* -52 G/A, -44 C/G and -20 G/A; *VDR* *BsmI*, *ApaI* and *TaqI* and *CAT* -89 A/T, 389 C/T and 419 C/T gene polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP. Serum HBD-1 and vitamin D levels were assessed by ELISA and catalase enzymatic activity by colorimetric method. Conditional logistic regression and Wilcoxon test was used for case-control comparisons, and logistic regression and Mann-Whitney for the rest. **Results.** For *DEFB1*, -44 C/G polymorphisms increased the risk for vitiligo ($p=0.02$) while -20 G/A showed to be protective ($p=0.04$). HBD-1 levels were lower in patients ($p<0.01$), particularly in those with active vitiligo ($p=0.02$). *VDR* polymorphisms were associated with presence of Koebner phenomenon ($p=0.02$). Vitamin D levels were decreased in patients but they were not associated with vitiligo clinical characteristics ($p=0.02$, $p>0.05$, respectively). *CAT* -89 A/T polymorphism was associated

with an increased risk while 389 C/T polymorphism ($p=0.02$) and AT haplotype were associated with protection against vitiligo and haplotype AC with protection against active vitiligo ($p<0.05$). Catalase activity was lower in patients but without association with clinical characteristics ($p<0.01$, $p>0.05$, respectively). Finally, *CAT* AT haplotype was found associated with lower catalase activity in patients ($p=0.04$). **Conclusion.** In conclusion, HBD-1, vitamin D and catalase are involved in vitiligo susceptibility and/or pathogenesis in Northwestern Mexican population. These results contribute to the better understanding of genetic epidemiology of vitiligo and might help in therapeutic decisions implying here studied molecules.

Keywords: Vitiligo, active vitiligo, HBD-1, *DEFB1*, vitamin D, *VDR*, catalase, *CAT*

1. INTRODUCCIÓN

El vitiligo es un trastorno de la pigmentación adquirido y crónico. Se caracteriza por la aparición de máculas hipo o acrómicas en la superficie de la piel y membranas mucosas que corresponden a una pérdida de la función/muerte de los melanocitos. La prevalencia mundial es de 0.5% a 2% y afecta a todos los grupos étnicos y en igual proporción a hombres y mujeres, apareciendo antes de los 20 años de edad hasta en un 50% de los afectados. Se han propuesto múltiples teorías para explicar la patogénesis de la enfermedad destacando la hipótesis del defecto intrínseco del melanocito, la autoinmune y la de convergencia que engloba a las dos anteriores y que sostiene que el estrés oxidativo, favorecido por un defecto en la maquinaria antioxidante, origina estrés en el retículo endoplásmico del melanocito originando la liberación de quimiocinas, moléculas asociadas a daño celular y la presentación de autoantígenos alterados que en última instancia generan una respuesta autoinmune específica en contra del melanocito.

Con el fin de dilucidar la patogénesis del vitiligo se han estudiado diversas moléculas relacionadas con la piel, entre ellas algunas de función inmune, metabólica o incluso reguladora. Particularmente a nivel genético resultan de interés el gen de la beta-defensina 1 (*DEFB1*), dada su asociación con patologías autoinmunes y considerando que aún no hay reportes de su relación con vitiligo. También, por su rol en la inmunomodulación, resulta relevante el gen del receptor de vitamina D (*VDR*); y por su papel como detoxificante el de la catalasa (*CAT*). Asimismo, estudiar a las moléculas vinculadas a dichos genes, esto es, beta-defensina 1, vitamina D y catalasa, resulta de gran importancia para coadyuvar con el mejor entendimiento del papel biológico de los polimorfismos en la enfermedad, sobre todo si se toma en cuenta que algunos enfoques terapéuticos involucran el uso tópico o sistémico de

análogos de vitamina D o la inducción de la producción de la misma a través de la fototerapia; así como el uso de análogos de catalasa con resultados prometedores pero aún no concluyentes.

Con lo anterior en consideración, el objetivo de la presente investigación fue vincular a los polimorfismos en los genes *DEFBI*, *VDR* y *CAT*, así como los niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1), vitamina D y la actividad enzimática de catalasa con vitiligo *per se* y con sus características clínicas, en población originaria del noroeste de México.

2. ANTECEDENTES

2.1. Vitiligo

El vitiligo es un trastorno de la pigmentación adquirido, crónico y sistémico que tiene un curso clínico impredecible y se caracteriza por la aparición de máculas acrómicas o hipocrómicas en la piel y membranas mucosas debido a la desaparición de los melanocitos en el área afectada (Tarlé y cols., 2014) (Figura 1).

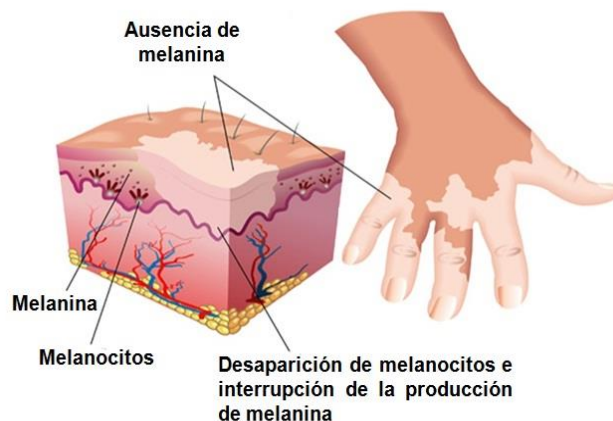


Figura 1. Anatomía de las lesiones vitiliginosas. Las máculas acrómicas características del vitiligo son resultado de la pérdida de los melanocitos epidérmicos o de su función. Tomada de internet (<http://vedology.blogspot.com/2015/10/vitiligo-skin-disease.html>).

Además de la afectación en piel y mucosa, los melanocitos de los sistemas ocular y auditivo pueden disminuir, promoviendo trastornos como uveítis e hipoacusia, que en estudios previos se han detectado en el 13-16% de los pacientes con vitiligo (Sharma y cols., 2004; Tarlé y cols., 2014). Sin embargo, la principal consecuencia de la enfermedad es su impacto psicológico ya que debido a la afectación estética el paciente siente insatisfacción con su apariencia que le provoca una endeble percepción propia, resultando comúnmente en baja

autoestima, ansiedad y depresión; factores que repercuten en gran medida en su calidad de vida (Nguyen y cols., 2016).

2.1.1. Epidemiología

El vitiligo es el desorden de despigmentación más frecuente que afecta aproximadamente al 0.5-1% de la población mundial (Speeckaert y van Geel, 2017). Sin embargo, se han llegado a reportar prevalencias de hasta el 8% en la India y del 2.6% en México (Ezzedine y cols., 2015; Ruiz-Maldonado y cols., 1977). Al respecto de estas discrepancias, Krüger y Schallreuter (2012) sostienen que las altas prevalencias reportadas podrían deberse a que fueron obtenidas de estudios con pacientes atendidos en clínicas dermatológicas y no de población general, concluyendo que la prevalencia mundial oscila entre el 0.5 y el 2%.

El vitiligo puede desarrollarse a cualquier edad, aunque se estima que casi la mitad de los casos se presentan antes de los 20 años de edad y el 14% antes de los 10 años (Ezzedine y cols., 2015). Además, no existen diferencias en la prevalencia del vitiligo de acuerdo con el género, tipo de piel o etnicidad, pero algunos reportes indican que se desarrolla a menor edad en mujeres (Speeckaert y van Geel, 2017).

2.1.2. Clasificación

Clínicamente, el vitiligo se caracteriza por la presencia de manchas blancas (máculasacrómicas) de tonalidad blanco-mate homogéneas, de límites netos, de tamaño y forma variable. Su localización tiende a ser simétrica, predominando en dorso de manos, muñecas, antebrazos, contorno de ojos y boca, pliegues de flexión, genitales, cintura y cuero cabelludo y

cuando afecta al folículo piloso puede presentarse poliosis (ausencia de color en cabello, cejas y pestañas) (Taieb y Picardo, 2010).

Con base en los aspectos clínicos anteriores, el vitiligo se clasifica en dos formas principales: vitiligo segmentario y vitiligo no segmentario (Ezzedine y cols., 2012). El segmentario se caracteriza por su distribución unilateral y en segmento o en forma de banda, involucramiento temprano del reservorio de melanocitos foliculares, edad de inicio temprana y estabilización rápida; mientras que las lesiones del no segmentario suelen ser bilaterales, distribuidas en un patrón acrofacial o diseminadas simétricamente en todo el cuerpo, progresando con el tiempo (Ezzedine y cols., 2015). Cabe señalar que el vitiligo segmentario constituye una variante infrecuente (3.5-10% de los pacientes con vitiligo) e independiente del vitiligo no segmentario debido a que divergen en sus mecanismos etiopatogénicos (Speeckaert y van Geel, 2017).

El vitiligo no segmentario suele iniciar con una distribución focal o acrofacial y posteriormente progresar a la forma generalizada o a una universal, donde las lesiones ocupan más del 80% de la superficie corporal (Ezzedine y cols., 2012) (Figura 2). Los anteriores constituyen los subtipos clínicos del vitiligo no segmentario, que por motivo de conveniencia y pertinencia, de aquí en adelante se mencionará solamente como vitiligo, excluyendo a la forma segmentaria.

Además de la clasificación en función de las máculas, con ayuda de la historia clínica del paciente, el vitiligo también suele clasificarse en relación con los siguientes parámetros:

- Edad de inicio: aparición temprana o tardía, el umbral de edad no ha sido aún establecido.

- Estado de actividad: estable o activo de acuerdo al puntaje de actividad de vitiligo (VIDA, del inglés vitiligo disease activity). El puntaje VIDA se gradúa como +4: actividad en las últimas 6 semanas; +3: actividad de 6 semanas a 3 meses; +2: actividad de 3 a 6 meses; +1: actividad de 6 a 12 meses; 0: estable por un año o más y -1: estable por un año o más con repigmentación (Dicle, 2015).

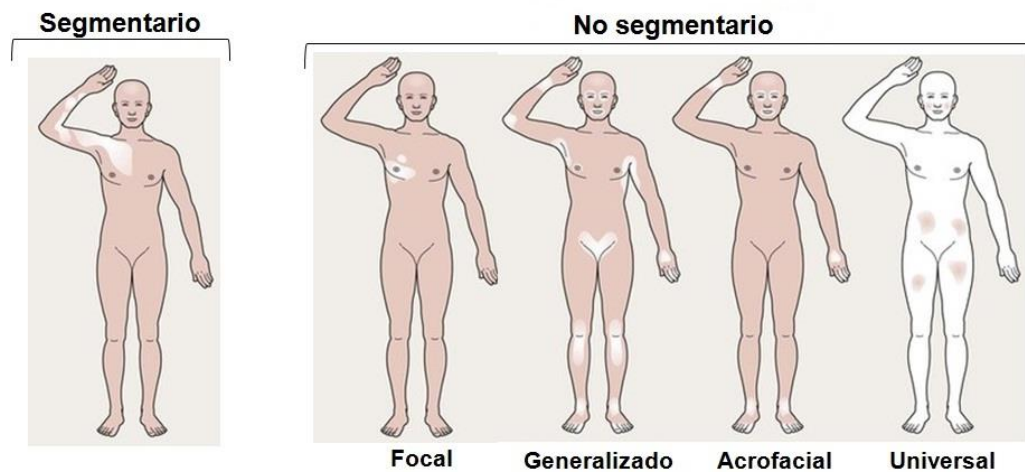


Figura 2. Clasificación clínica del vitiligo. El vitiligo se clasifica en dos tipos principales: segmentario y no segmentario. El segundo, el más común, se subclasifica de acuerdo a la localización de las máculas en focal, en un solo sitio corporal; acrofacial, en cara, manos y pies, y generalizado, diseminado en todo el cuerpo. El vitiligo se cataloga como universal cuando la superficie corporal despigmentada es mayor del 80%. Modificado de Le Poole y Boissy, 1997.

Adicionalmente, algunos autores lo clasifican dependiendo si tiene o no antecedente familiar como vitiligo familiar o esporádico, respectivamente; si tiene comorbilidad autoinmune o no o si presenta fenómeno de Koebner (Ezzedine y cols., 2015; Karelson y cols., 2012). El fenómeno de Koebner se define como el desarrollo de lesiones en sitios no afectados que

sufrieron trauma en piel y suele asociarse con el estado activo del vitiligo (Ezzedine y cols., 2012).

2.1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de vitiligo suele ser clínico, basado en los hallazgos morfológicos e historia clínica del individuo. Así pues, las cualidades adquirida, crónica y progresiva del vitiligo descartan a otros desordenes que cursan con despigmentación tales como piebaldismo, hipomelanosis monogénicas (p.ej. albinismo oculocutáneo, hipomelanosis de Ito), incluida esclerosis tuberosa; hipopigmentación post-inflamatoria/asociada a linfoma (p.ej. en psoriasis, dermatitis atópica y micosis fungoide); post-inflamatoria/infecciosa (p.ej. en pitiriasis versicolor y lepra); leucoderma post-traumático; leucoderma asociado a melanoma; melasma y despigmentación inducida por fármacos (tópicos o sistémicos) (Taïeb y cols., 2007).

Adicionalmente, se puede utilizar la lámpara de Wood para diferenciar entre lesiones despigmentadas e hipopigmentadas. La lámpara de Wood emite luz ultravioleta (UV) de onda larga (320-400 nm) que es reflejada en su totalidad en lesiones despigmentadas debido a la ausencia de melanina que normalmente la absorbe, apareciendo como parches blanco azulados brillantes (Goh y Pandya, 2017). Esta herramienta es útil para diferenciar al vitiligo de las enfermedades mencionadas anteriormente así como para evaluar la extensión de la enfermedad en pacientes con tono de piel claro (Rodrigues y cols., 2017) (Figura 3).

El diagnóstico de vitiligo rara vez requiere de confirmación histopatológica, pero cuando se llega a realizar se aprecia una completa o casi completa pérdida de la pigmentación epidérmica (tinción Fontana-Masson) con ausencia de melanocitos en la membrana basal (Rodrigues y cols., 2017). Lesiones tempranas muestran una subliminal dermatitis de interfase que consiste

en linfocitos T citotóxicos (CTL) $CD8^+$ infiltrándose a la epidermis en proximidad con los melanocitos (Rodrigues y cols., 2017).



Figura 3. Vitiligo bajo luz ultravioleta. Se muestran ejemplos de la comparación de la apariencia de las lesiones vitiliginosas bajo luz natural (arriba) y luz ultravioleta (abajo) proveniente de una lámpara de Wood. Tomada de internet (vitiligo-center.org/el).

Como se mencionó anteriormente, el vitiligo puede coexistir con otras patologías, particularmente de etiología autoinmune, independientemente del orden de aparición de las mismas; entre ellas destacan enfermedad tiroidea, alopecia areata, diabetes tipo 1 (DT1), artritis reumatoide, entre otras (Choi y cols., 2017; Gill y cols., 2016).

2.1.4. Etiopatogenia

El vitiligo es considerado como una enfermedad de patología multifactorial con factores genéticos y ambientales involucrados en su aparición. Con el fin de explicar su causa, han sido propuestas diversas teorías entre las que destacan la teoría neural, la del defecto intrínseco del melanocito y la autoinmune.

Teoría neural. Menciona que ciertos mediadores neuroquímicos liberados en las terminaciones nerviosas podrían ejercer un efecto tóxico sobre los melanocitos, por ejemplo la neurotensina que puede inducir la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Mohammed y cols., 2015). No obstante, dicha teoría aplica principalmente para vitiligo segmentario. La etiología del vitiligo no segmentario se explica mejor a través de las otras dos teorías (defecto del melanocito y autoinmune).

Teoría del defecto intrínseco del melanocito. Se postuló a la luz de los diversos reportes de la dificultad de cultivar melanocitos de piel no afectada extraída de pacientes con vitiligo comparado con melanocitos de individuos sanos (Harris, 2016; Puri y cols., 1987). Se basa en el hecho de que la síntesis de melanina es tóxica para el melanocito, pues produce de manera secundaria peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Harris, 2016). Además, el melanocito requiere sintetizar grandes cantidades de proteínas, lo que precisa un elevado gasto y producción de energía generando colateralmente especies reactivas de oxígeno (ROS), aunado a la posición epidérmica del melanocito que lo expone a radiación UV originando ROS intracelulares, H_2O_2 y aniones superóxido (Harris, 2016; Rodrigues y cols., 2017). En este sentido, la teoría del defecto intrínseco del melanocito sugiere que si bien los melanocitos de todos los humanos sufren estrés celular, los de los pacientes con vitiligo presentan un umbral de sensibilidad bajo a niveles de estrés normales o sufren de mayores niveles de estrés que los individuos sanos (Harris, 2016; Rodrigues y cols., 2017).

Teoría autoinmune. Es la teoría que mejor explica al vitiligo no segmentario y se basa principalmente en su asociación clínica con diversos desórdenes autoinmunes, particularmente tiroiditis, además de que a menudo responde a tratamientos inmunosupresores (Ezzedine y cols., 2015; Gey y cols., 2013; Mohammed y cols., 2015). Un amplio acervo científico apoya

está teoría, apuntando al involucramiento de diversos componentes inmunológicos, principalmente aquellos que participan en la inmunidad celular Th1 y Th17, citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17 (Salinas-Santander y cols., 2012; Wang y cols., 2011; Yang y cols., 2015; Zhou y cols., 2015); quimiocinas y componentes de la inmunidad innata y humoral como proteína de choque térmico 70 (HSP70) y en menor medida anticuerpos antimelanocito (Mansuri y cols., 2014; Mohammed y cols., 2015). Todos los componentes anteriores cooperan concertando la generación de la respuesta de memoria en contra del melanocito y su consecuente eliminación directamente por CTL CD8⁺ antimelanocito (Harris, 2016; Mansuri y cols., 2014; Rodrigues y cols., 2017).

Teoría de la convergencia. A pesar de la popularidad de las dos teorías anteriormente mencionadas, en la actualidad se acepta que ambas son necesarias más no suficientes por sí solas para explicar la patogénesis del vitiligo (Mansuri y cols., 2014; Rodrigues y cols., 2017). Así pues, los defectos intrínsecos en el melanocito *per se* no causarían vitiligo pero si la acumulación de ROS y por ende estrés oxidativo que a su vez funcionaría como promotor de los mecanismos de autoinmunidad en individuos genéticamente susceptibles (Manga y cols., 2016). Al respecto, investigaciones recientes han sugerido al estrés en retículo endoplásmico (RE) como el nexo principal entre el estrés oxidativo y la autoinmunidad.

El RE es el sitio donde tiene lugar la síntesis y maduración de las proteínas, proceso que requiere un ambiente regulado para facilitar la formación de los enlaces químicos requeridos para las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas (Manga y cols., 2016). La disrupción del balance redox del RE ocasionada por el estrés oxidativo intracelular genera la acumulación de proteínas inmaduras y péptidos mal plegados, conocido como estrés en RE, y resulta en la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR, del inglés *unfolded*

protein response) cuya función es disminuir el estrés en RE a través de la reducción de la síntesis proteica global, incremento de la expresión de chaperonas para facilitar el plegamiento de proteínas e incremento de la degradación de proteínas mal plegadas (Eletto y cols., 2014). La activación excesiva de la UPR conduce a autofagia como mecanismo de supervivencia celular, aunque a alto grado/duración de estrés puede conducir a apoptosis (Eletto y cols., 2014).

Tanto la UPR como la autofagia favorecen la generación de la respuesta autoinmune en contra del melanocito observada en vitiligo al promover la liberación de autoantígenos por melanocitos decadentes, la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α , que atraen a maquinaria inmunológica a la piel (Manga y cols., 2016; Xie y cols., 2016); y la secreción de moléculas asociadas a daño celular, particularmente iHSP70, que induce la maduración de células dendríticas, la producción de citocinas Th1 y estimula la presentación cruzada a células T vírgenes rompiendo con la tolerancia inmunológica (Harris, 2016; Mansuri y cols., 2014) (Figura 4).

De manera más detallada, la iHSP70 activa a las células dendríticas a través del receptor tipo Toll (TLR) 2 y TLR4 mientras que el estrés oxidativo activa a los inflamosomas NLRP1 y NLRP3, que en conjunto inducen su maduración y por ende su migración a ganglio linfático donde presentan los antígenos melanocíticos a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes, diferenciándolos hacia Th1 y CTL, respectivamente (Harris, 2016; Speeckaert y van Geel, 2017). Los linfocitos Th1 promueven la generación de autoanticuerpos pero principalmente potencian la función de los CTL, que son necesarios y suficientes para la destrucción de los melanocitos en pacientes con vitiligo (Rodrigues y cols., 2017). Además, los CTL de pacientes con vitiligo producen predominantemente IFN- γ necesario para la inducción de la quimiocina

CXCL10 y su receptor CXCR3 a través de los cuales se reclutan al sitio lesional a los CTL autorreactivos circulantes o residentes (Rodriguez y cols., 2017; Speeckaert y van Geel, 2017; Yang y cols., 2015).

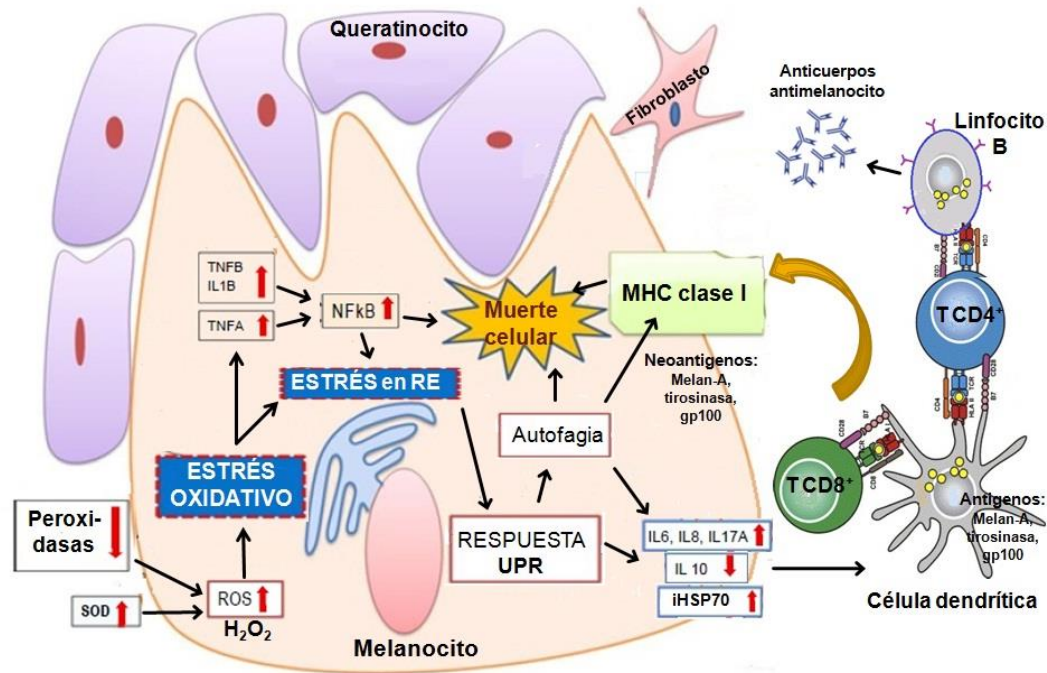


Figura 4. Mecanismo de destrucción del melanocito en vitiligo. La disminución de las enzimas antioxidantes promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo finalmente a estrés oxidativo. El estrés oxidativo induce estrés en el retículo endoplásmico (RE) que activa la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), cuyos mediadores promueven el reclutamiento y maduración de células dendríticas detonando la respuesta autoinmune en contra del melanocito. SOD: superóxido dismutasa, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, TNF: factor de necrosis tumoral, IL: interleucina, NFκB: factor nuclear κB, iHSP70: proteína de choque térmico 70 inducible. Modificado de Mansuri y cols., 2014.

Otra subpoblación de linfocitos T CD4⁺ involucrada es la T reguladora (Treg) debido a su disminución en pacientes con vitiligo en relación a individuos sanos, asociándose a una falta

de supresión de la autoinmunidad (Dwivedi y cols., 2013); y la Th17 que se ha relacionado a vitiligo debido a su correlación, junto con sus citocinas características IL-17 e IL-21, con actividad de la enfermedad (Zhou y cols., 2015). Sin embargo, a la fecha no se conoce como ocurre el nexo vitiligo-Th17 aunque se hipotetiza que podría ser a través de su función en la activación del inflamosoma en células dendríticas (Speeckaert y van Geel, 2017; Wang y cols., 2011).

Esta última propuesta de mecanismo patogénico del vitiligo, la teoría de la convergencia, es la más aceptada actualmente al punto que incluso se ha extrapolado a otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto y DT1 (Harris, 2016).

2.1.5. Tratamiento

En la actualidad no existe tratamiento que asegure la cura completa del vitiligo. La finalidad del tratamiento es controlar el daño autoinmune a los melanocitos y estimular su migración de piel cercana y reservorios anexos (Reichert-Faria y cols., 2014). El tratamiento puede clasificarse como farmacológico, físico y quirúrgico y en ocasiones pueden combinarse.

Farmacológico. Los corticosteroides tópicos continúan siendo la opción de primera línea para tratar el vitiligo. Sus efectos antiinflamatorios pueden disminuir la progresión del vitiligo pero difícilmente cesar su avance y su uso solo se ve limitado por sus efectos secundarios que incluyen atrofia, teleangiectasias y estrías (Reichert-Faria y cols., 2014). Ante la aparición de efectos secundarios se recomienda el uso de inhibidores de calcineurina como tacrolimus o pimecrolimus que específicamente atenúan la actividad de linfocitos T y disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias y al igual que los corticosteroides se enfocan en estabilizar la enfermedad aunque suelen promover repigmentación en zona facial (Speeckaert

y van Geel, 2017). Además, casos de vitiligo de rápido avance pueden ser tratados con dosis bajas de corticosteroides orales (Manga y cols., 2016). Otros tratamientos tópicos incluyen el uso de análogos de vitamina D y prostaglandina E2, con resultados prometedores en algunos ensayos; y en casos de individuos con alto porcentaje de despigmentación, cremas con base en monobencil éter de hidroquinona para promover la despigmentación global (Manga y cols., 2016; Speeckaert y van Geel, 2017).

Físico. Este tratamiento implica la irradiación con luz UV y suele combinarse con agentes repigmentantes. La fototerapia con UVA y psoralenos fue muy utilizada durante la segunda mitad del siglo XX, pero hoy en día ha cedido su lugar a la fototerapia con luz UV de banda estrecha (NBUVB), debido a su mayor efectividad y seguridad (Reichert-Faria y cols., 2014). El efecto repigmentante de la NBUVB radica en la estimulación de la migración de los melanocitos de los reservorios en folículos piloso a piel, el cual puede potenciarse con el uso de promotores de repigmentación orales como el afamelanotide, un análogo sintético de la hormona melanotrófica, aunque aún no hay evidencia contundente (Grimes y cols., 2013).

Quirúrgico. Este tratamiento consiste en el trasplante autólogo de segmentos de piel pigmentada a zonas vitiliginosas y solo se está indicado en casos de vitiligo estable (Le Poole y Boissy, 1997). El procedimiento más popular es el injerto múltiple por punch que tiene un excelente resultado estético y repigmentativo, ya que 7 de cada 10 individuos intervenidos presentan tasas de repigmentación de hasta 90-100% (Rodrigues y cols., 2017).

2.1.6. Bases genéticas del vitiligo

El factor hereditario parece jugar un papel relevante en el vitiligo. Diversos reportes indican una prevalencia de casos familiares de vitiligo que oscila entre 10 y 36% (Karelson y cols.,

2011). Además, el 20% de los pacientes con vitiligo poseen familiares en primer grado con la enfermedad y los familiares que no han desarrollado lesiones sugestivas de vitiligo tienen de 7 a 10 veces mayor riesgo de presentarlas que el resto de la población general (Nath y cols., 1994). Sin embargo, la genética del vitiligo no puede ser explicada mediante patrones mendelianos simples y su heredabilidad sugiere un carácter poligénico gobernado por un grupo de alelos recesivos situados en diversos loci autosómicos no ligados entre sí que pueden estar relacionados con la generación de estrés oxidativo, síntesis de melanina, autoinmunidad, entre otros, que colectivamente podrían conferir el fenotipo de vitiligo (Nath y cols., 1994).

Estudios de asociación de genoma completo a gran escala, principalmente en población caucásica europea y china, han descubierto aproximadamente 50 diferentes loci genéticos que contribuyen al riesgo de vitiligo, algunos de los cuales también participan en otras enfermedades autoinmunes epidemiológicamente asociadas con vitiligo (Spritz y Andersen, 2017). Los primeros en estudiarse fueron los alelos del HLA sustentando la patogénesis autoinmune. Al respecto, en la actualidad se sabe que el HLA-A, parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, es un importante factor de riesgo para el desarrollo del vitiligo, específicamente la variante *HLA-A*02:01* (Jin y cols., 2012). Asimismo, el alelo del MHC clase II HLA-DR4 también se asocia con riesgo (Spritz y Andersen, 2017).

Respecto a genes no HLA, el primero en identificarse fue el gen del inflamosoma *NRLP1*, confirmando el papel causal del sistema inmune en vitiligo (Jin y cols., 2007). Estudios posteriores han revelado la participación de diversos genes de función inmunoreguladora como *FOXP3*, el gen de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y el de la proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22) (Birlea y cols., 2011; García-Melendez y cols., 2014) o de citocinas como IL-10, IL-1B y TNF- α (Aydingöz y cols., 2015; Laddha y cols., 2014;

Salinas-Santander y cols., 2012). Otras dos importantes asociaciones incluyen al gen de la proteína 1 de unión a X-box (XBP1), crucial en la UPR; y el de la tirosinasa (TYR), enzima responsable de la producción de melanina (Birlea y cols., 2011; Jin y cols., 2012).

Cabe señalar que las asociaciones mencionadas no han sido propiamente sustentadas en población mestiza. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los hallazgos se han reportado en poblaciones europea y china, con importantes contribuciones en poblaciones turca, norteamericana, india y egipcia (Aydingöz y cols., 2015; Birlea y cols., 2011; Laddha y cols., 2014; Mehaney y cols., 2014). En México sólo existen dos estudios de asociación genética con *PTPN22* y *TNF- α* , ambos en población de la región noreste, lo que sugiere una gran laguna del conocimiento (García-Melendez y cols., 2014; Salinas-Santander y cols., 2012).

Finalmente, el vitiligo también ha sido vinculado al gen del receptor de vitamina D y al de la catalasa que, dada la pertinencia del presente estudio, se describirán más a fondo en secciones posteriores al igual que la función de sus moléculas asociadas (vitamina D y catalasa). De la misma manera se describirán las funciones y asociaciones genéticas de la beta-defensina 1.

2.1. Beta-defensina 1

2.2.1. Biología

Los péptidos antimicrobianos (AMP) juegan un papel importante en la defensa inmunológica inicial del hospedero. Las defensinas constituyen una de las familias de AMP más importantes en la inmunidad innata que está compuesta por proteínas pequeñas (3-5 kDa), catiónicas y ricas en cisteína, caracterizadas por tres puentes disulfuro intramoleculares cuya arreglo

permite clasificarlas en alfa y beta defensinas (Pazgier y cols., 2007). Las alfa-defensinas humanas incluyen a los péptidos de neutrófilo humano (HNP) 1-4 y a las defensinas humanas (HD) 5 y 6 producidas por las células de Paneth intestinales mientras que las beta-defensinas (HBD) incluyen a cuatro miembros (HBD-1 a HBD-4) (Barnea y cols., 2008).

La primer beta-defensina descubierta, HBD-1, es el AMP de mayor importancia en la defensa contra infecciones a nivel epitelio (Prado-Montes de Oca, 2010). Su expresión es constitutiva en la mayoría de los epitelios humanos principalmente en piel, tracto urinario, respiratorio, reproductivo femenino, intestinal y epitelios oral y gingival; además, puede sobreexpresarse por acción de estímulos microbianos o inflamatorios (Polesello y cols., 2017; Prado-Montes de Oca, 2010; Yang y cols., 2007).

La principal función de la HBD-1 es la eliminación de microorganismos, siendo efectiva en contra de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, así como contra la levadura *Candida albicans*, aunque presenta baja efectividad contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (Pazgier y cols., 2007). También posee actividad en contra de *Mycobacterium tuberculosis* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), aunque para este último es menos potente comparada con la HBD-2 y HBD-3 (Prado-Montes de Oca, 2010).

Además de sus actividades antimicrobianas directas, la HBD-1 contribuye en la inducción de la respuesta inmune adaptativa ya que posee la capacidad, al igual que la HBD-2, de quimioatraer selectivamente a células dendríticas y a linfocitos T de memoria por medio de señalización por el receptor de quimiocina CCR6 (Barnea y cols., 2008; Yang y cols., 2007) (Figura 5). La señalización de HBD-1 con CCR6, aunado a la activación de los TLR,

contribuye adicionalmente a la maduración de la célula dendrítica, promoviendo la presentación de antígeno y la generación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores y, consecuentemente, la memoria inmunológica en contra del patógeno (Prado-Montes de Oca, 2010).

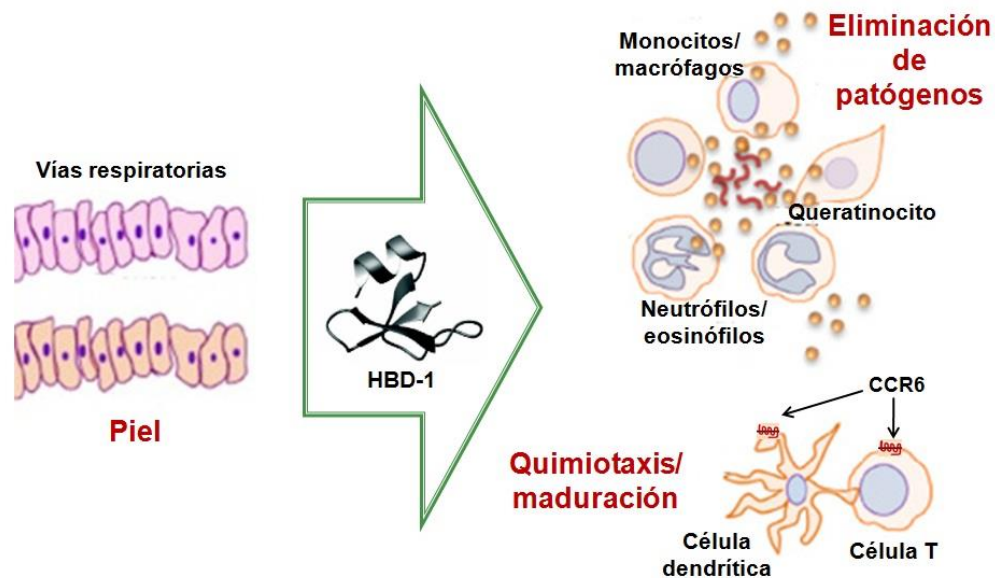


Figura 5. Función biológica de la beta-defensina 1 (HBD-1). La HBD-1 es un péptido antimicrobiano de amplio espectro sintetizado constitutivamente en piel y epitelios mucosos. La HBD-1 altera la integridad de la membrana de los patógenos eliminándolos de manera directa. Además, es quimioatrayente de leucocitos gracias a su señalización con el receptor 6 de quimiocina CC (CCR6) promoviendo la presentación de antígenos patogénicos y por tanto la generación de respuestas inmunológicas adaptivas. Modificada de Shin y Jo, 2011.

Considerando lo anterior, variaciones en la expresión de la HBD-1 a nivel de epitelio podrían predisponer al individuo a infecciones o a reacciones de hipersensibilidad como enfermedades autoinmunes o incluso atópicas, aspecto discutido más adelante (Kreuter y cols., 2011; Polesello y cols., 2017; Prado-Montes de Oca y cols., 2007).

2.2.2. Aspectos genéticos

El gen que codifica para la HBD-1, denominado *DEFB1*, se encuentra en el cromosoma 8p23.2-p23.1 y mide 7448 pares de bases (pb) (Prado-Montes de Oca, 2010). Posee una organización común en los genes de las HBD que consiste en dos exones separados por un intrón largo, pero en *DEFB1* el segmento de propéptido se encuentra en el exón 1 y no en el exón 2 como en el resto de las HBD (Pazgier y cols., 2007) (Figura 6).

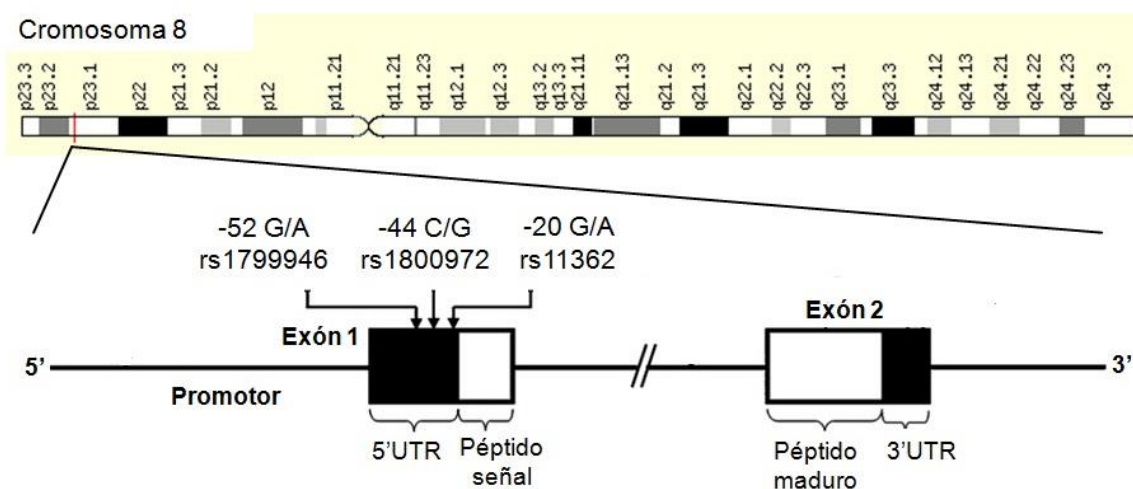


Figura 6. Mapa del gen de la beta-defensina 1 (*DEFB1*). Se muestra el locus y la organización del gen *DEFB1* así como la localización e identificación de los polimorfismos -52 G/A, -44 C/G y -20 G/A, de interés en el presente estudio. Modificada de Prado-Montes de Oca, 2010.

Diversos polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) han sido descritos para el gen *DEFB1*. Como aparece en la figura 6, la región no traducida (UTR) de 5' del gen posee tres sitios polimórficos denominados -52 G/A (rs1799946), -44 C/G (rs1800972) y -20 G/A (rs11362) que se han estudiado en relación a diversas enfermedades principalmente de etiopatogénesis infecciosa (Prado-Montes de Oca, 2010). Estos polimorfismos fueron inicialmente estudiados debido a que, por su posición en la UTR de 5', podrían estar relacionados con la expresión

diferencial del gen y/o la proteína. Dicha hipótesis fue posteriormente demostrada en estudios *in vitro* e *in silico*, en los que se observó que el -44 C/G incrementa directamente la expresión de HBD-1 e indirectamente la de HBD-3, a través de la alteración de la estructura secundaria del ARN mensajero (ARNm) de *DEFB1* y de un sitio de unión para el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Kalus y cols., 2009; Prado-Montes de Oca y cols., 2009). Por su parte, los polimorfismos -52 G/A y -20 G/A disminuyen la tasa de transcripción en un ~25% (Milanese y cols., 2007). Lo anterior fue recientemente confirmado para los SNP -52 G/A y -44 C/G en los niveles de HBD-1 en saliva, no así para el -20 G/A cuyo efecto funcional aun no está claro (Polesello y cols., 2017).

Con base en lo anterior, diversos estudios han asociado a los mencionados polimorfismos de *DEFB1* con grados variables de susceptibilidad a enfermedades infecciosas como VIH y lepra, y enfermedades inflamatorias como dermatitis atópica (Estrada-Aguirre y cols., 2014; Prado-Montes de Oca y cols., 2009 y 2010). Asimismo, los polimorfismos de *DEFB1* se han asociado con enfermedades autoinmunes en diversos tejidos, incluyendo piel, datos que se comentan a continuación.

2.2.3. Beta-defensina 1 y enfermedades autoinmunes

Como se mencionó anteriormente, los polimorfismos en la 5'UTR del gen *DEFB1* repercuten en su tasa transcripcional y la expresión de la proteína (HBD-1), promoviendo la respuesta inmune adaptativa. En este sentido, el aumento en la producción constitutiva de HBD-1 supondría un beneficio al individuo ante una infección pero aumentaría su predisposición a desarrollar una hipersensibilidad, particularmente una patología autoinmune.

Basados en la anterior premisa, diversos grupos científicos han investigado el papel de la HBD-1, así como de sus polimorfismos en relación a enfermedades autoinmunes. En el Cuadro 1 se muestran las principales investigaciones realizadas al respecto, destacando la ausencia de vitiligo. Lo anterior representa una de las principales motivaciones de la presente investigación.

Cuadro 1. Estudios de beta-defensina 1 (HBD-1) y los polimorfismos en la 5'UTR de su gen en enfermedades autoinmunes

Enfermedad	Marcador	Hallazgo principal	Referencia
Liquen plano oral	HBD-1	Mayores niveles en pacientes*	Polesello y cols., 2017
Diabetes tipo 1	-44 C/G	Genotipo CG, GG y alelo G asociados a protección	Németh y cols., 2014
Crohn	HBD-1 -20 G/A	Menores niveles en pacientes* Alelo G asociado a protección	Brauner y cols., 2014 Zanin y cols., 2012
Lupus	HBD-1 (ARNm) -52 G/A -44 C/G	Mayor expresión en pacientes* Genotipo AA y alelo A asociados a protección Heterocigoto asociado a riesgo	Kreuter y cols., 2011 Sandrin-Garcia y cols., 2012 Sandrin-Garcia y cols., 2012
	Haplotipos	GCA y GGG asociados a riesgo	Sandrin-Garcia y cols., 2012
Psoriasis	HBD-1 (ARNm)	Mayor expresión en pacientes*	Kreuter y cols., 2011

*Comparado con los valores de individuos sanos

2.3. Vitamina D y su receptor

2.3.1. Biología de la vitamina D

La vitamina D fue inicialmente caracterizada como vitamina en el siglo XX y actualmente es reconocida como una prohormona esteroidea que existe en dos isómeros principales: la

vitamina D₂ o ergocalciferol y la vitamina D₃ o colecalciferol (Gil y cols., 2018). Ambas difieren solamente en la estructura de su cadena lateral y en su fuente: la D₂ no se sintetiza en el cuerpo humano, generalmente se extrae de plantas y se añade a los productos alimenticios; mientras que la D₃ es sintetizada en piel humana y consumida en la dieta a través de la ingesta de alimentos de origen animal, principalmente aceite de pescado y yema de huevo (Colotta y cols., 2017; Gil y cols., 2018). A pesar de sus diferencias, la D₂ y D₃ comparten su función de prohormona y se someten a los mismos procesos metabólicos (Dirks y cols., 2018; Gil y cols., 2018).

La síntesis endógena ocurre a partir del 7-dehidrocolesterol disponible en piel que, al exponerse a luz UVB, se transforma en vitamina D₃ a través del isómero intermediario previtamina D₃, proceso sujeto a la duración y calidad de la radiación UVB así como a la biodisponibilidad de 7-dehidrocolesterol y las características de la piel (Gil y cols., 2018; Dirks y cols., 2018). La vitamina D₃ se une en circulación a la proteína de unión a vitamina D (DBP) y es transportada a hígado donde las hidrolasas citocromo p450, principalmente la Cyp2R1, la convierte en 25-hidroxivitamina D₃ (25D₃) (Dankers y cols., 2017). Subsecuentemente, la DBP transporta a la 25D₃ a riñón donde la 1 α -hidroxilasa Cyp27b1 la convierte en su metabolito activo, la 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25D₃) (Dankers y cols., 2017) (Figura 7).

La 1,25D₃ inicia su cascada de señalización al unirse con el receptor de vitamina D (VDR), un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción. La unión con su ligando induce un cambio conformacional en VDR generando la formación de dos superficies de interacción con proteína (Dankers y cols., 2017): una le sirve para mediar la unión con el receptor X retinoide (RXR) formando el heterodímero que facilita la unión a ADN en sitios específicos

denominados elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), localizados en la región promotora de sus genes blanco; y la otra para reclutar a los complejos correguladores que ejercerán la regulación positiva o negativa de la expresión de dichos genes (Figura 8).

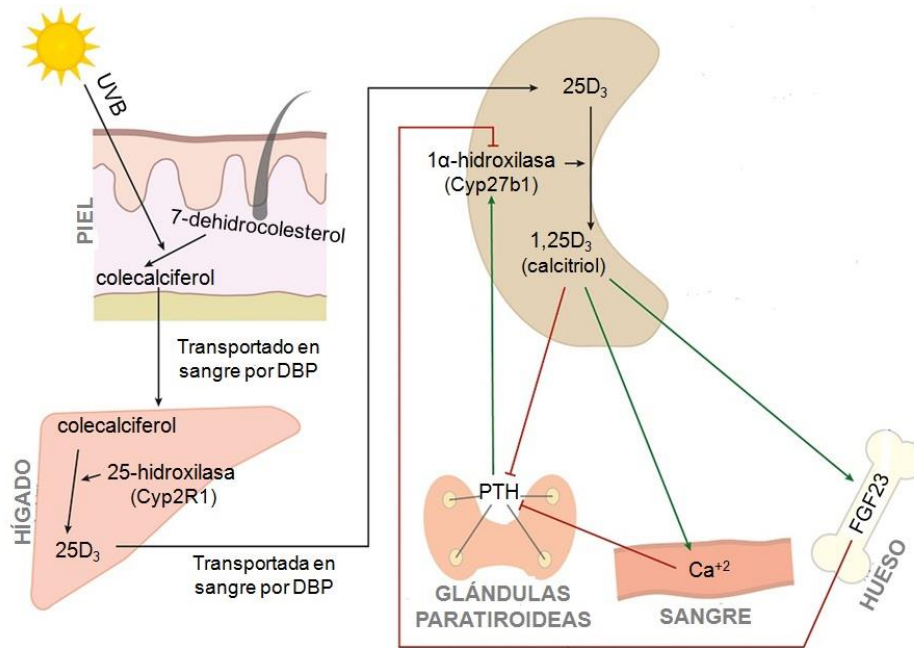


Figura 7. Metabolismo de la vitamina D. Las flechas rojas indican inhibición y las verdes inducción. UVB: luz ultravioleta B, Cyp2R1: Citocromo p450 2R1 ó vitamina D 25-hidroxilasa, Cyp27b1: Citocromo p450 27b1 ó 25-hidroxivitamina D₃ 1-alfa-hidroxilasa, PTH: hormona paratiroidea, FGF23: factor de crecimiento fibroblástico 23. Modificada de Dankers y cols., 2017.

La función mejor conocida de la vitamina D ocurre en el metabolismo óseo a través de la regulación de los niveles plasmáticos de calcio (Ca^{+2}) y de fosfatos, que también tienen repercusiones en la función neuromuscular, vasodilatación, transmisión nerviosa y función endócrina (Colotta y cols., 2017; Dankers y cols., 2017). Dicha regulación la ejerce promoviendo la absorción intestinal de Ca^{+2} y fosfatos, la formación y activación de osteoclastos, la supresión de la transcripción de calcitonina y hormona paratiroidea (PTH) y la

inducción de la reabsorción de calcio y excreción de fosfato en el riñón, esto último a través de la inducción de la expresión de factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) (Colotta y cols., 2017) (Figura 7). Así pues, los niveles bajos de vitamina D se asocian con disminución de los niveles de calcio que a su vez activa la producción de PTH (hipertiroidismo secundario), resultando en hipofosfatemia y pérdida de masa ósea, y que de prolongarse puede conducir a raquitismo u osteomalacia en niños y adultos, respectivamente (Colotta y cols., 2017; Dankers y cols., 2017).

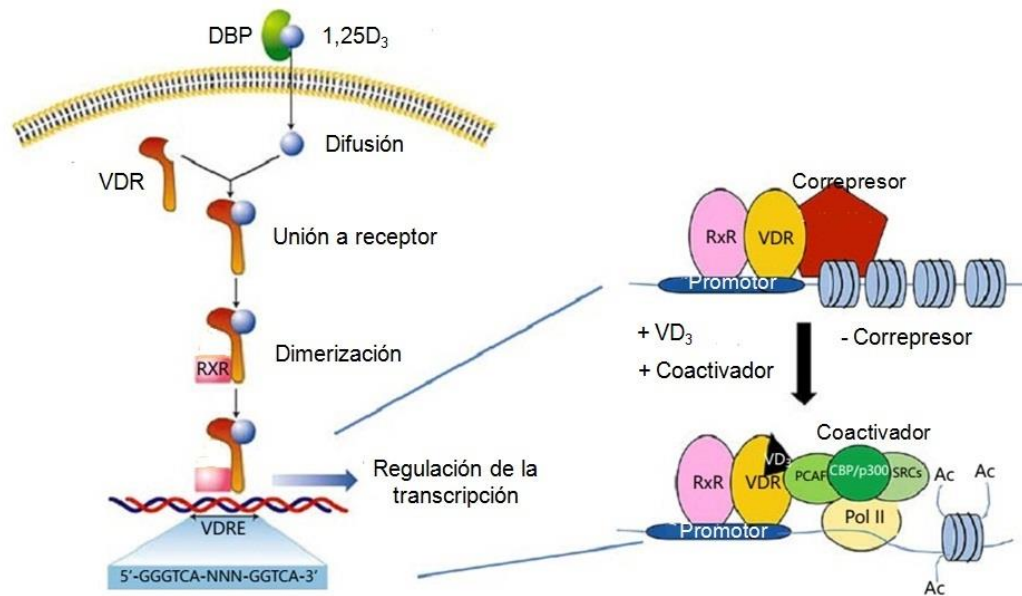


Figura 8. Mecanismo molecular de acción de la vitamina D. La vitamina D se une a su receptor (VDR) para luego dimerizar con el receptor X retinoide (RXR), complejo que se une a los elementos de respuesta a vitamina D (VDRE) para promover la transcripción de sus genes blanco. Modificada de Gil y cols., 2018.

El estado de la vitamina D generalmente se evalúa mediante la medición de la 25D₃ en suero debido a su mayor estabilidad y mayor concentración que facilitan su medición (Dirks y cols., 2018). En este sentido, la Sociedad Endócrina (Washington, Estado Unidos) define el estado

de vitamina D de la siguiente manera: óptimo = 40-60 ng/ml; recomendado = 30-40 ng/ml; suficiente = 20-30 ng/ml y deficiente < 20 ng/ml (Dirks y cols., 2018).

2.3.2. Efectos de la vitamina D sobre el sistema inmune

Además de los efectos en el metabolismo óseo, la vitamina D ejerce un papel importante en la modulación de la respuesta inmunitaria. Esto es posible debido a que virtualmente todas las células del sistema inmunológico expresan VDR y muchas de ellas son capaces de sintetizar $1,25D_3$ pues expresan actividad basal de la enzima Cyp450b1, que se sobrerregula por agentes proinflamatorios como lipopolisacáridos bacterianos, $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ (Gil y cols., 2018). En este sentido, los efectos inmunomoduladores de la vitamina D se pueden clasificar en dos: la estimulación de la respuesta inmune innata y la inhibición de la respuesta adaptativa.

Estimulación de la respuesta innata. La ejerce a través de sus efectos en macrófagos de los cuales promueve su diferenciación a partir de monocitos (Gil y cols., 2018). Además, la activación del macrófago vía TLR o $IFN-\gamma$ estimula la expresión de Cyp450b1 potenciando la conversión de la $25D_3$ en $1,25D_3$, que a su vez promueve la producción de catelicidina (Figura 9), un AMP de gran importancia en la defensa del hospedero ante patógenos invasores y cuyo espectro incluye bacterias Gram positivas, *Mycobacterium tuberculosis* e incluso virus (Hewison, 2010). Lo anterior, aunado a la inducción de $IL-1\beta$, constituye el mecanismo principal mediante el cual la $1,25D_3$ promueve la eliminación efectiva de los patógenos (Dankers y cols., 2017). Sin embargo, la $1,25D_3$ también genera el fenotipo antiinflamatorio del macrófago al disminuir la producción de $IL-6$, $TNF-\alpha$, $COX-2$ y óxido nítrico e incrementar la de $IL-10$, por lo que las funciones de la vitamina D parecen promover el

balance entre reacciones pro y antiinflamatorias que resulta de interés en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Dankers y cols., 2017).

Inhibición de la inmunidad adaptativa. Es ejercida principalmente a través del efecto de $1,25D_3$ sobre células dendríticas, consideradas el nexo entre la inmunidad innata y adaptativa por ser las únicas capaces de presentar antígeno a linfocitos T vírgenes. La $1,25D_3$ suprime la maduración de estas células y promueve un fenotipo tolerogénico, caracterizado por disminución de factores proinflamatorios como IL-12 e TNF- α e incremento de antiinflamatorios como IL-10 (Penna y Adorini, 2000) (Figura 9). Las células dendríticas tolerogénicas son poco capaces de inducir células Th1 y Th17, mientras que si inducen diferenciación de Tregs, además de que promueven la apoptosis de células T autorreactivas (Colotta y cols., 2017; Dankers y cols., 2017).

Además del anterior efecto, la vitamina D puede afectar directamente a linfocitos T y B considerando que también expresan al VDR. Al respecto, la $1,25D_3$ promueve la aparición de Tregs mientras que inhibe la diferenciación y proliferación de las poblaciones linfocíticas proinflamatorias $CD4^+$ Th1 y Th17 y de CTL $CD8^+$, además de que disminuye la producción de IFN- γ , IL-17 e IL-2 (Colotta y cols., 2017; Hayes y cols., 2015). Asimismo, inhibe la diferenciación del linfocito B, efector y de memoria, a célula plasmática (Hewison, 2010) (Figura 9).

Los anteriormente mencionados efectos sobre la homeostasis de la respuesta inmune, aunado a los prometedores resultados en modelos animales de autoinmunidad, han dado pie a la realización de diversos estudios clínicos de intervención utilizando suplementos o análogos de vitamina D para tratar patologías autoinmunes (Hewison, 2010). Actualmente, el uso de

vitamina D sólo se limita al tratamiento tópico de la psoriasis, con alta tasa de éxito en su mejora clínica, mientras que su uso sistémico para otras enfermedades aún se encuentran bajo investigación (Dankers y cols., 2017).

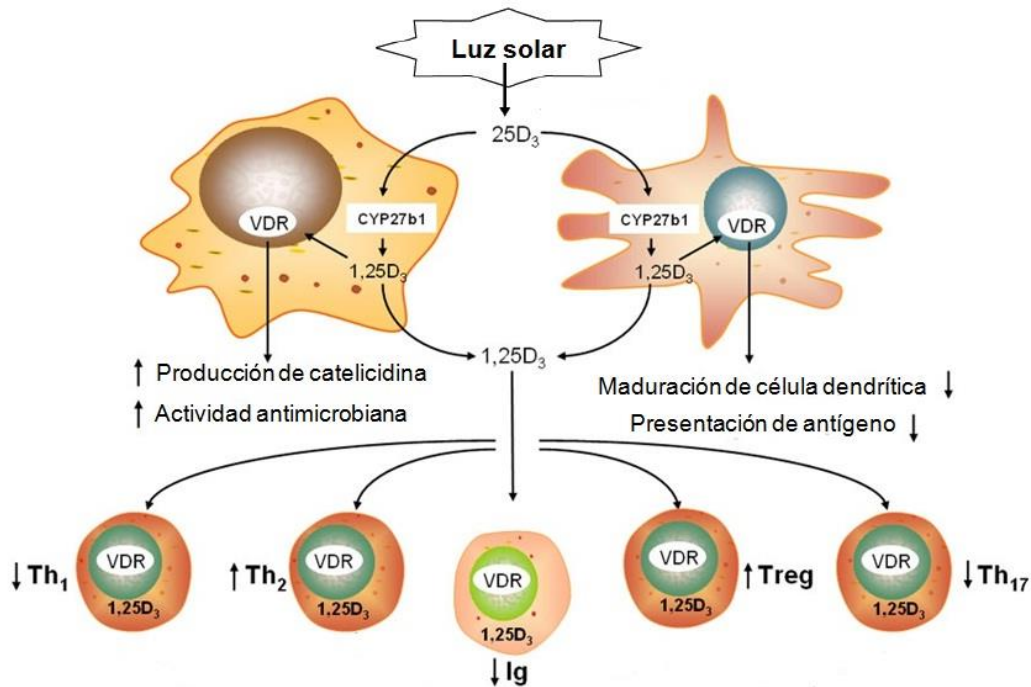


Figura 9. Funciones inmunorreguladoras de la vitamina D y su receptor. Los macrófagos y las células dendríticas poseen la enzima Cyp27b1 y el receptor de vitamina D (VDR) que les permiten utilizar la vitamina D para producir catelicidina, promoviendo la actividad antimicrobiana y la inhibición de la maduración de la célula dendrítica, bloqueando la presentación antigénica, lo que a su vez inhibe la aparición de subpoblaciones linfocíticas Th1 y Th17 y promueve la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg). Cyp27b1: Citocromo p450 27b1 ó 25-hidroxivitamina D₃ 1-alfa-hidroxilasa, Ig: inmunoglobulina. Modificada de Hewison, 2010.

2.3.3. Aspectos genéticos (VDR)

El gen *VDR* se localiza en el cromosoma 12q13.11, mide ~75,000 pb y está organizado en 15 exones, de los cuales 8 (II-IX) son traducibles mientras que el resto representan regiones

5'UTR intercambiables (IA-IG) que promueven su funcionalidad en tejidos específicos (Li y cols., 2012). Entre los diversos SNP descritos para el gen *VDR* destacan los localizados hacia el extremo 3', particularmente los sitios polimórficos para *BsmI* (rs1544410) y *ApaI* (7975232) ubicados en el mismo intrón y la mutación silenciosa dentro del codón 352 del exón 9 para *TaqI* (rs731236) (Li y cols., 2012) (Figura 10).

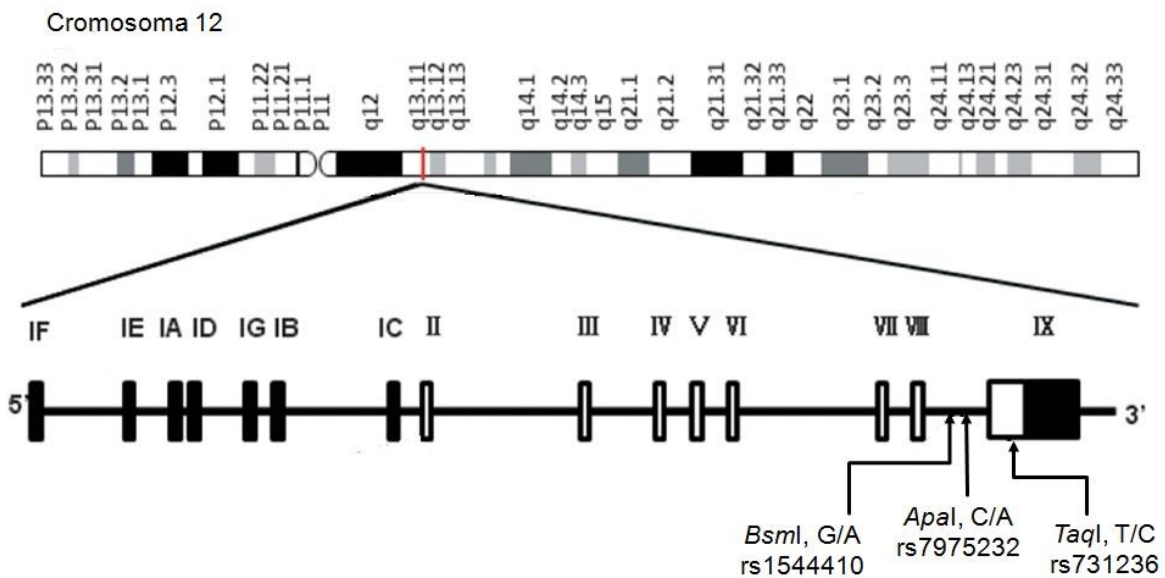


Figura 10. Mapa del gen del receptor de vitamina D (*VDR*). Se muestra el locus y la organización del gen *VDR* así como la localización, identificación y cambio nucleotídico de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*, de interés en el presente estudio. Modificada de Li y cols., 2012.

Debido a su localización, los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* no generan cambios en la secuencia aminoacídica del VDR. A pesar de lo anterior, se han asociado a diversas patologías tales como cáncer, diabetes mellitus y enfermedades autoinmunes como psoriasis, artritis reumatoide y diabetes tipo 1 (Aydingöz y cols., 2012; Dankers y cols., 2017; Li y cols., 2012; Shafia y cols., 2013). Estas asociaciones podría estar vinculadas al efecto sobre los niveles de vitamina D circulantes ejercido particularmente por *ApaI* (Sobeih y cols., 2016), ya que se

sabe que los tres polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento; aunque también podrían atribuirse a la relación de los haplotipos *BsmI-ApaI-TaqI* con variaciones en la longitud de la cola poliadenilada que afecta la estabilidad del ARNm de VDR (Uitterlinden y cols., 2004).

2.3.4. Vitamina D y VDR en vitiligo

Existe consenso de que la insuficiencia de vitamina D está relacionada a diversas enfermedades autoinmunes, aunque aun no hay evidencia de un efecto causal (Colotta y cols., 2017). Este consenso aplica también para vitiligo. Similarmente, los polimorfismos del gen que codifica el VDR han sido identificados como factores de susceptibilidad para el desarrollo de vitiligo. No obstante, para el anterior punto, la evidencia científica es limitada en número así como en variedad de poblaciones analizadas, aunado al hecho que reportan hallazgos distintos (ver Cuadro 2). Lo anterior constituye una laguna importante del conocimiento considerando la alta variabilidad interétnica de los polimorfismos genéticos del VDR y reitera la importancia de replicar estos estudios en otras poblaciones (Uitterlinden y cols., 2004).

En el cuadro 2 se resumen los hallazgos de diversos estudios de asociación de la vitamina D y los polimorfismos en el gen de su receptor con vitiligo.

2.4. Catalasa

2.4.1. Biología y bioquímica

La catalasa es una importante enzima antioxidante endógena que descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, protegiendo a la célula de daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (Casp y cols., 2002). Pertenece al grupo de catalasas monofuncionales que

contienen grupo hemo y es primariamente una enzima intracelular cuyas mayores concentraciones se encuentran en eritrocitos e hígado donde, al igual que en otros tejidos, predomina en los peroxisomas (Kodydková y cols., 2014).

Cuadro 2. Estudios de vitamina D y de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* del gen *VDR* en vitiligo

Marcador	Hallazgo principal	Referencia
<i>BsmI</i>	Genotipo AA asociado a protección	Li y cols., 2012
<i>ApaI</i>	Genotipo CC asociado a riesgo y AA asociado a niveles mayores de vitamina D	Sobeih y cols., 2016
	Genotipo AA asociado a protección y a niveles mayores de vitamina D	Li y cols., 2012
	Genotipo CC asociado a riesgo	Birlea y cols., 2006
<i>TaqI</i>	Genotipo CC asociado a riesgo	Sobeih y cols., 2016
	Genotipo CC asociado a protección	Li y cols., 2012
	Genotipo CC asociado a riesgo	Aydingöz y cols., 2012
Haplotipos	GAT asociado a protección	Aydingöz y cols., 2012
VDR	Disminución de su ARNm en pacientes	Doss y cols., 2015
Vitamina D	Niveles disminuidos en pacientes*	Ibrahim y cols., 2018
		Sobeih y cols., 2016
		Doss y cols., 2015
		Saleh y cols., 2013
		Li y cols., 2012

*Comparado con los valores de individuos sanos

La catalasa es una proteína tetramérica de 244 kDa con cuatro subunidades idénticas de 59.7 kDa cada una, y está compuesta de 527 aminoácidos, un grupo hemo y una molécula de NADPH que protege a la enzima de la inactivación por H₂O₂ (Kodydková y cols., 2014). Es considerada la enzima más eficiente ya que puede descomponer millones de moléculas (~10⁷) de H₂O₂ por segundo en oxígeno molecular y agua sin producir radicales libres (Goyal y

Basak, 2010). El proceso es realizado en dos pasos: primero la catalasa en su forma nativa Fe^{+3} reacciona con una molécula de H_2O_2 formando agua y oxidando el grupo hemo de la catalasa a Fe^{+4} que reacciona con una segunda molécula de H_2O_2 formando una segunda molécula de agua, oxígeno molecular y regresando a su forma inicial (Fe^{+3}) (Bauer, 2012) (Figura 11).

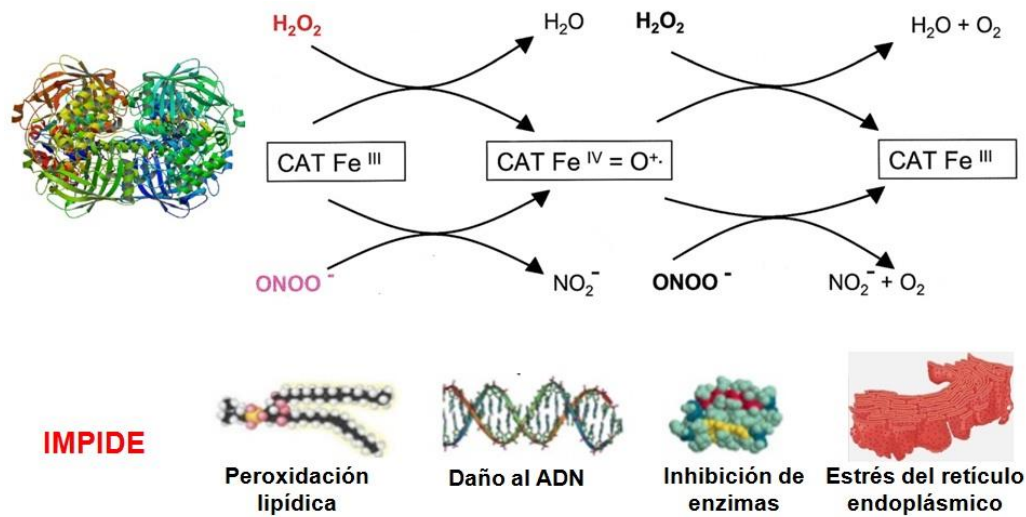


Figura 11. Funciones bioquímica y biológica de la catalasa. La catalasa desdobra principalmente al H_2O_2 en agua y oxígeno en dos reacciones sucesivas catalizadas por un grupo hemo, pero también puede descomponer otros compuestos peroxidados como el peroxinitrito (ONOO^-). Su actividad impide la acumulación de dichos radicales y por ende protege del estrés oxidativo y sus repercusiones. Modificada de Bauer, 2012.

Además de la catálisis de H_2O_2 , la catalasa también puede detoxificar especies reactivas de nitrógeno, particularmente el peroxinitrito (ONOO^-), y posee función de peroxidasa de alcoholes alifáticos de cadena corta como metanol y etanol que convierte en formaldehído y acetaldehído (Kodydková y cols., 2014).

Dado que la producción de radicales peroxidados como H_2O_2 y ONOO^- es un mecanismo inherente del metabolismo celular causado por la fosforilación oxidativa y/o el estallido respiratorio, las funciones de la catalasa son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que estos radicales están vinculados con diversos procesos patofisiológicos (p.ej. inflamación vascular, disfunción endotelial) (Goyal y Basak, 2010). Sin embargo, se sabe que a concentraciones bajas, el H_2O_2 es degradado por otras familias de peroxidasas como las glutatión peroxidasas y las peroxirredoxinas (Kodydková y cols., 2014). El rol de la catalasa se torna crucial sólo cuando los niveles de H_2O_2 son elevados, específicamente ante lesiones promotoras de estrés oxidativo, donde la ausencia de la enzima genera daños en función al tejido involucrado (Ho y cols., 2004; Zuo y cols., 2015). Así pues, la catalasa podría considerarse como una de las principales protectoras de la célula ante estrés oxidativo mediado por elevación de H_2O_2 y sus consecuencias tales como pérdida de la integridad de membranas por peroxidación lipídica, daño oxidativo al ADN, inhibición de enzimas y estrés de retículo endoplásmico debido al desbalance redox necesario para el plegamiento de proteínas (Zuo y cols., 2015) (Figura 11).

Variaciones en la actividad de la catalasa están relacionadas a diversas enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, síndrome metabólico e hipertensión; psiquiátricas como esquizofrenia y depresión (Kodydková y cols., 2014); y autoinmunes como enfermedad de Graves, lupus, DT1 y vitiligo, lo cual se discutirá en próximos apartados (Srivastava y cols., 2017). Además, la catalasa posee un rol importante en la proliferación celular, fertilidad de los espermatozoides y su expresión está relacionada con el desarrollo de resistencia al tratamiento en células tumorales (Bauer, 2012; Goyal y Basak, 2010). Finalmente, la ausencia de catalasa

o acatalasemia, se caracteriza por infecciones orales recurrentes, úlceras bucales y gangrena, recalando la importancia fisiológica de la enzima (Kodydková y cols., 2014).

2.4.2. Aspectos genéticos

El gen de la catalasa humana, *CAT*, se encuentra en el cromosoma 11p13, mide 34,000 pb y consiste de 13 exones divididos por 12 intrones, con una región codificante de 1581 pb (Bulut y cols., 2011; Kodydková y cols., 2014) (Figura 12). Se ha reportado que las variaciones genéticas del gen *CAT* podrían jugar un rol en desórdenes de la glucosa y ser factores de riesgo para enfermedades metabólicas como tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemia y osteoporosis así como sus comorbilidades (Kodydková y cols., 2014).

Los SNP localizados en el promotor pueden influenciar las tasas de transcripción, resultando en baja expresión de la catalasa, efecto que ha sido reportado en diversas poblaciones para el SNP en la posición -89 A/T (rs7943316), mismo que ha sido relacionado a enfermedades como osteonecrosis de cabeza de fémur y asma (Kim y cols., 2008; Polonikov 2009). Además de los SNP en el promotor, se han descrito polimorfismos intrónicos y exónicos en el gen *CAT*. Dentro de la segunda categoría, existen dos sustituciones silenciosas que han sido previamente reportadas. Una de ellas es el polimorfismo en el residuo Asp-389 (389 C/T, rs769217) en el exón 9 asociado a densidad mineral ósea, osteonecrosis y DT1 (Oh y cols., 2007; Kim y cols., 2008; Tarnai y cols., 2007); la otra, el SNP en el residuo Leu-419 (419 C/T, rs11032709) cuya frecuencia varía entre poblaciones aunque solamente se ha estudiado en relación con vitiligo sin reporte de asociación (Casp y cols., 2002; Gavalas y cols., 2006; Liu y

cols., 2010). La ubicación de los mencionados polimorfismos en el gen *CAT* puede apreciarse en la Figura 12.

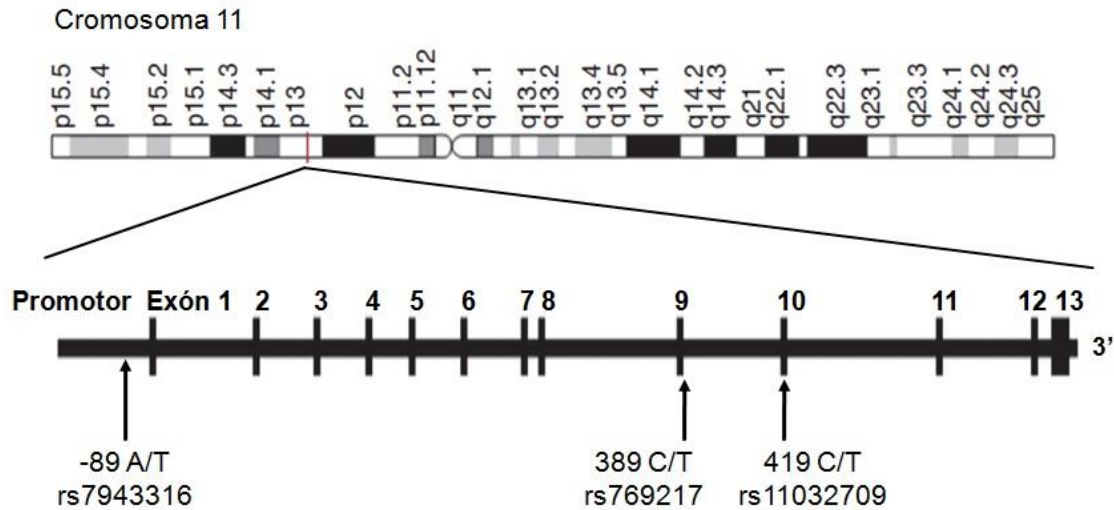


Figura 12. Mapa del gen de la catalasa (*CAT*). Se muestra el locus y la organización del gen *CAT* así como la localización e identificación de los polimorfismos -89 A/T, 389 C/T y 419 C/T, de interés en el presente estudio. Modificada de Liu y cols., 2010.

2.4.3. Catalasa en vitiligo

Hace más de dos décadas, Schallreuter y cols. (1991) describieron la disminución de la actividad enzimática de la catalasa en piel de pacientes con vitiligo. A partir de dicho reporte, la catalasa ha sido ampliamente estudiada en busca de su vínculo con vitiligo. Debido a que la enzima es susceptible de sufrir inhibición por su sustrato (H_2O_2), la disminución de la actividad de catalasa en piel de pacientes con vitiligo podría ser una consecuencia de la enfermedad y no su causa (Schallreuter y cols., 1991). Con el fin de dilucidar el efecto causal de la catalasa en vitiligo, se investigó el papel de polimorfismos en su gen obteniendo evidencia preliminar de su asociación con la enfermedad, hallazgo que a su vez dio pie a numerosas investigaciones al respecto (Casp y cols., 2002).

Los reportes de asociación de la catalasa y/o sus polimorfismos genéticos con vitiligo se muestran en el Cuadro 3, incluyendo el hallazgo principal de cada investigación. Cabe señalar que dicho cuadro sólo incluye los reportes de los marcadores pertinentes al presente trabajo, esto es, el -89 A/T y el 389 C/T. Debido a que no se ha reportado asociación con el 419 C/T, este no fue incluido en la lista. Es importante mencionar que estos polimorfismos, así como la actividad de catalasa, no han sido explorados en población latinoamericana, por lo que el presente trabajo aporta información importante para la epidemiología genética del vitiligo en etnia mestiza mexicana.

Cuadro 3. Estudios de catalasa y de sus polimorfismos genéticos en vitiligo

Marcador	Hallazgo principal	Referencia
-89 A/T	Alelo T y genotipo TT asociados a riesgo, TT disminuye expresión del gen <i>CAT</i> y actividad de catalasa	Mansuri y cols., 2017
	Genotipo TT asociado a riesgo	Caputo y cols., 2017
	Alelo T y genotipo AT asociados a riesgo y a disminución de actividad de catalasa	Liu y cols., 2010
389 C/T	Genotipo CT asociado a riesgo	Gavalas y cols., 2006
	Genotipo CT asociado a riesgo y TT a protección	Casp y cols., 2002
Haplotipos	TC y TT asociados a riesgo	Liu y cols., 2010
	AC y TT asociados a riesgo, AT a protección	Park y cols., 2006
Catalasa	Menor actividad en pacientes ^a	Mansuri y cols., 2017 Liu y cols., 2010 Dammak y cols., 2009 Svarani y cols., 2009 Arican y Kurutas, 2008 Schallreuter y cols., 1991
	Menor expresión génica en pacientes ^a	Mansuri y cols., 2017
	Menor actividad en vitiligo generalizado ^b	Mansuri y cols., 2017
	Menor actividad en vitiligo activo ^c	Dammak y cols., 2009

^aComparado con los valores de individuos sanos

^bComparado con los valores de pacientes con vitiligo localizado

^cComparado con los valores de pacientes con vitiligo estable

3. JUSTIFICACIÓN

El vitiligo conduce a un deterioro psicosocial que en algunas personas puede llegar a ser grave dado que se afectan las relaciones sociales, familiares y laborales, principalmente en aquellos pacientes con involucramiento facial. A lo anterior se le puede sumar el fracaso terapéutico en la mayoría de los pacientes.

El vitiligo es un desorden poligénico y multifactorial. Sin embargo, los genes responsables de la susceptibilidad al padecimiento varían en las diferentes poblaciones y los detonantes ambientales no se conocen con certeza. Por tal motivo, se requiere de identificar dichos factores predisponentes y detonantes como parte de la generación de conocimiento básico de la enfermedad, abriendo la posibilidad de la identificación de nuevos blancos terapéuticos lo cual desembocará en un mejor manejo clínico de la misma.

Si bien se han identificado diversos genes relacionados a vitiligo, aún existen vacíos en este campo con respecto a los genes y las poblaciones analizadas. En relación al presente estudio, tenemos que actualmente no existen reportes disponibles sobre el posible papel de la beta-defensina 1 en relación a susceptibilidad y/o resistencia al vitiligo y para vitamina D y catalasa existen pero han sido realizados en grupos étnicos distintos al nuestro. Por tal motivo nos proponemos determinar la posible asociación entre las variaciones de los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* así como de los niveles séricos de beta-defensina 1, vitamina D y actividad de catalasa con vitiligo *per se* o con sus características clínicas en pacientes originarios del noroeste de México. Todo esto con la finalidad de sentar las bases del estudio de la susceptibilidad genética a vitiligo en aras de identificar marcadores moleculares pronósticos de la aparición de la enfermedad y/o del desarrollo de sus manifestaciones clínicas.

4. HIPÓTESIS

Los polimorfismos en los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* y los niveles de beta-defensina 1 y vitamina D y actividad de catalasa están asociadas con la susceptibilidad a vitiligo y a sus características clínicas en población mexicana.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Asociar a los polimorfismos en los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* y los niveles de beta-defensina 1, vitamina D y actividad de catalasa con vitiligo en pacientes mexicanos.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar la asociación de los polimorfismos -52 G/A, -44 C/G y -20 G/A del gen *DEFB1*; *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* del gen *VDR* y -89 A/T, 389 C/T y 419 C/T del gen *CAT* con el riesgo/protección a vitiligo.
- Relacionar los polimorfismos de los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* con las características clínicas del vitiligo (género, historia familiar, edad de inicio, tipo clínico, actividad y presencia de fenómeno de comorbilidades autoinmunes y/o fenómeno de Koebner).
- Analizar la relación de los niveles de beta-defensina 1, vitamina D y catalasa con vitiligo.
- Establecer la asociación de los niveles de beta-defensina 1, vitamina D y catalasa con las características clínicas del vitiligo.
- Evaluar el efecto de los polimorfismos de los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT* en los niveles de beta-defensina 1, vitamina D y catalasa, respectivamente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño de estudio

6.1.1. Tipo de estudio

El presente es un estudio de casos y controles pareado, comparativo y transversal realizado en el Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán (HGC), Servicios de Salud Sinaloa y en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa durante el período de Agosto 2014 a Julio 2018, previa aprobación del Comité de Ética Médica en Investigación del HGC.

6.1.2. Sujetos de estudio

El grupo de casos incluyó 173 pacientes diagnosticados clínicamente con vitiligo no segmentario por médicos dermatólogos de diversas instituciones de salud de acuerdo a la clasificación de la Conferencia Global sobre Vitiligo, celebrada en Burdeos, Francia en 2011 (Ezzedine et al., 2012). Los 184 individuos control sin vitiligo fueron obtenidos de población general y fueron pareados a los casos por edad (± 5 años) y género.

A través de un cuestionario, de cada paciente se recabó información sobre aspectos clínicos del vitiligo (edad de aparición, actividad del vitiligo, tipo clínico, comorbilidades) y hereditarios (antecedentes familiares). Adicionalmente, se obtuvo carta de consentimiento informado de todos los participantes. En el caso de pacientes pediátricos, se solicitó su asentimiento previa explicación del proyecto y la firma del consentimiento por parte de los

padres o tutores. El formato de consentimiento informado y cuestionario puede consultarse en el anexo 12.1.

6.1.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Para pacientes:

- **Inclusión:** Individuos diagnosticados clínicamente con vitiligo no segmentario originarios del noroeste de México (Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango y Sinaloa) cuyos padres y abuelos fuesen también originarios de la misma región. Para la realización de las pruebas séricas sólo se consideraron pacientes de 18 a 45 años de edad con el fin de minimizar variaciones relacionadas a procesos de la edad tales como menopausia o senilidad.
- **Exclusión:** Individuos con vitiligo no segmentario emparentados con pacientes ya reclutados, individuos sin diagnóstico clínico definitivo. Para la realización de pruebas séricas: pacientes bajo tratamiento farmacológico en los últimos dos meses.
- **Eliminación:** Muestras no adecuadas para su análisis (suero turbio, sangre hemolizada, ADN de calidad insuficiente).

Para controles:

- **Inclusión:** Individuos sanos, originarios del noroeste de México y con padres y abuelos originarios de la misma región. Para la realización pruebas séricas sólo se consideraron individuos de 18 a 45 años de edad.
- **Exclusión:** Individuos que padecían enfermedades autoinmunes y/o tiroideas, individuos con antecedente familiar de vitiligo o emparentados con otros sujetos

controles previamente captados. Para la realización de pruebas séricas: individuos bajo tratamiento farmacológico en los últimos dos meses.

- **Eliminación:** Muestras no adecuadas para su análisis (suero turbio, sangre hemolizada, ADN de calidad insuficiente).

6.2. Análisis

6.2.1. Análisis genéticos

De los individuos de estudio, se recolectaron 4 mL de sangre periférica tomada por punción venosa, en un tubo con EDTA tripotásico como anticoagulante, de donde se obtuvo el material genético (ADN), mediante el método DTAB-CTAB previamente descrito (Gustincich et al, 1991).

Los polimorfismos fueron genotipificados mediante la metodología Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (PCR-RFLP), que consiste en digestión del producto obtenido de PCR con enzimas de restricción. La información detallada para el análisis de cada polimorfismo puede apreciarse en el Cuadro 4. La identificación de los genotipos de los polimorfismos en *DEFB1*, *VDR* y *CAT* se realizó como se muestra en la Figura 13.

6.2.2. Análisis séricos

Se recolectaron 6 mL de sangre periférica en tubos sin anticoagulante y se permitió que coagulara por 1 hora a temperatura ambiente. El suero fue separado tras centrifugar los tubos a 3500 revoluciones por minuto (rpm) por 20 minutos y almacenado a -70°C hasta su uso.

Los niveles de HBD-1 se midieron en 80 individuos, 40 pacientes y 40 controles, por la técnica de ELISA sándwich utilizando el kit HBD-1 ELISA kit LS-F549 de LifeSpan Biosciences Inc. (Washington, EU). Los niveles de vitamina D se analizaron en 70 individuos, 35 pacientes y 35 controles, mediante ELISA competitivo con el kit Vitamin D ELISA kit 501050 de Cayman Chemical (Minnesota, EU). La actividad de catalasa se determinó en 78 individuos, 39 pacientes y 39 controles, a través de la conversión de metanol en formaldehído en presencia de H₂O₂ con el kit Catalase Assay kit 707002 de Cayman Chemical (Minnesota, EU). En todos los casos se siguieron las instrucciones del proveedor.

Cuadro 4. Condiciones para el análisis por PCR-RFLP de los genes *DEFB1*, *VDR* y *CAT*

Marcador	Secuencia de primers (5' - 3')	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)	Enzima de restricción	Ref.
<i>DEFB1</i>	F- AGCCTCTGGAAGCCTCTGT R- ACTCACATCAGCCCCATTGT	63	214	<i>NlaIV</i> , <i>BsmAI</i> , <i>BstNI</i> *	Estrada- Aguirre <i>et al.</i> , 2014
<i>BsmI VDR</i>	F- ACCTGGCCATTGTCTCTCAC R- CTAACCAGCGGAAGAGGTCA	60	600	<i>BsmI</i>	Shafia <i>et al.</i> , 2013
<i>ApaI, TaqI VDR</i>	F- CAGAGCATGGACAGGGAGCAA R- CACTTCGAGCACAAGGGGCG- TTAGC	68.5	490	<i>ApaI</i> , <i>TaqI</i>	Li <i>et al.</i> , 2012
-89 A/T <i>CAT</i>	F- AATCAGAAGGCAGTCCTCCC R- TCGGGGAGCACAGAGTGTAC	66	237	<i>HinfI</i>	
389 C/T <i>CAT</i>	F- GCCGCCTTTTTGCCTATCCT R- TCCCGCCCATCTGCTCCAC	69.5	202	<i>BstXI</i>	Liu <i>et al.</i> , 2010
419 C/T <i>CAT</i>	F- CCTAAGTGCATCTGGGTGGT R- TACATCAGACAGTTGGGGCA	60.5	264	<i>BstNI</i>	

*Para identificar a los polimorfismos -52 G/A, -44 C/G y -20 G/A, respectivamente. T_m: temperatura de alineación

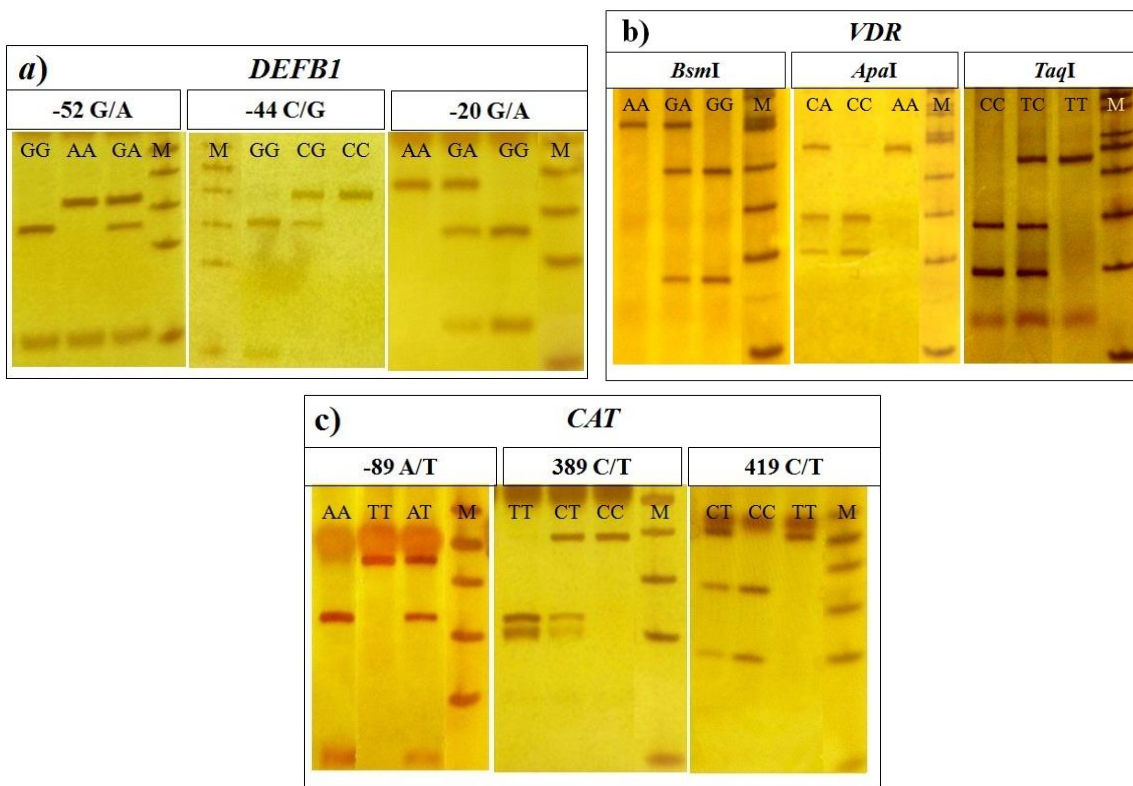


Figura 13. Identificación de los genotipos. Se muestra los geles de poliacrilamida teñido con plata con cada uno de los genotipos de los polimorfismos de los genes *DEFBI* (a), *VDR* (b) y *CAT* (c). M: marcador de tamaño molecular (50 pb para *DEFBI* y *CAT*, 100 pb para *VDR*).

6.2.3. Análisis estadístico

Para determinar si la distribución de los genotipos de cada polimorfismo se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) se empleó el programa DeFinetti (disponible en línea: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Las frecuencias haplotípicas y análisis de ligamiento se calcularon utilizando el software SNPStats (disponible en línea: <https://www.snpstats.net/start.htm>).

Para determinar la relación de los polimorfismos con la enfermedad (vitiligo) se realizó una regresión logística condicional para obtener la razón de momios e intervalos de confianza 95%

ajustados para edad y género. Cabe señalar que en 11 pacientes el apareamiento se realizó 1:2, caso:control. La comparación de las mediciones séricas entre casos y controles (apareamiento 1:1) se realizó mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Por otro lado, la asociación de los polimorfismos y las mediciones séricas con las características clínicas de vitiligo fueron determinadas mediante regresión logística y prueba U de Mann-Whitney, respectivamente. Ésta última y la prueba de Kruskal-Wallis se utilizaron para determinar el efecto de los polimorfismos sobre las mediciones séricas en el caso de dos o más comparaciones, respectivamente.

Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico SPSS 20. En todos los casos, valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El resumen de la metodología del proyecto puede apreciarse en la Figura 14.

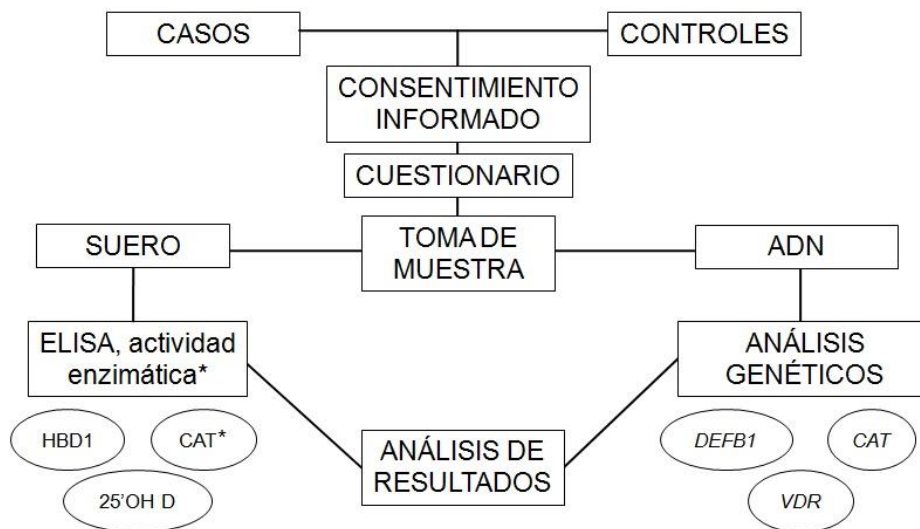


Figura 14. Esquema metodológico general. Se muestran las actividades llevadas a cabo para la realización del presente proyecto de investigación.

7. RESULTADOS

7.1. Características de los sujetos de estudio

La presente investigación incluyó un total de 357 individuos, de los cuales 173 fueron pacientes con vitiligo (92 mujeres, 81 hombres) y 184 controles (92 mujeres, 92 hombres). Las características clínicas y demográficas de mayor relevancia de los pacientes se pueden apreciar en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes con vitiligo incluidos en la presente investigación

Característica	Total n=173 (%)
Género	
Hombre	81 (46.8)
Mujer	92 (53.2)
Tipo de inicio	
Temprano (<20 años de edad)	74 (42.8)
Tardío (\geq 20 años de edad)	99 (57.2)
Tipo clínico	
Focal (bilateral)	8 (4.6)
Acrofacial	16 (9.3)
Generalizado	135 (78)
Universal	14 (8.1)
Actividad del vitiligo*	
Activo (<1 año)	99 (57.2)
Estable (\geq 1 año)	74 (42.8)
Historia familiar de vitiligo**	99 (57.2)
Comorbilidad autoinmune	17 (9.8)
Fenómeno de Koebner	35 (20.2)

*Progresión de la enfermedad

**Con familiares de 1^{er}, 2^{do} y/o 3^{er} grado afectados

7.2. Hallazgos para beta-defensina 1 y su gen *DEFB1*

7.2.1. Polimorfismos en *DEFB1* y susceptibilidad a vitiligo

Para el análisis del gen *DEFB1* se descartaron tres individuos, 2 pacientes y 1 control, obteniendo un total de 171 y 183 (354 individuos), respectivamente. Dichos individuos fueron incluidos en los análisis de *VDR* y *CAT*, como se muestra adelante.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos -52 G/A (rs1799946), -44 C/G (rs1800972) y -20 G/A (rs11362) de gen *DEFB1* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Como se muestra en el Cuadro 6, las frecuencias del genotipo CG y del alelo G del polimorfismo -44 C/G resultaron más elevadas en el grupo de pacientes, aumentando el riesgo para el desarrollo de vitiligo ($p < 0.02$), a diferencia del genotipo AA del polimorfismo -20 G/A que fue más prevalente en sujetos control que en pacientes, resultando un factor de protección de acuerdo a la prueba de asociación ($p = 0.043$) (Cuadro 6). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias del polimorfismo -52 G/A entre pacientes y controles, por lo que se infiere que no está asociado a la susceptibilidad a desarrollar vitiligo.

Los tres polimorfismos se encontraron en desequilibrio de ligamiento ($D' > 0.99$, para todas las comparaciones; r^2 -52G/A:-44C/G=0.147, r^2 -52G/A:-20G/A=0.342, r^2 -44C/G:-20G/A=0.261). Como se puede observar en el Cuadro 7, se identificaron tres haplotipos principales, de los cuales el GGG se encontró incrementado en pacientes, resultando asociado al aumento del riesgo a desarrollar vitiligo ($p = 0.01$).

Cuadro 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *DEFBI* en pacientes con vitiligo y controles sanos

Genotipo	Pacientes		Controles		<i>p</i>	RM (IC 95%) [†]
	con vitiligo n=171 (%)		sanos* n=183 (%)			
	GG	81 (47.4)	89 (48.6)		-	Referencia
-52 G/A (rs1799946)	GA	77 (45)	75 (41)	0.545		1.140 (0.746-1.742)
	AA	13 (7.6)	19 (10.4)	0.411		0.706 (0.308-1.618)
	A	0.301	0.309	0.806		1.053 (0.696-1.593)
	CC	82 (47.9)	111 (60.6)		-	Referencia
-44 C/G (rs1800972)	CG	78 (45.6)	66 (36.1)	0.018		1.773 (1.102-2.85)
	GG	11 (6.5)	6 (3.3)	0.103		2.347 (0.841-6.55)
	G	0.292	0.213	0.010		1.833 (1.159-2.901)
	GG	62 (36.2)	53 (29)		-	Referencia
-20 G/A (rs11362)	GA	81 (47.4)	87 (47.5)	0.271		0.755 (0.457-1.246)
	AA	28 (16.4)	43 (23.5)	0.043		0.525 (0.281-0.981)
	A	0.401	0.473	0.120		0.684 (0.423-1.104)

*Frecuencias dentro del equilibrio de Hardy Weinberg (-52G/A: *p*=0.59, -44C/G: *p*=0.38, -20G/A: *p*=0.53)

[†]Razón de momios (RM) e intervalo de confianza (IC) de 95% ajustados para edad y género

Cuadro 7. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en *DEFBI* en pacientes con vitiligo y controles sanos

Haplotipo	Pacientes con vitiligo	Controles sanos	<i>p</i>	RM (IC 95%)
GCA	0.401	0.473	-	Referencia
ACG	0.301	0.309	0.5	1.13 (0.8-1.59)
GGG	0.292	0.213	0.01	1.66 (1.13-2.45)
GCG	0.006	0.005	0.81	1.28 (0.17-9.34)

RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza

7.2.2. Polimorfismos en *DEFBI* y características clínicas de vitiligo

Las frecuencias de los polimorfismos en *DEFBI* de acuerdo a las características clínicas y demográficas de los pacientes con vitiligo pueden observarse en los Cuadros 8, 9 y 10. Considerando nuestros resultados, los polimorfismos en *DEFBI* no se asociaron a ninguna de las características clínicas de vitiligo. No obstante, encontramos que el genotipo -20 AA fue más prevalente en pacientes varones (Cuadro 8), así como el genotipo -44 CG en pacientes con fenómeno de Koebner (Cuadro 10) sin alcanzar significancia estadística ($p=0.052$ y $p=0.058$, respectivamente). Asimismo, las frecuencias haplotípicas no se asociaron a ninguna de las características analizadas.

Cuadro 8. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *DEFBI* en pacientes de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo

Genotipo		Mujeres n=91 (%)	Hombres n=80 (%)	<i>p</i>	HFV	HFV	<i>p</i>
					positiva* n=98 (%)	negativa n=73 (%)	
	GG	39 (42.9)	42 (52.4)	-	48 (49)	33 (45.2)	-
-52 G/A (rs1799946)	GA	46 (50.5)	31 (38.8)	0.145	42 (42.8)	35 (47.9)	0.550
	AA	6 (6.6)	7 (8.8)	0.894	8 (8.2)	5 (6.8)	0.877
	A	0.319	0.281	0.265	0.296	0.308	0.756
	CC	40 (44)	42 (52.5)	-	48 (49)	34 (46.6)	-
-44 C/G (rs1800972)	CG	45 (49.5)	33 (41.3)	0.259	41 (41.8)	37 (50.7)	0.448
	GG	6 (6.5)	5 (6.2)	0.720	9 (9.2)	2 (2.7)	0.154
	G	0.313	0.269	0.265	0.301	0.281	0.756
	GG	36 (39.5)	26 (32.5)	-	37 (37.8)	25 (34.2)	-
-20G/A (rs11362)	GA	45 (49.5)	36 (45)	0.764	45 (45.9)	36 (49.4)	0.622
	AA	10 (11)	18 (22.5)	0.052	16 (16.3)	12 (16.4)	0.821
	A	0.357	0.450	0.339	0.393	0.411	0.637

HFV: Historia familiar de vitiligo

*Reportaron familiares de 1^{er}, 2^{do} y/o 3^{er} grado afectados

Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *DEFBI* en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio

Genotipo		Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Inicio	Inicio	<i>p</i>
		activo ^a n=98 (%)	estable ^a n=73 (%)		localizado ^b n=24 (%)	diseminado ^b n=147 (%)		temprano ^c n=72 (%)	tardío ^c n=99 (%)	
-52 G/A (rs1799946)	GG	74 (48)	34 (46.6)	-	10 (41.6)	71 (48.3)	-	33 (45.9)	48 (48.5)	-
	GA	43 (43.9)	34 (46.6)	0.782	13 (54.2)	64 (43.5)	0.421	32 (44.4)	45 (45.4)	0.917
	AA	8 (8.1)	5 (6.8)	0.811	1 (4.2)	12 (8.2)	0.632	7 (9.7)	6 (6.1)	0.379
	A	0.301	0.301	0.999	0.312	0.299	0.507	0.319	0.288	0.636
-44 C/G (rs1800972)	CC	48 (49)	34 (46.6)	-	9 (37.5)	73 (49.7)	-	33 (45.8)	49 (49.5)	-
	CG	45 (45.9)	33 (45.2)	0.914	15 (62.5)	63 (42.9)	0.148	36 (50)	42 (42.4)	0.451
	GG	5 (5.1)	6 (8.2)	0.414	0 (0)	11 (7.4)	0.999	3 (4.2)	8 (8.1)	0.412
	G	0.281	0.308	0.756	0.312	0.289	0.272	0.292	0.296	0.636
-20G/A (rs11362)	GG	35 (35.8)	27 (37)	-	9 (37.5)	53 (36.1)	-	29 (40.2)	33 (33.3)	-
	GA	46 (46.9)	35 (47.9)	0.968	12 (50)	69 (46.9)	0.960	31 (43.1)	50 (50.5)	0.308
	AA	17 (17.3)	11 (15.1)	0.705	3 (12.5)	25 (17)	0.625	12 (16.7)	16 (16.2)	0.730
	A	0.408	0.39	0.864	0.375	0.404	0.891	0.382	0.414	0.352

^aVitiligo activo: con progresión en el último año; vitiligo estable: un año o mas sin avance del vitiligo y/o con repigmentación

^bVitiligo localizado: focal + acrofacial; vitiligo diseminado: generalizado + universal

^cInicio temprano: antes de los 20 años de edad; Inicio tardío: después de los 20 años de edad

Cuadro 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *DEFBI* en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner

Genotipo		Con CAI n=17 (%)	Sin CAI n=154 (%)	<i>p</i>	Koebner	Koebner	<i>p</i>
					positivo n=33 (%)	negativo n=138 (%)	
-52 G/A (rs1799946)	GG	9 (52.9)	72 (46.8)	-	17 (51.5)	64 (46.4)	-
	GA	8 (47.1)	69 (44.8)	0.884	12 (36.4)	65 (47.1)	0.382
	AA	0 (0)	13 (8.4)	0.999	4 (12.1)	9 (6.5)	0.435
	A	0.235	0.308	0.665	0.303	0.301	0.694
-44 C/G (rs1800972)	CC	5 (29.4)	77 (50)	-	12 (36.4)	70 (50.7)	-
	CG	10 (58.8)	68 (44.2)	0.153	21 (63.6)	57 (41.3)	0.058
	GG	2 (11.8)	9 (5.8)	0.175	0 (0)	11 (8)	0.999
	G	0.412	0.279	0.115	0.318	0.286	0.141
-20G/A (rs11362)	GG	6 (35.3)	56 (36.4)	-	12 (36.4)	50 (36.2)	-
	GA	10 (58.8)	71 (46.1)	0.617	18 (54.5)	63 (45.7)	0.677
	AA	1 (5.9)	27 (17.5)	0.337	3 (9.1)	25 (18.1)	0.315
	A	0.353	0.406	0.931	0.364	0.409	0.989

CAI: comorbilidad autoinmune

7.2.3. Niveles de beta-defensina 1 y vitiligo

El análisis de los niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1) mostró una diferencia significativa entre pacientes (media= 7.425 ± 2.99) y controles (media= 9.008 ± 2.30), indicando una disminución de HBD-1 en pacientes con vitiligo ($p=0.005$) (Figura 15).

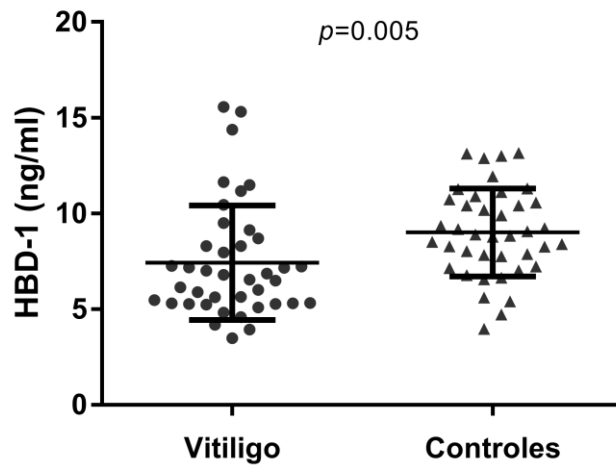


Figura 15. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1). Se midieron los niveles de HBD-1 en suero de pacientes con vitiligo (n=40) y de controles sanos (n=40).

7.2.4. Niveles de beta-defensina 1 y características clínicas de vitiligo

Al analizar los niveles de HBD-1 de acuerdo a las características clínicas de vitiligo, se observó que los pacientes con vitiligo activo presentaron niveles de HBD-1 menores que los pacientes con vitiligo estable (6.85 ± 3.17 y 8.287 ± 2.57 , respectivamente) ($p=0.021$) como se muestra en la Figura 16, en la cual se muestra además, una aparente relación inversa entre la actividad del vitiligo y los niveles séricos de HBD-1.

Al comparar el resto de las variables clínicas y demográficas no se observaron diferencias en los niveles séricos de HBD-1, como se puede apreciar en el Cuadro 11.

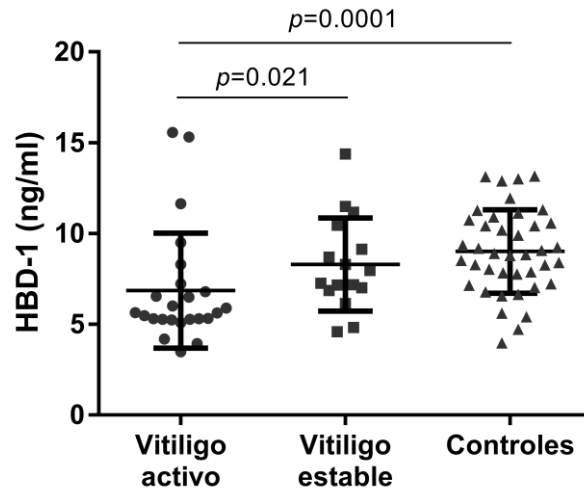


Figura 16. Niveles de beta-defensina 1 (HBD-1) y actividad de vitiligo. Comparación de los niveles séricos de HBD-1 en pacientes con vitiligo activo (n=24), vitiligo estable (n=16) y controles sanos (n=40).

7.2.5. Relación polimorfismos-niveles séricos de HBD-1

Al comparar los niveles séricos de HBD-1 entre los diferentes genotipos de los polimorfismos de *DEFB1* no se observaron diferencias para ninguno de ellos en pacientes, ni controles, como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 11. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1) de acuerdo a características clínicas y demográficas de pacientes con vitiligo

Característica	n	HBD-1 (ng/ml) ^a	<i>p</i> ^b
Género			
Mujeres	24	7.05 ± 2.61	0.362
Hombres	16	7.989 ± 3.5	
Historia familiar de vitiligo			
Si	28	7.277 ± 2.87	0.782
No	12	7.772 ± 3.37	
Tipo clínico ^c			
Localizado	6	6.513 ± 2.45	0.383
Diseminado	34	7.586 ± 3.09	
Tipo de inicio ^d			
Temprano	25	7.425 ± 3.11	0.834
Tardío	15	7.425 ± 2.9	
Comorbilidad autoinmune			
Si	3	5.956 ± 2.14	0.626
No	37	7.545 ± 3.04	
Fenómeno de Koebner			
Si	10	6.489 ± 2.72	0.246
No	30	7.737 ± 3.06	

^aLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^bResultado de la prueba U de Mann-Whitney

^cLocalizado: focal + acrofacial; diseminado: generalizado + universal

^dInicio temprano: < 20 años de edad; inicio tardío: ≥ 20 años de edad

Cuadro 12. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1) de acuerdo a los genotipos y haplotipos de *DEFB1*

Grupo	Genotipo/ HBD-1 (ng/ml) ^a			<i>p</i> ^b
	-52 GG	-52 GA	-52 AA	
Vitiligo	7.295 ± 2.87	7.601 ± 3.29	-	0.917
Control	8.944 ± 2.10	8.407 ± 2.06	9.935 ± 3.04	0.566
	-44 CC	-44 CG	-44 GG	
Vitiligo	7.582 ± 3.01	7.385 ± 3.19	6.22 ± 1.33	0.840
Control	8.861 ± 2.41	8.954 ± 2.04	-	0.690
	-20 GG	-20 GA	-20 AA	
Vitiligo	6.727 ± 1.86	7.815 ± 3.61	6.989 ± 1.49	0.865
Control	9.561 ± 3.05	8.975 ± 1.71	7.924 ± 2.24	0.506
	Haplotipo			
	GCA	ACG	GGG	
Vitiligo	7.510 ± 3.00	7.542 ± 3.12	7.204 ± 3.01	0.867
Control	8.737 ± 1.75	9.347 ± 2.70	9.000 ± 2.49	0.761

^aLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^bResultado de prueba Kruskal-Wallis (Mann-Whitney en las filas con solo dos valores)

7.3. Hallazgos para vitamina D y el gen de su receptor (*VDR*)

7.3.1. Polimorfismos en *VDR* y susceptibilidad a vitiligo

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) y *TaqI* (rs731236) del gen *VDR* mostró apego al equilibrio de Hardy Weinberg pero no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con vitiligo y controles sanos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en VDR en pacientes con vitiligo y controles sanos

Genotipo		Pacientes	Controles	<i>p</i>	RM (IC 95%)†
		con vitiligo n=173 (%)	sanos* n=184 (%)		
<i>BsmI</i> (rs1544410)	GG	90 (52)	99 (53.8)	-	Referencia
	GA	69 (39.9)	66 (35.9)	0.574	1.139 (0.724-1.791)
	AA	14 (8.1)	19 (10.3)	0.714	0.868 (0.405-1.857)
	A	0.280	0.283	0.714	1.084 (0.705-1.667)
<i>ApaI</i> (rs7975232)	CC	56 (32.4)	63 (34.2)	-	Referencia
	CA	83 (48)	91 (49.5)	0.875	1.039 (0.646-1.671)
	AA	34 (19.6)	30 (16.3)	0.391	1.327 (0.695-2.536)
	A	0.436	0.410	0.697	1.095 (0.693-1.732)
<i>TaqI</i> (rs731236)	TT	97 (56.1)	102 (55.4)	-	Referencia
	TC	69 (39.9)	71 (38.6)	0.981	1.005 (0.649-1.557)
	CC	7 (4)	11 (6)	0.469	0.678 (0.237-1.942)
	C	0.240	0.253	0.976	0.976 (0.635-1.501)

* Frecuencias dentro del equilibrio de Hardy Weinberg (*BsmI*: $p=0.12$, *ApaI*: $p=0.76$, *TaqI*: $p=0.77$).

† Razón de momios (RM) e intervalo de confianza (IC) de 95% ajustados para edad y género

Los resultados del análisis de ligamiento de los tres polimorfismos del gen *VDR* fueron los siguientes: *BsmI*-*ApaI*: $D'=0.929$, $r^2=0.461$; *BsmI*-*TaqI*: $D'=0.975$, $r^2=0.794$; *ApaI*-*TaqI*: $D'=0.988$, $r^2=0.436$). Lo anterior indica que los polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, sobre todo *BsmI* con *TaqI* considerando su elevado coeficiente de correlación (r^2). Por otro lado, no fue posible establecer una asociación de las frecuencias haplotípicas con vitiligo puesto que éstas fueron muy similares entre pacientes y controles (Cuadro 14).

Cuadro 14. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en *VDR* en pacientes con vitiligo y controles sanos

Haplotipo	Pacientes con vitiligo	Controles sanos	<i>p</i>	RM (IC 95%)
GCT	0.545	0.584	-	Referencia
AAC	0.231	0.253	0.77	0.94 (0.64-1.39)
GAT	0.166	0.133	0.19	1.34 (0.87-2.05)
AAT	0.034	0.024	0.34	1.56 (0.62-3.91)
ACT	0.015	0.006	0.22	2.87 (0.54-15.39)

RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza

7.3.2. Polimorfismos en *VDR* y características clínicas de vitiligo

Las frecuencias de los polimorfismos en *VDR* fueron similares entre pacientes de ambos géneros y entre pacientes con y sin antecedente familiar de vitiligo (Cuadro 15). Similarmente, no se encontró asociación de los polimorfismos en *VDR* con la actividad ni el tipo clínico del vitiligo, y si bien se observó un aumento de genotipo *ApaI* AA en individuos con vitiligo de inicio tardío, la prueba de asociación no fue estadísticamente significativa (Cuadro 16). Finalmente, como se muestra en el Cuadro 17, no se encontró asociación de los polimorfismos con la presencia de comorbilidades autoinmunes pero si con la presencia de fenómeno de Koebner en donde se observó un aumento significativo de la frecuencia del genotipo *BsmI* GA ($p=0.017$). Cabe señalar el análisis de haplotipos de *VDR* no indicó asociación con ninguna de las características antes mencionadas (datos no mostrados).

Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en VDR en pacientes de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo

Genotipo		Mujeres n=92 (%)	Hombres n=81 (%)	<i>p</i>	HFV	HFV	<i>p</i>
					positiva* n=99 (%)	negativa n=74 (%)	
<i>BsmI</i>	GG	46 (50)	44 (54.3)	-	50 (50.5)	40 (54)	-
	GA	37 (40.2)	32 (39.5)	0.753	40 (40.4)	29 (39.2)	0.761
	AA	9 (9.8)	5 (6.2)	0.362	9 (9.1)	5 (6.8)	0.541
	A	0.299	0.259	0.570	0.293	0.263	0.644
<i>ApaI</i>	CC	27 (29.3)	29 (35.8)	-	29 (29.3)	27 (36.5)	-
	CA	47 (51.1)	36 (44.4)	0.330	55 (55.6)	28 (37.8)	0.088
	AA	18 (19.6)	16 (19.8)	0.664	15 (15.1)	19 (25.7)	0.481
	A	0.451	0.419	0.366	0.429	0.446	0.318
<i>TaqI</i>	TT	50 (54.4)	47 (58)	-	53 (53.5)	44 (59.5)	-
	TC	37 (40.2)	32 (39.5)	0.792	41 (41.4)	28 (37.8)	0.540
	CC	5 (5.4)	2 (2.5)	0.321	5 (5.1)	2 (2.7)	0.396
	C	0.255	0.222	0.627	0.257	0.216	0.438

HFV: Historia familiar de vitiligo

*Reportaron familiares de 1^{er}, 2^{do} y/o 3^{er} grado afectados

Cuadro 16. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en VDR en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio

Genotipo	Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Inicio	Inicio	<i>p</i>	
	activo ^a n=99 (%)	estable ^a n=74 (%)		localizado ^b n=24 (%)	diseminado ^b n=149 (%)		temprano ^c n=74 (%)	tardío ^c n=99 (%)		
<i>BsmI</i>	GG	56 (56.6)	34 (45.9)	-	11 (45.8)	79 (53)	-	40 (54.1)	50 (50.5)	-
	GA	35 (35.3)	34 (45.9)	0.147	11 (45.8)	58 (38.9)	0.502	30 (40.5)	39 (39.4)	0.903
	AA	8 (8.1)	6 (8.2)	0.717	2 (8.4)	12 (8.1)	0.828	4 (5.4)	10 (10.1)	0.270
	A	0.257	0.311	0.167	0.313	0.275	0.514	0.257	0.298	0.644
<i>ApaI</i>	CC	32 (32.3)	24 (32.4)	-	5 (20.8)	51 (34.2)	-	27 (36.5)	29 (29.3)	-
	CA	48 (48.5)	35 (47.3)	0.936	14 (58.4)	69 (46.3)	0.188	37 (50)	46 (46.5)	0.673
	AA	19 (19.2)	15 (20.3)	0.907	5 (20.8)	29 (19.5)	0.402	10 (13.5)	24 (24.2)	0.082
	A	0.434	0.439	0.988	0.500	0.426	0.199	0.385	0.475	0.318
<i>TaqI</i>	TT	61 (61.6)	36 (48.6)	-	12 (50)	85 (57)	-	43 (58.1)	54 (54.5)	-
	TC	34 (34.3)	35 (47.3)	0.082	10 (41.7)	59 (39.6)	0.691	31 (41.9)	38 (38.4)	0.939
	CC	4 (4.1)	3 (4.1)	0.762	2 (8.3)	5 (3.4)	0.243	0 (0)	7 (7.1)	0.999
	C	0.212	0.277	0.090	0.292	0.231	0.519	0.209	0.263	0.640

^aVitiligo activo: con progresión en el último año; vitiligo estable: un año o mas sin avance del vitiligo y/o con repigmentación

^bVitiligo localizado: focal + acrofacial; vitiligo diseminado: generalizado + universal

^cInicio temprano: antes de los 20 años de edad; Inicio tardío: después de los 20 años de edad

Cuadro 17. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en VDR en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner

Genotipo		Con CAI	Sin CAI	<i>p</i>	Koebner	Koebner	<i>p</i>
		n=17 (%)	n=156 (%)		positivo n=34 (%)	negativo n=139 (%)	
<i>BsmI</i>	GG	9 (52.9)	81 (51.9)	-	13 (38.2)	77 (55.4)	-
	GA	6 (35.3)	63 (40.4)	0.780	21 (61.8)	48 (34.5)	0.017*
	AA	2 (11.8)	12 (7.7)	0.630	0 (0)	14 (10.1)	0.999
	A	0.294	0.279	0.936	0.309	0.273	0.076
<i>ApaI</i>	CC	4 (23.5)	52 (33.3)	-	12 (35.3)	44 (31.6)	-
	CA	10 (58.8)	73 (46.8)	0.351	18 (52.9)	65 (46.8)	0.971
	AA	3 (17.7)	31 (19.9)	0.773	4 (11.8)	30 (21.6)	0.251
	A	0.470	0.433	0.416	0.382	0.450	0.685
<i>TaqI</i>	TT	9 (52.9)	88 (56.5)	-	18 (52.9)	79 (56.9)	-
	TC	7 (41.2)	62 (39.7)	0.852	16 (47.1)	53 (38.1)	0.467
	CC	1 (5.9)	6 (3.8)	0.667	0 (0)	7 (5)	0.999
	C	0.265	0.237	0.784	0.235	0.241	0.682

CAI: comorbilidad autoinmune

*RM= 2.591, IC 95%= (1.188-5.653)

7.3.3. Niveles de vitamina D y vitiligo

Los resultados del análisis de los niveles de vitamina D en suero mostraron una disminución de los niveles promedio del metabolito de aproximadamente el 25% en pacientes con vitiligo comparado con controles (20.32 ± 6.66 y 26.75 ± 12.20 ng/ml, respectivamente) ($p=0.017$) (Figura 17).

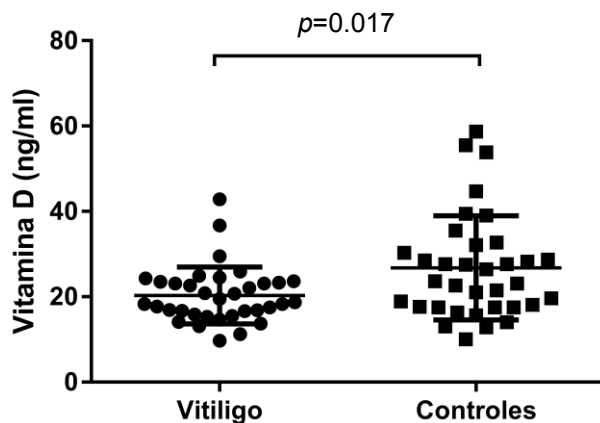


Figura 17. Niveles séricos de vitamina D. Se midieron los niveles de vitamina D en pacientes con vitiligo (n=35) y controles sanos (n=35).

7.3.4. Niveles de vitamina D y características clínicas de vitiligo

No se encontraron diferencias en los niveles de vitamina D entre las diferentes características de los pacientes tales como género, historia familiar de vitiligo, tipo clínico, tipo de inicio, actividad de vitiligo y presencia de comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner (Cuadro 18).

7.3.5. Relación polimorfismos-niveles séricos de vitamina D

No se observaron diferencias significativas en los niveles de vitamina D entre los diferentes alelos, genotipos y haplotipos conformados por los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* del gen *VDR* cuando se evaluaron en pacientes o controles por separado (Cuadro 19).

Cuadro 18. Niveles séricos de vitamina D (VD) de acuerdo a características clínicas y demográficas de pacientes con vitiligo

Característica	n	VD (ng/ml) ^a	<i>p</i> ^b
Género			
Mujeres	21	18.75 ± 4.65	
Hombres	14	22.68 ± 8.52	0.096
Historia familiar de vitiligo			
Si	24	21.08 ± 7.32	
No	11	18.66 ± 4.77	0.494
Tipo clínico^c			
Localizado	6	20.80 ± 4.21	
Diseminado	29	20.22 ± 7.11	0.454
Tipo de inicio^d			
Temprano	23	19.67 ± 7.07	
Tardío	12	21.57 ± 5.86	0.294
Actividad del vitiligo			
Activo	20	21.05 ± 7.82	
Estable	15	19.35 ± 4.77	0.730
Comorbilidad autoinmune			
Si	2	32.7 ± 14.28	
No	33	19.57 ± 5.53	0.141
Fenómeno de Koebner			
Si	9	22.28 ± 9.24	
No	26	19.64 ± 5.57	0.753

^aLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^bResultado de la prueba U de Mann-Whitney

^cLocalizado: focal + acrofacial; Diseminado: generalizado + universal

^dInicio temprano: < 20 años de edad; inicio tardío: ≥ 20 años de edad

Cuadro 19. Niveles séricos de vitamina D de acuerdo a los genotipos y haplotipos de VDR

Grupo	Genotipo/ vitamina D (ng/ml) ^a			<i>p</i> ^b
	<i>BsmI</i> GG	<i>BsmI</i> GA	<i>BsmI</i> AA	
Vitiligo	19.61 ± 5.82	22.38 ± 8.58	-	0.533
Control	24.90 ± 9.03	31.23 ± 15.34	29.7 ± 25.23	0.631
<hr/>				
Grupo	Genotipo/ vitamina D (ng/ml) ^a			<i>p</i> ^b
	<i>ApaI</i> CC	<i>ApaI</i> CA	<i>ApaI</i> AA	
Vitiligo	18.26 ± 4.29	22.02 ± 8.17	19.40 ± 3.71	0.439
Control	23.85 ± 8.65	30.54 ± 13.30	27.53 ± 21.05	0.394
<hr/>				
Grupo	Genotipo/ vitamina D (ng/ml) ^a			<i>p</i> ^b
	<i>TaqI</i> TT	<i>TaqI</i> TC	<i>TaqI</i> CC	
Vitiligo	19.56 ± 5.70	22.24 ± 8.66	-	0.583
Control	24.6 ± 8.96	29.19 ± 15.6	-	0.596
<hr/>				
Haplotipo				
Grupo	GCT	AAC	GAT	<i>p</i> ^b
	Haplotipo			
Vitiligo	19.80 ± 6.33	22.24 ± 8.66	20.99 ± 6.45	0.555
Control	25.79 ± 10.34	34.55 ± 18.36	25.84 ± 9.62	0.446

^aLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^bResultado de prueba Kruskal-Wallis (Mann-Whitney en las filas con solo dos valores)

7.4. Hallazgos para catalasa y su gen

7.4.1. Polimorfismos en *CAT* y susceptibilidad a vitiligo

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos -89 A/T (rs7943316), 389 C/T (rs769217) y 419 C/T (rs11032709) mediante el software DeFinneti mostró cumplimiento del equilibrio de Hardy Weinberg excepto para el 419 C/T en el grupo de controles sanos donde se desvía ($p=0.02$) debido a la elevación de la frecuencia relativa genotipo homocigoto mutante (TT).

Como se puede observar en el Cuadro 20, el genotipo -89 TT fue más prevalente en pacientes con vitiligo que en controles, resultando un factor de riesgo para el desarrollo de la patología

($p=0.015$). Dicho aumento se refleja en el aumento del alelo T en pacientes, aunque sin alcanzar significancia estadística ($p=0.057$). En cuanto al polimorfismo 389 C/T se observó un incremento en la frecuencia del genotipo TT en controles, confiriendo un efecto protector para vitiligo ($p=0.005$) (Cuadro 17). El polimorfismo 419 C/T se observó en baja proporción de los individuos analizados y con una frecuencia similar en ambos grupos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en CAT en pacientes con vitiligo y controles sanos

Genotipo		Pacientes	Controles	p	RM (IC 95%)†
		con vitiligo n=173 (%)	sanos* n=184 (%)		
-89 A/T (rs7943316)	AA	35 (20.2)	53 (28.8)	-	Referencia
	AT	90 (52)	96 (52.2)	0.151	1.497 (0.864-2.595)
	TT	48 (27.8)	35 (19)	0.015	2.265 (1.172-4.376)
	T	0.537	0.451	0.057	1.674 (0.984-2.847)
389 C/T (rs769217)	CC	96 (55.5)	85 (46.2)	-	Referencia
	CT	70 (40.5)	76 (41.3)	0.232	0.766 (0.495-1.186)
	TT	7 (4)	23 (12.5)	0.005	0.284 (0.117-0.689)
	T	0.243	0.331	0.065	0.672 (0.441-1.025)
419 C/T (rs11032709)	CC	169 (97.7)	180 (97.8)	-	Referencia
	CT	4 (2.3)	3 (1.6)	0.614	1.475 (0.326-6.663)
	TT	0 (0)	1 (0.6)	0.978	- (-)
	T	0.012	0.014	0.906	1.088 (0.270-4.389)

* Frecuencias dentro del equilibrio de Hardy Weinberg (-89A/T: $p=0.47$, 389C/T: $p=0.35$) excepto para 419G/A ($p=0.02$)

† Razón de momios (RM) e intervalo de confianza (IC) de 95% ajustados para edad y género

Considerando la baja frecuencia del polimorfismo 419 C/T, este no fue considerado para el análisis de ligamiento, incluyéndose solamente al -89 A/T y el 389 C/T que presentaron un valor de $D' = 0.999$ y una $r^2 = 0.394$, indicando que se encuentran en desequilibrio de

ligamiento. Como se observa en el Cuadro 21, se observaron solo tres de los cuatro posibles haplotipos, de los cuales el AT se asoció a un efecto protector ($p=0.006$).

Cuadro 21. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en *CAT* en pacientes con vitiligo y controles sanos

Haplotipo	Pacientes con vitiligo	Controles sanos	<i>p</i>	RM (IC 95%)
TC	0.538	0.493	-	Referencia
AT	0.243	0.332	0.006	0.61 (0.43-0.87)
AC	0.220	0.217	0.36	1.28 (0.17-9.34)

RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza

7.4.2. Polimorfismos en *CAT* y características clínicas de vitiligo

Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas no se encontraron asociadas al género, antecedente familiar de vitiligo (Cuadro 22), al tipo clínico, tipo de inicio (Cuadro 23) ni presencia de comorbilidad autoinmune o fenómeno de Koebner (Cuadro 25). Sin embargo, se observó una frecuencia más baja del alelo -89 T en individuos con vitiligo estable que por sí sola no tiene un efecto significativo ($p=0.057$) pero aparentemente repercute en la frecuencia del haplotipo AC que se asocia a protección en contra de la forma activa del vitiligo ($p=0.039$) (Cuadro 24).

Cuadro 22. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *CAT* en pacientes de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo

Genotipo		Mujeres n=92 (%)	Hombres n=81 (%)	<i>p</i>	HFV	HFV	<i>p</i>
					positiva* n=99 (%)	negativa n=74 (%)	
-89 A/T (rs7943316)	AA	19 (20.6)	16 (19.7)	-	20 (20.2)	15 (20.3)	-
	AT	46 (50)	44 (54.3)	0.750	46 (46.5)	44 (59.4)	0.545
	TT	27 (29.3)	21 (25.9)	0.859	33 (33.3)	15 (20.3)	0.279
	T	0.543	0.531	0.883	0.566	0.500	0.991
389 C/T (rs769217)	CC	50 (54.4)	46 (56.8)	-	56 (56.6)	40 (54)	-
	CT	36 (39.1)	34 (42)	0.934	39 (39.4)	31 (41.9)	0.736
	TT	6 (6.5)	1 (1.2)	0.120	4 (4)	3 (4.1)	0.951
	T	0.261	0.222	0.747	0.237	0.250	0.742
419 C/T (rs11032709)	CC	90 (97.8)	79 (97.5)	-	97 (98)	72 (97.3)	-
	CT	2 (2.2)	2 (2.5)	0.897	2 (2)	2 (2.7)	0.768
	TT	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	-
	T	0.011	0.012	0.897	0.010	0.013	0.768

HFV: Historia familiar de vitiligo

*Reportaron familiares de 1^{er}, 2^{do} y/o 3^{er} grado afectados

Cuadro 23. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *CAT* en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio

Genotipo	Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Vitiligo	Vitiligo	<i>p</i>	Inicio	Inicio	<i>p</i>	
	activo ^a n=99 (%)	estable ^a n=74 (%)		localizado ^b n=24 (%)	diseminado ^b n=149 (%)		temprano ^c n=74 (%)	tardío ^c n=99 (%)		
-89 A/T (rs7943316)	AA	15 (15.1)	20 (27)	-	5 (20.8)	30 (20.1)	-	17 (23)	18 (18.2)	-
	AT	54 (54.6)	36 (48.7)	0.086	9 (37.5)	81 (54.4)	0.497	39 (52.7)	51 (51.5)	0.597
	TT	30 (30.3)	18 (24.3)	0.078	10 (41.7)	38 (25.5)	0.446	18 (24.3)	30 (30.3)	0.314
	T	0.576	0.486	0.057	0.604	0.527	0.937	0.507	0.561	0.439
389 C/T (rs769217)	CC	53 (53.6)	43 (58.1)	-	13 (55.7)	83 (55.7)	-	41 (55.4)	55 (55.6)	-
	CT	44 (44.4)	26 (35.1)	0.324	11 (45.8)	59 (39.6)	0.694	30 (40.5)	40 (40.4)	0.985
	TT	2 (2)	5 (6.8)	0.191	0 (0)	7 (4.7)	0.999	3 (4.1)	4 (4)	0.994
	T	0.242	0.243	0.549	0.229	0.245	0.888	0.243	0.242	0.984
419 C/T (rs11032709)	CC	96 (97)	73 (98.6)	-	24 (100)	145 (97.3)	-	72 (97.3)	97 (98)	-
	CT	3 (3)	1 (1.4)	0.479	0 (0)	4 (2.7)	0.999	2 (2.7)	2 (2)	0.768
	TT	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	-
	T	0.015	0.007	0.479	0.000	0.013	0.999	0.014	0.010	0.768

^aVitiligo activo: con progresión en el último año; vitiligo estable: un año o más sin avance del vitiligo y/o con repigmentación

^bVitiligo localizado: focal + acrofacial; vitiligo diseminado: generalizado + universal

^cInicio temprano: antes de los 20 años de edad; Inicio tardío: después de los 20 años de edad

Cuadro 24. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en CAT en pacientes con vitiligo activo y estable

Haplotipo	Vitiligo activo	Vitiligo Estable	<i>p</i>	RM (IC 95%)
TC	0.576	0.486	-	Referencia
AT	0.243	0.242	0.54	0.84 (0.48-1.46)
AC	0.182	0.270	0.039	0.55 (0.32-0.97)

RM: razón de momios; IC: intervalo de confianza

Cuadro 25. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en CAT en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner

Genotipo	Con CAI n=17 (%)	Sin CAI n=156 (%)	<i>p</i>	Koebner	Koebner	<i>p</i>	
				positivo n=34 (%)	negativo n=139 (%)		
-89 A/T	AA	2 (11.8)	33 (21.1)	-	7 (20.6)	28 (20.1)	-
	AT	10 (58.8)	80 (51.3)	0.367	20 (58.8)	70 (50.4)	0.786
	TT	5 (29.4)	43 (27.6)	0.453	7 (20.6)	41 (29.5)	0.517
	T	0.588	0.532	0.369	0.500	0.547	0.954
389 C/T	CC	9 (52.9)	87 (50)	-	16 (47)	80 (57.6)	-
	CT	8 (47.1)	62 (44.2)	0.667	16 (47)	54 (38.8)	0.320
	TT	0 (0)	7 (5.8)	0.999	2 (6)	5 (3.6)	0.431
	T	0.235	0.243	0.824	0.294	0.230	0.272
419 C/T	CC	16 (94.1)	153 (98.1)	-	34 (100)	135 (97.1)	-
	CT	1 (5.9)	3 (1.9)	0.328	0 (0)	4 (2.9)	0.999
	TT	0 (0)	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	-
	T	0.029	0.010	0.328	0.000	0.014	0.999

CAI: comorbilidad autoinmune

7.4.3. Actividad de catalasa y vitiligo

El resultado del análisis de la actividad enzimática de catalasa en suero, mostrado en la Figura 18, indica una disminución de aproximadamente 30% en pacientes con vitiligo comparado contra controles (46.593 ± 23.97 y 66.057 ± 32.09 nmol/min/ml, respectivamente).

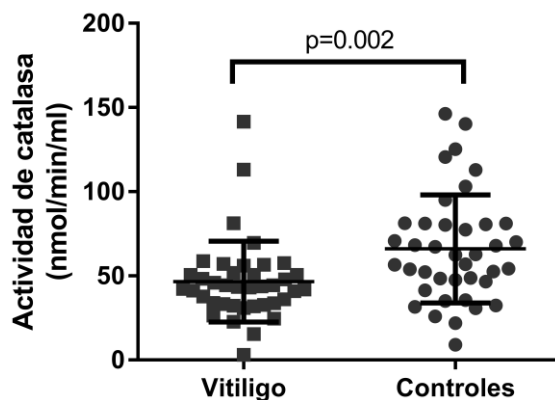


Figura 18. Niveles de actividad enzimática de catalasa. Se midió la actividad de catalasa en suero de pacientes con vitiligo (n=39) y controles sanos (n=39).

7.4.4. Actividad de catalasa y características clínicas de vitiligo

La comparación de la actividad de catalasa en suero indica que no existen diferencias significativas entre las variantes de las características clínicas de vitiligo expuestas en el Cuadro 26.

7.4.5. Relación polimorfismos-actividad de catalasa en suero

Este análisis sólo se realizó para los polimorfismos -89 A/T y 389 C/T, descartando al 419 C/T debido a su baja frecuencia. No se observó diferencia entre la actividad de catalasa entre los diferentes genotipos en los grupos analizados. Sin embargo, al comparar la actividad de

catalasa por haplotipo observamos una disminución para el haplotipo AT comparado con el TC en el grupo de pacientes que no se encontró en el grupo de controles (Cuadro 27).

Cuadro 26. Niveles de actividad enzimática de la catalasa (CAT) en suero de acuerdo a características clínicas y demográficas de pacientes con vitiligo.

Característica	n	Actividad CAT (nmol/min/ml) ^a	<i>p</i> ^b
Género			
Mujeres	24	45.19 ± 28.63	0.163
Hombres	15	48.83 ± 14.29	
Historia familiar de vitiligo			
Si	27	47.14 ± 23.26	0.940
No	12	45.35 ± 26.53	
Tipo clínico^c			
Localizado	6	40.98 ± 15.66	0.412
Diseminado	33	47.61 ± 25.24	
Tipo de inicio^d			
Temprano	25	43.27 ± 21.71	0.125
Tardío	14	52.52 ± 27.40	
Actividad del vitiligo			
Activo	23	45.77 ± 21.91	0.921
Estable	16	47.77 ± 27.37	
Comorbilidad autoinmune			
Si	3	71.69 ± 60.76	0.901
No	36	44.50 ± 18.83	
Fenómeno de Koebner			
Si	10	48.29 ± 11.48	0.208
No	29	46.00 ± 27.13	

^aLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^bResultado de la prueba U de Mann-Whitney

^cLocalizado: focal + acrofacial; Diseminado: generalizado + universal

^dInicio temprano: < 20 años de edad; inicio tardío: ≥ 20 años de edad

Cuadro 27. Niveles de actividad sérica de catalasa de acuerdo a los genotipos y haplotipos de *CAT*

Grupo	Genotipo ^a / actividad de catalasa (nmol/min/ml) ^b			<i>p</i> ^c
	-89 AA	-89 AT	-89 TT	
Vitiligo	41.23 ± 28.38	42.86 ± 11.93	61.43 ± 37.45	0.196
Control	76.71 ± 41.71	66.95 ± 29.63	49.91 ± 15.29	0.230
	389 CC	389 CT	389 TT	
Vitiligo	51.37 ± 27.4	42.92 ± 20.76	27.69 ± 4.51	0.051
Control	62.99 ± 34.16	71.96 ± 32.98	56.24 ± 15.15	0.506
	Haplotipo			
	TC	AT	AC	
Vitiligo	51.61 ± 26.11*	40.15 ± 19.67*	44.29 ± 22.44	0.042
Control	57.54 ± 25.41	66.93 ± 28.96	79.03 ± 40.86	0.102

^aNo se incluyeron los genotipos del polimorfismo 419 C/T debido a su ausencia en la población analizada

^bLos valores se presentan como media ± desviación estándar

^cResultado de prueba Kruskal-Wallis (Mann-Whitney en las filas con solo dos valores)

*Prueba Dunn (posthoc): *p*=0.037

8. DISCUSIÓN

8.1. Características clínicas de vitiligo

Como parte de la ejecución de los objetivos del presente proyecto se realizó la categorización de los pacientes con vitiligo de acuerdo a las características clínicas y demográficas que referían. Esta actividad *per se* tiene un fin meramente descriptivo, no obstante, un hallazgo de importancia fue que al comparar nuestra población con las de otros estudios similares observamos un considerable aumento de la frecuencia de reporte de historia familiar de vitiligo, un 57% del total de los pacientes (Cuadro 2), a diferencia del 15-36% de positividad para dicho parámetro reportado previamente (Aydingoz y cols., 2012; Karelson y cols., 2011; Li y cols., 2012; Mehaney y cols., 2014; Mohammed y cols., 2015). Nuestros resultados confirman la importancia de la herencia biológica como factor de riesgo para vitiligo en nuestro país, hallazgo previamente observado en población del noreste de México (Salinas-Santander y cols., 2012).

El resto de las variables clínicas y demográficas evaluadas se comportaron de manera similar que en reportes previos, corroborando que ocurren en función de la enfermedad o al margen de ella y son independientes de factores étnicos (Ezzedine y cols., 2015; Li y cols., 2012; Mehaney y cols., 2014; Mohammed y cols., 2015; Salinas-Santander y cols., 2012).

8.2. DEFBI, HBD-1 y vitiligo

La HBD-1 es un AMP de amplio espectro con funciones promotoras de la inflamación *in situ* y activación de células dendríticas y por ende de la respuesta inmunitaria adaptativa (Yang y cols., 2007). En el presente estudio se evaluó el papel de los niveles séricos de HBD-1 y tres

polimorfismos en la zona 5'UTR del gen *DEFBI* en vitiligo, considerando como punto de partida el reporte previo de su asociación con algunas enfermedades autoinmunes. Nuestros hallazgos se discuten en este tenor debido a la falta de investigaciones de HBD-1 con vitiligo.

Se encontró que el genotipo -44 CG y el alelo G, así como el haplotipo GGG se asociaron al incremento del riesgo a desarrollar vitiligo (Cuadro 6), hallazgo similar al reportado por Sandrin-Garcia y cols. (2012) en LES, pero opuesto para DT1 en la que el genotipo y el alelo se asocian a protección (Németh y cols., 2014). Lo anterior ha sido atribuido a un incremento en la tasa transcripcional del ARNm de *DEFBI* causada por la presencia del alelo -44 G en LES y DT1, hipótesis que podría ser también aplicada en vitiligo, considerando nuestros resultados (Kalus y cols., 2009; Németh y cols., 2014; Sandrin-Garcia y cols., 2012). Así pues, la elevación de la tasa transcripcional del gen generaría a su vez un aumento constitutivo de HBD-1, que posee propiedades quimioatrayentes de células dendríticas inmaduras y de linfocitos T de memoria los cuales, en presencia de señales de peligro (p.ej. estrés oxidativo, elevación de IL-6, IL-8 y proteína de choque térmico 70) promoverían la presentación inicial de autoantígeno y los brotes de despigmentación, respectivamente (Manga y cols., 2016; Yang y cols., 2007); modelo previamente sugerido para dermatitis atópica (DA) (Prado-Montes de Oca y cols., 2007).

Otro hallazgo interesante fue que el genotipo -20 AA aparentemente se asoció a protección contra vitiligo (Cuadro 6), lo que contrasta con las observaciones en DT1 y LES, donde no se encontró asociación (Németh y cols., 2014; Sandrin-Garcia y cols., 2012), y en enfermedad de Crohn donde la protección la confiere el genotipo -20 GG (Zanin y cols., 2012) probablemente debido a la diferencia de las patologías aunado al factor poblacional. Por otro lado, tiene similitudes con lo reportado en DA por Prado-Montes de Oca y cols. (2007), aunque ellos

sugieren al genotipo -20 GG como factor de riesgo y no al -20 AA como de protección. En este contexto, Zanin y cols. (2012) sugirió que el alelo -20 A parece estar vinculado a disminución en la expresión génica y proteica de HBD-1 a nivel tisular, lo que podría explicar su papel como factor de riesgo para infecciones (Estrada-Aguirre y cols., 2014). No obstante, investigaciones recientes no han podido encontrar dicho efecto en los niveles de HBD-1 (Polesello y cols., 2017), lo que indica que el polimorfismo -20 G/A del gen *DEFBI* requiere de más investigaciones en lo referente a su efecto funcional.

En relación al efecto del polimorfismo -52 G/A y el resto de los haplotipos, nuestro grupo no encontró asociación a vitiligo, contrario a lo observado en LES, donde el alelo -52 A se asoció a protección y el haplotipo GCA a riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Sandrin-Garcia y cols., 2012). Esta diferencia podría estar relacionada a que, si bien ambos poseen etiología autoinmune y se manifiestan en piel, vitiligo y LES difieren en los mecanismos inmunológicos que las dirigen: CTLs CD8⁺ y anticuerpos, respectivamente (Manga y cols., 2016; Sandrin-Garcia y cols., 2012). Además, no se puede descartar el efecto biológico de las diferencias genéticas entre población mexicana y brasileña. Ambas explicaciones pueden también aplicarse al resto de los hallazgos mencionados para los otros dos polimorfismos.

Es importante mencionar que, en general, los polimorfismos en *DEFBI* no se asociaron a ninguna característica clínica de vitiligo (Cuadros 8-10), por lo que aparentemente solo repercuten en el riesgo de la aparición inicial de vitiligo y no tienen efecto sobre sus manifestaciones una vez adquirido. Desafortunadamente, no existen estudios similares con que comparar estos resultados, pero se espera que puedan sentar precedente en el estudio de asociación genética con vitiligo.

Respecto a los niveles de HBD-1, encontramos que el grupo de pacientes presentó niveles mas bajos que el grupo control (Figura 15), un hallazgo inesperado considerando nuestra hipótesis. Sin embargo, nuestros resultados son similares a lo reportado para DT1 aunque contrastan con lo observado en LEC, Pso y LPO (Brauner y cols., 2014; Kreuter y cols., 2011; Polesello y cols., 2017). Lo anterior podría deberse a las similitudes etiológicas de vitiligo y DT1 dado que ambas están mediadas por CTLs CD8⁺ (Brauner y cols., 2014; Harris 2016), contrario a CLE, Pso y LPO que involucran inflamación crónica (Kreuter y cols., 2011; Polesello y cols., 2017). No obstante, la razón también puede deberse al enfoque técnico ya que, tanto en el estudio de Brauner y cols. (2014) con DT1 y en el presente con vitiligo, la medición de HBD-1 fue realizada en suero; mientras que en LPO se midió en saliva y para LEC y Pso se evaluó expresión génica en tejido lesional (Kreuter y cols., 2011; Polesello y cols., 2017). Considerando lo anterior, se requieren estudios que vinculen la expresión local y sistémica de HBD-1 para mejorar el entendimiento del papel funcional de sus polimorfismos genéticos, particularmente en vitiligo.

Los niveles de HBD-1 no se asociaron a ninguna de las características clínicas de vitiligo (Cuadro 11) excepto para la actividad de la enfermedad, en la que observamos una disminución de HBD-1 en pacientes con vitiligo activo con respecto al estable y al grupo control, pero no se observaron diferencias entre el segundo y tercer grupo (Figura 16), sugiriendo que los niveles sistémicos bajos de HBD-1 se relacionan con la actividad de la enfermedad. Una posible explicación para este resultado podría ser que la activación excesiva de la subpoblación de CTLs CD8⁺, característica de vitiligo activo (Harris 2016; Yang y cols., 2015), requiere de un alto consumo de glucosa (Jones y Thompson, 2007), afectando negativamente la producción de HBD-1 que también es dependiente de glucosa (Barnea y

cols., 2008; Brauner y cols., 2014). Por el anterior motivo, podemos sugerir que los bajos niveles de HBD-1 son consecuencia y no causa de la actividad de vitiligo, en especial considerando que los niveles de HBD-1 no se asociaron a los polimorfismos genéticos analizados.

8.3. VDR, vitamina D y vitiligo

La vitamina D es una molécula de función inmunoreguladora que se ha asociado a diversas enfermedades autoinmunes de manera directa o indirecta. Vitiligo no es la excepción y se cuenta con un generoso acervo de reportes del efecto de la vitamina D y/o su receptor en la susceptibilidad al desarrollo de la patología y/o a sus manifestaciones clínicas, mismos que utilizamos para comparar los resultados de la presente investigación.

En general, los polimorfismos analizados del gen *VDR* no se asociaron con la susceptibilidad a desarrollar vitiligo (Cuadro 13) lo cual difiere de lo reportado en población Turca, Rumana y Egiptia donde se ha asociado al genotipo CC de *TaqI* (tt) en la primera y de *ApaI* (aa) en las restantes, con incremento del riesgo de desarrollar vitiligo (Aydingöz y cols. 2012; Birlea y cols., 2006; Sobeih y cols., 2016). Difiere además de lo reportado en población China donde los tres polimorfismos (*BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) se asociaron a protección, aclarando que para *ApaI* el efecto lo ejerce el genotipo AA (AA), sugiriendo que el genotipo CC (aa) confiere riesgo al presentarse con mayor frecuencia en pacientes (Li y cols., 2012). Asimismo, en nuestro estudio no observamos asociación de los haplotipos del gen *VDR* con vitiligo (Cuadro 14) contrario al estudio de Aydingöz y cols. (2012) donde se muestra una disminución en la frecuencia del haplotipo GAT en pacientes. Es probable que las diferencias arriba citadas puedan deberse a la variación en el componente genético de las poblaciones o a la adiversidad de la

unión a su ligando, la vitamina D, que es variable de acuerdo a latitud, debido a que repercute en la exposición a la luz solar necesaria para la síntesis endógena de dicha vitamina (Hayes y cols., 2015).

Continuando con la parte genética, no observamos asociación de los polimorfismos en *VDR* con las características clínicas de vitiligo evaluadas, con excepción del polimorfismo *BsmI* que se asoció con la presencia de fenómeno de Koebner (Cuadros 15, 16 y 17). Debido a que la anterior característica tiene una relación positiva con la forma activa del vitiligo así como con su progresión a largo plazo (Khurram y cols., 2017), *BsmI* pudiera representar un factor predisponente para la progresión del vitiligo, a pesar de no estar relacionado con la aparición inicial del mismo.

En nuestro estudio encontramos una disminución de los niveles de vitamina D en pacientes con vitiligo comparado con controles sanos (Figura 17). Este resultado va acorde con el consenso general de que la insuficiencia de vitamina D se asocia a vitiligo (Doss y cols., 2015; Ibrahim y cols., 2018; Li y cols., 2012; Saleh y cols., 2013; Sobeih y cols., 2016). Por otro lado, algunos estudios sugieren que los niveles de VD no difieren entre casos y controles (Karagün y cols., 2016; Khurram y AlGhamdi, 2015; Xu y cols., 2012), contrastando incluso dentro de una misma población como el caso particular de Xu y cols. (2012) que en población China no encuentra asociación mientras que Li y cols. (2012) si la observan. Si bien lo anterior puede deberse a la falta de control de las variaciones estacionales y hábitos de toma de sol y los fototipos de los individuos, también puede deberse al método de medición de la vitamina D ya que hasta la fecha este es un motivo de controversia puesto que diversos métodos pueden generar resultados distintos (Dirks y cols., 2018).

No se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de vitamina D para las diferentes características clínicas de vitiligo (Cuadro 18), hallazgos similares han sido reportados en estudios previos en poblaciones Iraní, Hindú, Saudiarábiga y Egipcia (Beheshti y cols., 2014; Doss y cols., 2015; Khurram y AlGhamdi, 2015; Saleh y cols., 2013, respectivamente). Esto parece indicar que los niveles de vitamina D no tienen un efecto sobre la clínica del vitiligo, al margen de su asociación con el trastorno *per se*.

Con respecto a la asociación polimorfismo-niveles séricos, no se observó ninguna relación contrastando así con los resultados de Li y cols. (2012) y Sobeih y cols. (2016) que encontraron que la presencia del alelo A de *ApaI* se asocia a incremento en los niveles circulantes de vitamina D, asociado a su vez con el efecto protector del alelo también reportado en ambos estudios. No obstante, en el primer estudio el efecto se observa sólo en pacientes con vitiligo mientras que en el segundo se observa sólo en controles sanos, lo cual reitera el efecto de la variabilidad genética interpoblacional que, como ya se mencionó, puede ser la razón de la falta de asociación aquí reportada. Estudios posteriores en población Mexicana podrían mejorar el panorama aquí expuesto dado que este constituye el primero de ellos.

8.4. CAT, catalasa y vitiligo

El vitiligo se caracteriza por la disminución de la actividad enzimática de la catalasa y aumento de la concentración de su sustrato, H₂O₂, en el tejido afectado (Schallreuter y cols., 1991). Si bien la falta de actividad de la enzima puede ser atribuible a inhibición por exceso de sustrato, se ha observado que algunos polimorfismos genéticos también pueden afectarla (Liu

y cols., 2010; Mansuri y cols., 2017). A continuación discutimos los resultados obtenidos tras evaluar la actividad de la enzima y los polimorfismos en su gen en población Mexicana.

Primeramente, encontramos que el homocigoto TT en la posición -89 se asocia a un aumento del riesgo de 2.2 veces de desarrollar vitiligo (Cuadro 20), así como una tendencia similar, no significativa ($p=0.057$), para la presencia del alelo T. Estos resultados guardan similitud con lo reportado en poblaciones Italiana, China e Hindú (Caputo y cols., 2017; Liu y cols., 2010; Mansuri y cols., 2017), indicando que el alelo -89 T contribuye al riesgo a desarrollar vitiligo por encontrarse en región promotora del gen *CAT*, que se relaciona con una disminución de la tasa de transcripción del mismo (Mansuri y cols., 2017). Sin embargo, nuestro resultado difiere con lo encontrado en poblaciones Turca y Coreana en las que no se encontró asociación del polimorfismo -89 A/T con vitiligo (Akbas y cols., 2013; Park y cols., 2006). Estos resultados controversiales podrían ser atribuidos al rol de la etnicidad, que es evidente al observar las diferencias en la frecuencia del alelo T en los grupos control de las diferentes poblaciones arriba citadas (Akbas y cols., 2013; Caputo y cols., 2017; Liu y cols., 2010; Mansuri y cols., 2017; Park y cols., 2006).

El análisis del polimorfismo en el codón 389 (389 C/T) nos muestra una asociación del homocigoto TT con la disminución del riesgo de desarrollar vitiligo (RM=0.284) (Cuadro 20), similar a lo observado por Casp y cols. (2002) en población caucásica norteamericana para dicho genotipo, pero contrastante con el aumento de heterocigotos reportado en pacientes del mismo estudio y del estudio de Gavalas y cols. (2006) en población Inglesa; así como con la falta de asociación del resto de los estudios reportados en diferentes poblaciones (Akbas y cols., 2013; Birlea y cols., 2011; Bulut y cols., 2011; Caputo y cols., 2017; Em y cols., 2007; Liu y cols., 2010; Mehaney y cols., 2014; Park y cols., 2006). De acuerdo con el metaanálisis

de He y cols. (2015) que incluye los estudios arriba mencionados hasta 2013, el polimorfismo 389 C/T no está asociado con vitiligo, confirmado en los estudios italiano y egipcio (Caputo y cols., 2017; Mehaney y cols., 2014). Sin embargo, He y cols. (2015) también apuntan a la importancia de estudiar poblaciones latinas e hispanas, que se pone de manifiesto considerando nuestros resultados y sugieren el impacto de la etnicidad en el rol del polimorfismo 389 C/T.

Tomando en cuenta que el polimorfismo 389 C/T resulta en un cambio silencioso en el residuo de aspartato del codón 389 es poco probable que afecte la actividad de CAT directamente, por lo que se ha sugerido que el marcador podría estar ligado a otras mutaciones deletereas para la expresión de *CAT* o la actividad de catalasa (Gavalas y cols., 2006). En efecto, como se mencionó en el apartado de resultados, el polimorfismo 389 C/T se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el -89 A/T, corroborando el hallazgo de Liu y cols. (2010). Además, el haplotipo AT (-89 A y 389 T) se asoció a una disminución del riesgo a desarrollar vitiligo (Cuadro 16), similar a lo encontrado en Corea (Park y cols., 2006) pero distinto al reporte en China (Liu y cols., 2010).

En relación al polimorfismo 419 C/T, observamos una frecuencia más baja que lo reportado por Gavalas y cols. (2006) en población general que de hecho se asemeja a lo mencionado por Casp y cols. (2002) puesto que casi todos los sujetos son homocigotos para el alelo C (Cuadro 15), motivo por el cual el polimorfismo se descartó del análisis de haplotipos. La prácticamente nula presencia del polimorfismo, aunado a que se trata de un cambio silencioso en el residuo de leucina del codón 419 hacen complicado la determinación de su efecto en la expresión génica y/o proteica de la catalasa (Casp y cols., 2002).

Los polimorfismos analizados del gen *CAT* no se asociaron de manera individual con las características clínicas de vitiligo (Cuadros 22, 23 y 25), tal y como ha sido reportado previamente (Mansuri y cols., 2017; Mehaney y cols., 2014). Sin embargo, el análisis haplotípico indica que el haplotipo AC (-89 A, 389 C) está relacionado con protección a la forma activa del vitiligo (Cuadro 24), hallazgo que no se había reportado con anterioridad, y que sugerimos podría ser atribuible al efecto del alelo -89 A, debido a que su contraparte, -89 T, como ya se discutió arriba, se asocia a riesgo.

En relación a la actividad enzimática de catalasa en suero, observamos una disminución en el grupo de pacientes con vitiligo con respecto al grupo control sano (Figura 18), que coincide con el consenso general de la disminución en la actividad de catalasa en individuos con vitiligo (Arıcan y Kurutas 2008; Dammak y cols. 2009; Liu y cols., 2010; Mansuri y cols., 2017; Schallreuter y cols., 1991; Svarani y cols. 2009). Lo anterior corrobora en nuestra población la sugerencia de que la disminución de la catalasa incrementa la sensibilidad de los melanocitos a estrés oxidativo (Schallreuter y cols., 1991).

Por otro lado, no observamos relación entre la actividad de catalasa y las características clínicas de vitiligo que contrasta con la disminución de actividad de catalasa en pacientes con vitiligo activo y vitiligo generalizado comparado con aquellos con vitiligo estable y vitiligo localizado, respectivamente (Dammak y cols., 2009; Mansuri y cols., 2017). La anterior discrepancia puede deberse a factores medioambientales o bioquímicos propios de la poblaciones mencionadas ya que se sabe que la actividad de catalasa es susceptible de variación en función de factores tales como edad, actividad física, variación estacional y exposición a químicos (Kodydková y cols., 2014).

Finalmente, en nuestro estudio no se observó relación de los polimorfismos genéticos analizados del gen *CAT* con la actividad de catalasa en suero en pacientes con vitiligo y controles sanos, salvo por la disminución en pacientes con haplotipo AT (Cuadro 27). Lo anterior contrasta con previos estudios que asocian al alelo -89 T con la disminución de la actividad de catalasa en una manera dependiente de dosis en población China e Hindú (Liu y cols., 2010; Mansuri y cols., 2017), por lo que no podemos descartar que pueda ser atribuible al factor étnico, sobre todo si se toma en cuenta que entre las poblaciones mencionadas y la nuestra la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo mencionado (-89 A/T) es distinta. La disminución de la actividad de catalasa en pacientes con el haplotipo AT es difícil de explicar considerando que este mismo haplotipo confiere protección contra el desarrollo del vitiligo (Cuadro 21). Dicho hallazgo podría ser un efecto consecuente de la enfermedad y no debido al genotipo de *CAT*, fenómeno similar a lo observado con HBD-1. No obstante, estudios posteriores son necesarios para corroborar estos hallazgos, particularmente en población mexicana puesto que el presente estudio es el primero que se realiza en asociación con vitiligo.

9. CONCLUSIONES

- El polimorfismo -44 C/G del gen *DEFB1* se asocia con un incremento del riesgo a desarrollar vitiligo, mientras que el -20 G/A se asocia con protección.
- El haplotipo GGG se asocia con aumento de riesgo de vitiligo.
- Los pacientes con vitiligo presentan una disminución de HBD-1 sérica, la cual es más evidente en vitiligo activo.
- El genotipo heterocigoto del polimorfismo *BsmI* de *VDR* se asocia con presencia de fenómeno de Koebner.
- Los pacientes con vitiligo presentan una disminución de vitamina D sérica.
- El polimorfismo -89 A/T del gen *CAT* se asocia con riesgo a desarrollar vitiligo, mientras que el 389 C/T se asocia con protección.
- El haplotipo AT del gen *CAT* se asocia con protección contra vitiligo, mientras que el AC se asocia con protección contra vitiligo activo.
- Los pacientes con vitiligo muestran una disminución de la actividad de catalasa en suero.

10. PERSPECTIVAS

Tomando en cuenta las asociaciones reportadas en el presente estudio, consideramos que podría ser relevante el evaluar la expresión génica de los genes aquí estudiados, con el fin de corroborar el efecto funcional de los polimorfismos a nivel de lesión vitiliginosa así como en zona perilesional. Lo anterior debido a que no se observó relación entre los polimorfismos y los niveles séricos en las moléculas evaluadas, particularmente en HBD-1 y catalasa, en las que se observaron asociaciones de los polimorfismos con la susceptibilidad a vitiligo.

Este es el primer estudio que analiza los polimorfismos en *VDR* para las variables clínicas de vitiligo, por lo que se requiere de posteriores estudios que corroboren nuestros hallazgos en otras poblaciones, con el fin de explicar más a fondo su papel en vitiligo. Asimismo, al ser el primer estudio para *DEFBI/HBD-1*, se espera que nuestros resultados motiven la replicación del estudio en otras poblaciones a fin de determinar el papel de HBD-1 y/o sus polimorfismos genéticos en vitiligo.

Para las metas arriba planteadas sería altamente recomendable incrementar el número de individuos analizados, en especial en las pruebas de asociación genotipo/función, sobre todo para los polimorfismos de baja frecuencia.

Por otro lado, se podrían plantear estrategias terapéuticas con vitamina D y/o catalasa adecuadas para nuestra población tomando en cuenta nuestros resultados como estudio base, terapias que ya están siendo investigadas en otras poblaciones no sólo en el manejo del vitiligo sino para otras patologías autoinmunes.

11. REFERENCIAS

- Akbas H, Dertlioglu SB, Dilmec F, Balkan M (2013). No association between catalase (CAT) gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Turkish population. *Clin Ter*;164:e173-e177
- Arıcan O, Kurutas EB (2008). Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*;17:12-16
- Aydınöz IE, Bingül I, Doğru-Abbasoğlu S, Vural P, Uysal M (2012). Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in vitiligo. *Dermatology*;224:361-368
- Aydınöz IE, Kanmaz-Özer M, Gedikbaşı A, Vural P, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M (2015). The combination of tumor necrosis factor- α -308A and interleukin-10 -1082G gene polymorphisms and increased serum levels of related cytokines: susceptibility to vitiligo. *Clin Exp Dermatol*;40:71-77
- Barnea M, Madar Z, Froy O (2008). Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*;367:452-456
- Bauer G (2012). Tumor-cell protective catalase as a novel target for rational therapeutic approaches based on specific intercellular ROS signaling. *Anticancer Res*;32:2599-2624
- Beheshti A, Ghadami H, Barikani A, Haj Manouchehri F (2014). Assessment of vitamin D plasma levels in patients with vitiligo vulgaris. *Acta Med Iran*;52:601-606
- Birlea S, Birlea M, Cimponeriu D, Apostol P, Cosgarea R, Gavrilă L, *et al.* (2006). Autoimmune diseases and vitamin D receptor Apa-I polymorphism are associated with vitiligo in a small inbred Romanian community. *Acta Derm Venereol*;86:209-214
- Birlea SA, Jin Y, Bennett DC, Herbstman DM, Wallace MR, McCormack WT, *et al.* (2011). Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports XBP1, FOXP3, and TSLP. *J Invest Dermatol*;131:371-381

- Brauner H, Lüthje P, Grünler J, Ekberg NR, Dallner G, Brismar K, *et al.* (2014). Markers of innate immune activity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the effect of the anti-oxidant coenzyme Q10 on inflammatory activity. *Clin Exp Immunol*;177:478-482
- Bulut H, Pehlivan M, Alper S, Tomatir AG, Onay H, Yüksel SE, *et al.* (2011). Lack of association between catalase gene polymorphism (T/C exon 9) and susceptibility to vitiligo in a Turkish population. *Genet Mol Res*;10:4126-4132
- Caputo V, Niceta M, Fiorella S, La Vecchia M, Bastonini E, Bongiorno MR, *et al.* (2017). Vitiligo susceptibility and catalase gene (CAT) polymorphisms in sicilian population. *G Ital Dermatol Venereol*; Feb 15 doi: 10.23736/S0392-0488.17.05488-8
- Casp CB, She JX, McCormack WT (2002). Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res*;15:62-66
- Choi CW, Eun SH, Choi KH, Bae JM (2017). Increased risk of comorbid rheumatic disorders in vitiligo patients: a nationwide population-based study. *J Dermatol*;44:909-913
- Colotta F, Jansson B, Bonelli F (2017). Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun*;85:78-97
- Dammak I, Boudaya S, Ben Aldallah F, Turki H, Attia H, Hentati B (2009). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation at the tissue level in patient with stable and active vitiligo. *Int J Dermatol*;48:476-480
- Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E (2017). Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Immunol*;7:697
- Dicle O (2015). Assessment methods in vitiligo. *Pigmentary Disorders*;2:160
- Dirks NF, Ackermans MT, Lips P, de Jongh RT, Vervloet MG, de Jonge R, *et al.* (2018). The when what & how of measuring vitamin D metabolism in clinical medicine. *Nutrients*;10:E482
- Doss RW, El-Rifaie AA, Gohary YM, Rashed LA (2015). Vitamin D receptor expression in vitiligo. *Indian J Dermatol*;60:544-548

- Dwivedi M, Laddha NC, Arora P, Marfatia YS, Begum R (2013). Decreased regulatory T-cells and CD4(+) /CD8(+) ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*;26:586-591
- Eletto D, Chevet E, Argon Y, Appenzeller-Herzog C (2014). Redox controls UPR to control redox. *J Cell Sci*;127:3649-3658
- Em S, Laddha NC, Chatterjee S, Gani AR, Malek RA, Shah BJ, *et al.* (2007). Association of catalase T/C exon 9 and glutathione peroxidase codon 200 polymorphisms in relation to their activities and oxidative stress with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Res*;20:405-407
- Estrada-Aguirre JA, Osuna-Ramírez I, Prado-Montes de Oca E, Ochoa-Ramirez LA, Ramirez M, Magallon-Zazueta LG, *et al.* (2014). DEFB1 5'UTR polymorphisms modulate the risk of HIV-1 infection in Mexican women. *Curr HIV Res*;12:220-226
- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N (2015). Vitiligo. *Lancet*;386:74-84
- Ezzedine K, Lim KW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CC, *et al.* (2012). Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res*;25:E1-13
- García-Melendez ME, Salinas-Santander M, Sanchez-Dominguez C, Gonzalez-Cardenas H, Cerda-Flores RM, Ocampo-Candiani J, *et al.* (2014). Protein tyrosine phosphatase PTPN22 +1858C/T polymorphism is associated with active vitiligo. *Exp Ther Med*;8:1433-1437
- Gavalas NG, Akhtar S, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH (2006). Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun*;345:1586-1591
- Gey A, Diallo A, Seneschal J, Léauté-Labrèze C, Boralevi F, Jouary T, *et al.* (2013). Autoimmune thyroid disease in vitiligo: multivariate analysis indicates intricate pathomechanisms. *Br J Dermatol*;168:756–761
- Gil A, Plaza-Diaz J, Mesa MD (2018). Vitamin D: classic and novel actions. *Ann Nutr Metab*;72:87-95

- Gill L, Zarbo A, Isedeh P, Jacobsen G, Lim HW, Hamzavi I (2016). Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: a cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol*;74:295-302
- Goh BK, Pandya AG (2017). Presentations, signs of activity, and differential diagnosis of vitiligo. *Dermatol Clin*;35:135-144
- Goyal MM, Basak A (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*;1:888-897
- Grimes PE, Hamzavi I, Lebwohl M, Ortonne JP, Lim HW (2013). The efficacy of afamelanotide and narrowband UV-B phototherapy for repigmentation of vitiligo. *JAMA Dermatol*;149:68-73.
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P (1991). A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*;11:298-300,302
- Harris JE (2016). Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo. *Immunol Rev*;269:11-25
- Hayes CE, Huble SL, Moore JR, Barta LE, Praska CE, Nashold FE (2015). Vitamin D actions on CD4(+) T cells in autoimmune disease. *Front Immunol*;6:100
- He J, Li X, Li Y, Ren B, Sun J, Zhang W, *et al.* (2015). Lack of association between the 389C>T polymorphism (rs769217) in the catalase (CAT) gene and the risk of vitiligo: an update by meta-analysis. *Australas J Dermatol*;56:180-185
- Hewison M (2010). Vitamin D, immunity and human disease. *Clinic Rev Bone Miner Metab*;8:32
- Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*;279:32804-32812
- Ibrahim H, El Taieb M, El Gamel Z, El Saied AR (2018). Effect of narrow-band ultraviolet B on the serum of 25-hydroxyvitamin D in vitiligo patients. *J Cosmet Dermatol*; Mar 10 doi: 10.1111/jocd.12515
- Jin Y, Ferrara T, Gowan K, Holcomb C, Rastrou M, Erlich HA, *et al.* (2012). Next-generation DNA re-sequencing identifies common variants of TYR and HLA-A that modulate the risk of generalized vitiligo via antigen presentation. *J Invest Dermatol*;132:1730-1733

- Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, *et al.* (2007). NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*;356:1216-1225
- Jones RG, Thompson CB (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity*;27:173-178
- Kalus AA, Fredericks LP, Hacker BM, Dommish H, Presland RB, Kimball JR, *et al.* (2009). Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human *DEFBI* gene with expression and inducibility of multiple β -defensins in gingival keratinocytes. *BMC Oral Health*;9:21
- Karagün E, Ergin C, Baysak S, Erden G, Aktaş H, Ekiz Ö (2016). The role of serum vitamin D levels in vitiligo. *Postepy Dermatol Alergol*;33:300-302
- Karelson M, Silm H, Salum T, Kõks S, Kingo K (2012). Differences between familial and sporadic cases of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*;26:915-918
- Khurram H, AlGhamdi KM (2015). The relationship between the serum level of vitamin D and vitiligo: a controlled study on 300 subjects. *J Cutan Med Surg*;20:139-145
- Khurram H, AlGhamdi KM, Bedaiwi KM, AlBaladi NM (2017). Multivariate analysis of factors associated with the Koebner phenomenon in vitiligo: an observational study of 381 patients. *Ann Dermatol*;29:302-306
- Kim TH, Hong JM, Oh B, Cho YS, Lee JY, Kim H, *et al.* (2008). Genetic association study of polymorphisms in the catalase gene with the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthr Cartil*;16:1060-1066
- Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)*;60:153-167
- Kreuter A, Jaouhar M, Skrygan M, Tigges C, Stücker M, Altmeyer P, *et al.* (2011). Expression of antimicrobial peptides in different subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 65:125-133

- Krüger C, Schallreuter KU (2012). A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *Int J Dermatol*;51:1206-1212
- Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, Singh M, Patel HH, Agarwal N, *et al.* (2014). Association of neuropeptide Y (NPY), interleukin-1B (IL1B) genetic variants and correlation of ILB1 transcript levels with vitiligo susceptibility. *PLoS One*;9:e107020
- Le Poole C, Boissy RE (1997). Vitiligo. *Semin Cutan Med Surg*;16:3-14
- Li K, Shi Q, Yang L, Li X, Liu L, Wang L, *et al.* (2012). The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. *Brit J Dermatol*;167:815-821
- Liu L, Li C, Gao J, Li K, Zhang R, Wang G, Li C, *et al.* (2010). Promoter variant in the catalase gene is associated with vitiligo in Chinese people. *J Invest Dermatol*;130:2647-2653
- Manga P, Elbuluk N, Orlow SJ (2016). Recent advances in understanding vitiligo. *F1000Res*;5(F1000 Faculty Rev):2234
- Mansuri MS, Jadeja SD, Singh M, Laddha NC, Dwivedi M, Begum R (2017). The catalase gene promoter and 5'-untranslated region variants lead to altered gene expression and enzyme activity in vitiligo. *Br J Dermatol*;177:1590-1600
- Mansuri MS, Singh M, Jadeja SD, Gani AR, Patel R, Dwivedi M, *et al.* (2014). Could ER stress be a major link between oxidative stress and autoimmunity in vitiligo? *Pigmentary Disorders*;1:123
- Mehaney DA, Darwish HA, Hegazy RA, Nooh MM, Tawdy AM, Gawdat HI, *et al.* (2014). Analysis of oxidative stress status, catalase and catechol-O-methyltransferase polymorphisms in Egyptian vitiligo patients. *PLoS One*;9:e99286
- Milanese M, Segat L, Crovella S (2007). Transcriptional effect of DEFB1 gene 5' untranslated region polymorphisms. *Cancer Res*;67:5997
- Mohammed GF, Gomaa AH, Al-Dhubaibi (2015). Highlights in pathogenesis of vitiligo. *World J Clin Cases*;3:221-230

- Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ (1994). Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet*;55:981-990
- Németh BC, Várkonyi T, Somogyvári F, Lengyel C, Fehértemplomi K, Nyiraty S, *et al.* (2014). Relevance of α -defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes. *World J Gastroenterol*;20:9128-9137
- Nguyen CM, Beroukhim K, Danesh MJ, Babikian A, Koo J, Leon A (2016). The psychological impact of acne, vitiligo and psoriasis: a review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*;9:383-392
- Oh B, Kim SY, Kim DJ, Lee JK, Kimm K, Park BL, *et al.* (2007). Association of catalase gene polymorphisms with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *J Med Genet*;44:e62
- Park HH, Ha E, Uhm YK, Jin SY, Kim YJ, Chung JH, *et al.* (2006). Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Exp Dermatol*;15:377-380
- Pazgier M, Prah A, Hoover DM, Lubkowski J (2007). Studies of the biological properties of human β -defensin 1. *J Biol Chem*;282:1819-1829
- Penna G, Adorini L (2000). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*;164:2405-2411
- Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R, Biasotto M, Pozzato G, Ottaviani G, *et al.* (2017). DEFB1 polymorphisms and salivary hBD-1 concentration in oral lichen planus patients and healthy subjects. *Arch Oral Biol*;73:161-165
- Polonikov AV, Ivano VP, Solodilova MA, Kozhuhov MA, Panfilov VI (2009). Tobacco smoking, fruit and vegetable intake modify association between -21A/T polymorphisms of catalase gene and risk of bronchial asthma. *J Asthma*;46:217-224
- Prado-Montes de Oca E (2010). Human β -defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*;42:800-804

- Prado-Montes de Oca E, García-Vargas A, Lozano-Inocencio R, Gallegos-Arreola MP, Sandoval-Ramírez L, Dávalos-Rodríguez NO, *et al.* (2007). Association of β -defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*;142:211-218
- Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ, Picos-Cárdenas VJ, Figuera LE (2009). SNP 668C (-44) alters a NF- κ B1 putative binding site in non-coding strand of human β -defensin 1 (*DEFB1*) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol*;9:617-625
- Puri N, Mojamdar M, Ramaiah A (1987). In vitro growth characteristics of melanocytes obtained from adult normal and vitiligo subjects. *J Invest Dermatol*;88:434-438
- Reichert-Faria A, Tarlé RG, Dellatorre G, Mira MT, Silva de Castro CC (2014). Vitiligo - part 2 – classification, histopathology and treatment. *An Bras Dermatol*;89:784-790
- Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE, Vitiligo Working Group (2017). New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *J Am Acad Dermatol*;77:1-13
- Ruiz-Maldonado R, Tamayo Sánchez L, Velázquez E (1977). Epidemiology of skin diseases in 10,000 patients of pediatric age. *Bol Med Hosp Infant Mex*;34:137-161
- Saleh HM, Abdel Fattah NS, Hamza HT (2013). Evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D levels in vitiligo patients with and without autoimmune diseases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*;29:34-40
- Salinas-Santander M, Díaz-García D, Rojas-Martínez A, Cantú-Salinas C, Sánchez-Domínguez C, Reyes-López M, *et al.* (2012). Tumor necrosis factor- α -308G/A polymorphism is associated with active vitiligo vulgaris in a northeastern Mexican population. *Exp Ther Med*;3:893-897
- Sandrin-Garcia P, Brandão LA, Guimarães RL, Pancoto JA, Donadi EA, Lima-Filho JL, *et al.* (2012). Functional single-nucleotide polymorphisms in the *DEFB1* gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians. *Lupus*;21:625-631
- Schallreuter KU, Wood JM, Berger J (1991). Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*;97:1081-1085

- Shafia S, Qasim I, Aziz SA, Bhat IA, Nisar S, Shah ZA (2013). Role of Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in susceptibility to multiple myeloma in ethnic Kashmiri population. *Blood Cells Mol Dis*;51:56-60
- Sharma L, Bhawan R, Jain RK (2004). Hypoacusis in vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*;70:162-164
- Shin DM, Jo EK (2011). Antimicrobial peptides in innate immunity against Mycobacteria. *Immune Netw*;11:245-252
- Sobeih S, Mashaly HM, Gawdat H, Amr K, Hamid MF, Shaalan E (2016). Evaluation of the correlation between serum levels of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms in an Egyptian population. *Int J Dermatol*;55:1329-1335
- Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*;22:1928-1929
- Speeckaert R, van Geel N (2017). Vitiligo: an update on pathophysiology and treatment options. *Am J Clin Dermatol*;18:733-744
- Spritz RA, Andersen GH (2017). Genetics of vitiligo. *Dermatol Clin*;35:245-255
- Svarani PV, Babu NK, Gopal K, Rama Rao GR, Rao AR, Moorthy B, *et al.* (2009). Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*;75:268-271
- Srivastava S, Singh D, Patel S, Singh MR (2017). Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress and autoimmune disorders. *Int J Biol Macromol*;101:502-517
- Taïeb A, Picardo M (2010). Epidemiology, definitions and classification. In *Vitiligo*, M. Picardo, and A. Taïeb, eds. (Heidelberg: Springer Verlag), pp. 13–24
- Taïeb A, Picardo M, VETF Members (2007). The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res*;20:27-35
- Tarlé RG, Nascimento LM, Mira MT, Castro CC (2014). Vitiligo--part 1. *An Bras Dermatol*;89:461-470

- Tarnai I, Csordás M, Sükei E, Shemirani AH, Káplár M, Góth L (2007). Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus. *Free Radic Res*;41:806-811
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*;338:143-156
- Wang CQ, Cruz-Inigo AE, Fuentes-Duculan J, Moussai D, Gulati N, Sullivan-Whalen M, *et al.* (2011). Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. *PLoS ONE*;6:e18907
- Xie H, Zhou F, Liu L, Zhu G, Li Q, Li C, *et al.* (2016). Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity? *J Dermatol Sci*;81:3-9
- Xu X, Fu WW, Wu WY (2012). Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency in Chinese patients with vitiligo: a case-control study. *PLoS One*;7:e52778
- Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ (2007). Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des*;13:3131-3139
- Yang L, Wei Y, Sun Y, Shi W, Yang J, Zhu L, *et al.* (2015). Interferon-gamma inhibits melanogenesis and induces apoptosis in melanocytes: a pivotal role for CD8+ cytotoxic T lymphocytes in vitiligo. *Acta Derm Venereol*;95:664-670
- Zanin V, Segat L, Bianco AM, Padovan L, Tavares Nde A, Crovella S (2012). DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Clinics*;67:395-398
- Zhou L, Shi YL, Li K, Hamzavi I, Gao TW, Huggins RH, *et al.* (2015). Increased circulating Th17 cells and elevated serum levels of TGF-beta and IL-21 are correlated with human non-segmental vitiligo development. *Pigment Cell Melanoma Res*;28:324-329
- Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM (2015). Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol*;214:329-348

12. ANEXOS

12.1. Formato de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA AUTORIZACION DE PARTICIPACION EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “EFECTO DE LAS VARIACIONES EN LOS GENES *DEFB1*, *VDR* Y *CAT* Y LOS NIVELES CIRCULANTES DE B-DEFENSINA 1, VITAMINA D Y CATALASA EN LA PREDISPOSICIÓN A VITILIGO” V.1.0.

Declaraciones del Investigador responsable:

El presente trabajo de investigación se realizará dentro de los próximos 5 años, a partir de agosto del 2014, en el cual se analizarán genes de función inmune con el fin de detectar variaciones genéticas que en población sinaloense pudieran asociarse a resistencia o susceptibilidad a vitiligo. El estudio se realiza sin fines de lucro tanto para el investigador como para el participante y los resultados obtenidos no representarán un beneficio directo para los pacientes a corto plazo, sin embargo es punto de inicio de futuros estudios de riesgo familiar y de diseño de posibles fármacos.

Del participante se tomarán 5 ml de sangre venosa, procedimiento que involucra un riesgo físico poco frecuente, llamado moretón o hematoma, derivado de una inadecuada toma de la muestra. De la sangre se obtendrá el ADN (el material genético) y el suero, mismos que se almacenarán por duplicado en congeladores del Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán (HGC), y para asegurar la confidencialidad y anonimato de los pacientes las muestras de ADN se identificarán con un código registrado en una base de datos física y electrónica en conformidad con las regulaciones de la Norma Mexicana NOM-168-SSA1-1998, con la posibilidad de salir del estudio si el participante o sus familiares así lo desean; y con el compromiso que una vez concluido el estudio todas las muestras se eliminarán en hipoclorito de sodio al 6%.

También deseo agregar lo importante que resulta hoy en día la colaboración de otros investigadores del tema dentro y fuera del país. En ese sentido, las muestras de ADN saldrán del hospital siempre y cuando lo autorice el participante y que haya un convenio de colaboración interinstitucional, aclarando que la muestra y su información generada estará siempre bajo la responsabilidad de investigadores altamente capacitados y de experiencia reconocida.

Durante el análisis de laboratorio pueden ocurrir dificultades técnicas que impidan la detección de las variaciones buscadas, siendo la escasa calidad del ADN obtenido la limitante más frecuente. Por lo que en algunas ocasiones será necesario localizar al paciente para una segunda toma de muestra de sangre.

Deseo agregar si usted en algún momento durante el estudio tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como paciente de un estudio de investigación puede ponerse en contacto con el Comité de Ética Médica en Investigación del Hospital General de Culiacán, con el Dr. Elmer López Meza en la dirección: Juan Aldama S/N, esquina con Estado de Nayarit, Colonia Rosales, Código Postal 80230, Culiacán, Sinaloa y al teléfono 6677169810, ext. 179, dentro del horario de 8:00 a 14:30

<u>Dr. Jesús Salvador Velarde Félix</u> Nombre y Firma del Responsable	_____
<u>M.C. Luis Antonio Ochoa Ramírez</u> Contacto Secundario	Tel. (667) 716 8560 ext. 196 _____ Cel. 667 152 9884 No. Teléfono

Comentarios del individuo participante:

De acuerdo a los requerimientos de la COFEPRIS, la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos en sus artículos 4, 5, 6, 8, 18, 19a; el Convenio sobre los Derechos Humanos y la Biomedicina en su artículo 10 y la NOM-12-SSA3-2012 en su artículos 10.7, 10.8, 12.1, 12.2 y 12.3; ya explicados por el investigador, autorizo al Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán "Dr. Bernardo J Gastélum" para que haga uso de mi material genético para investigar exclusivamente la asociación de variaciones en genes de función inmune con vitiligo.

El investigador responsable se ha comprometido que no se me identificará en las presentaciones de sus resultados, tanto académicas como científicas, asimismo me proporcionará información reciente y relevante de mi padecimiento, asesoría e incluso los resultados si así lo deseo.

Mi firma al pie de este documento constituye mi reconocimiento de que los beneficios, riesgos y las limitaciones de mi participación fueron explicados a mi satisfacción y que se me ha otorgado una copia de este documento.

_____	_____	_____		
Apellido Paterno	Apellido Materno	(Paciente) Nombre (s)		
_____	_____	Género	Masculino	Femenino
Fecha de Nacimiento	Lugar de Nacimiento			
_____	_____	_____		
No. Teléfono	Domicilio	Firma		
_____		_____		
(Testigo No. 1) Nombre		Domicilio/ Teléfono		
_____		_____		
(Testigo No. 2) Nombre		Domicilio/ Teléfono		

CEDULA DE REGISTRO PARA PACIENTES CON VITILIGO

Folio: _____

Fecha: __/__/____

Nombre _____

Género Masc. Fem. Fecha de nacimiento __/__/____

Lugar de nacimiento _____

Domicilio actual _____ Tel. _____

Escolaridad _____ Ocupación _____

Estado civil: Soltero Casado Divorciado Viudo Hijos: No 1 2 3 o más

Médico responsable actual _____

Forma de detección del caso Consulta Contactos Invitación poblacional

Fecha de inicio del padecimiento __/__/____ y sitio corporal _____

Fecha de diagnóstico __/__/____ Realizó diagnóstico _____

Tipo de vitiligo Loc. Disem. Gral. Topografía _____

Evolución 3 meses 6 meses 1 año Estable Activo

Tratamiento de inicio y duración _____

Tratamiento actual y tiempo _____

Detonante: Stress Lesión Enfermedad Embarazo Otro _____

Familiares con vitiligo 1er grado 2do grado 3er grado

Otra enfermedad:

Tiroiditis autoinmune Hipoparatiroidismo Diabetes mellitus Dermatitis atópica

Artritis reumatoide Anemia perniciosa Enf. de Addison Lupus eritematoso

Psoriasis Melanoma Hipoacusia Otras

Especifique _____

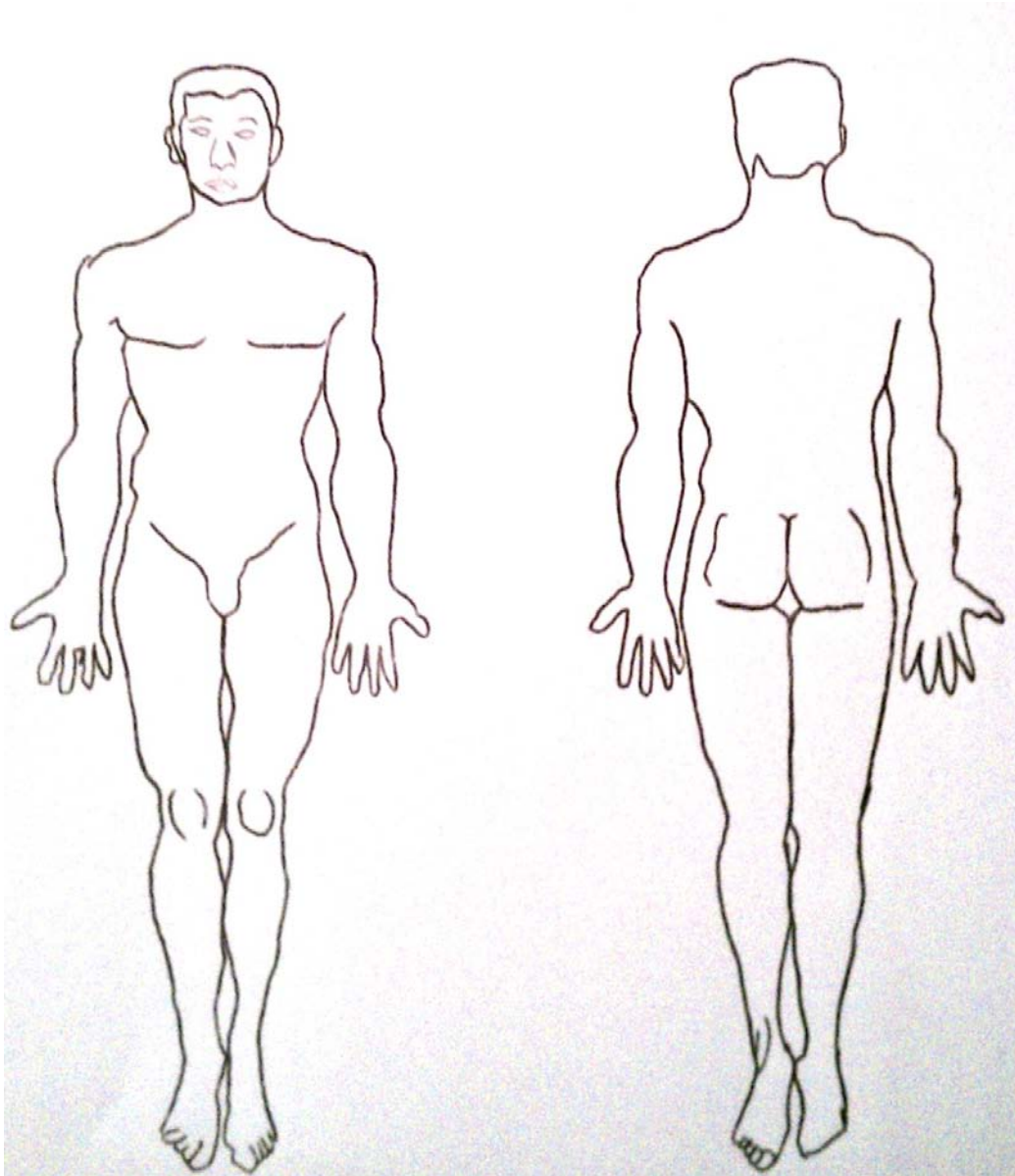
Bebe Si No Fuma Si No Trabajo/exp. solar Si No

Observaciones

Diagrama Dermatológico

Folio: _____

Fecha: -- / -- / -----

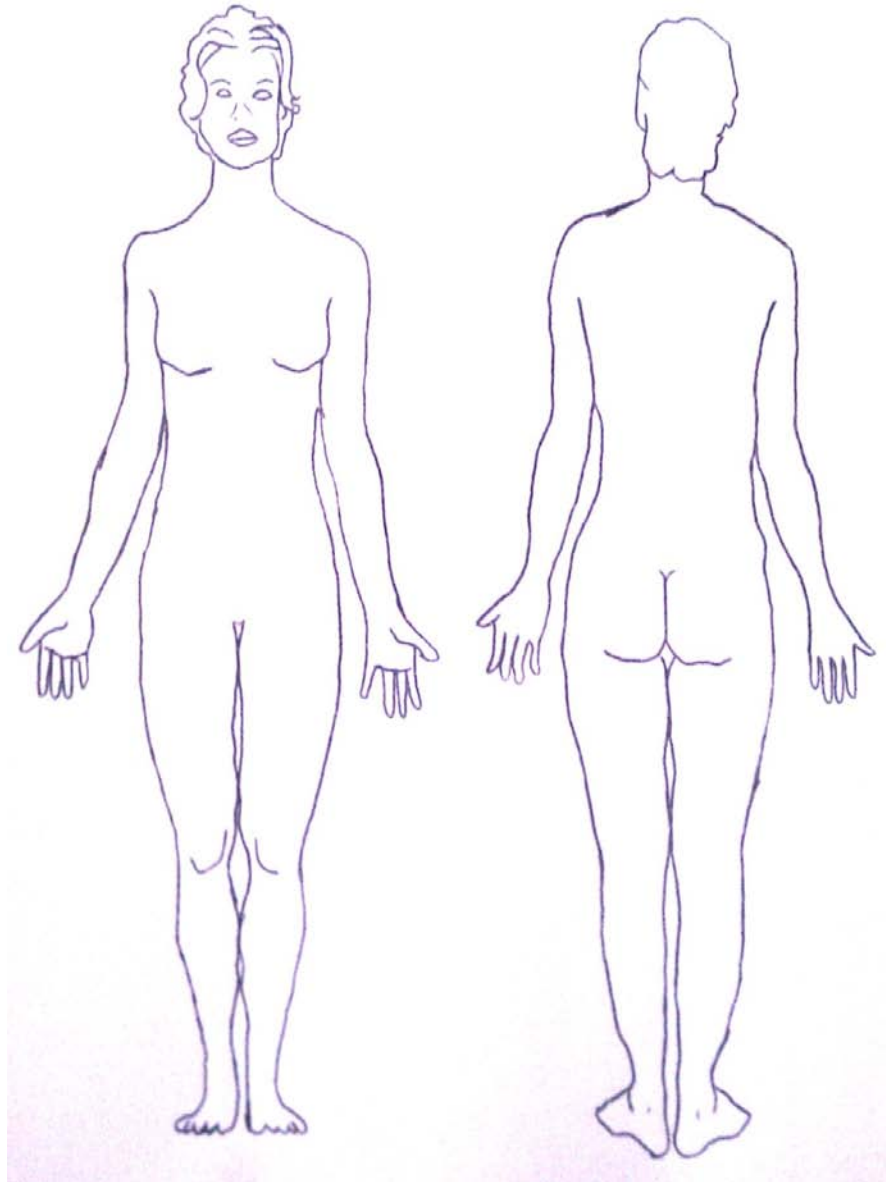


Comentarios

Diagrama Dermatológico

Folio: _____

Fecha:
__ / __ / ____



Comentarios

13. SIGLAS Y ABREVIATURAS

1,25D ₃	1,25-dihidroxitamina D ₃
25D ₃	25-hidroxitamina D ₃
μl	Microlitros
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Péptido antimicrobiano
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
C	Citosina
CAI	Comorbilidad autoinmune
CAT	Catalasa
CCR6	Receptor de quimiocina CC 6
CD	Cluster de diferenciación
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CTL	Linfocito T citotóxico
CXCL10	Ligando/quimiocina CXC 10
CXCR3	Receptor de quimiocina CXC 3
Cyp27b1	Citocromo p450 27b1 ó 25-hidroxitamina D ₃ 1-alfa-hidroxilasa
Cyp2R1	Citocromo p450 2R1 o vitamina D 25-hidroxilasa
DA	Dermatitis atópica
DBP	Proteína de unión a vitamina D
<i>DEFB1</i>	Gen de la beta-defensina 1
DT1	Diabetes tipo 1

DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHW	Equilibrio de Hardy Weinberg
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Fe	Hierro
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
FOXP3	Forkhead box P3
FQ	Fibrosis quística
G	Guanina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBD-1	Beta-defensina 1
HD	Defensina humana
HGC	Hospital General de Culiacán
HFV	Historia familiar de vitiligo
HLA	Antígeno leucocitario humano
HNP	Péptido de neutrófilo humano
HSP	Proteína de choque térmico
IC	Intervalo de confianza
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LEC	Lupus eritematoso cutáneo

LES	Lupus eritematoso sistémico
LL	Lepra lepromatosa
LPO	Liquen plano oral
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minuto
ml	Mililitro
NBUVB	Luz ultravioleta B de banda estrecha
NFκB	Factor nuclear κB
ng	Nanogramo
NK	Citolítica natural
NLRP	Proteína con dominios NACHT, LRR y PYD
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
OONO ⁻	Peroxinitrito
pb	Pares de bases
p.ej.	Por ejemplo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pso	Psoriasis
PTH	Hormona paratiroidea
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22
RE	Retículo endoplásmico
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
RM	Razón de momios
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNP	Polimorfismo de nucleótido sencillo
SOD	Superóxido dismutasa

SPSS	Paquete estadístico para ciencias sociales
T	Timina
Th	Linfocito T cooperador
TLR	Receptor tipo toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador
TSLP	linfopoyetina estromal tímica
TYR	Tirosinasa
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
VIDA	Actividad de vitiligo (<i>vitiligo disease activity</i>)
VD	Vitamina D
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta a vitamina D
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XBP1	Proteína 1 de unión a X-box

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la lesiones vitiliginosas	12
Figura 2. Clasificación clínica del vitiligo	15
Figura 3. Vitiligo bajo luz ultravioleta	17
Figura 4. Mecanismo de destrucción del melanocito en vitiligo	21
Figura 5. Función biológica de la beta-defensina 1 (HBD-1)	27
Figura 6. Mapa del gen de la beta-defensina (<i>DEFB1</i>)	28
Figura 7. Metabolismo de la vitamina D	32
Figura 8. Mecanismo molecular de acción de la vitamina D	33
Figura 9. Funciones inmunorreguladoras de la vitamina D y su receptor	36
Figura 10. Mapa del gen del receptor de vitamina D (<i>VDR</i>)	37
Figura 11. Funciones bioquímica y biológica de la catalasa	40
Figura 12. Mapa del gen de la catalasa (<i>CAT</i>)	43
Figura 13. Identificación de genotipos	53
Figura 14. Esquema metodológico general	54
Figura 15. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1)	61
Figura 16. Niveles de beta-defensina 1 (HBD-1) y actividad de vitiligo	62
Figura 17. Niveles séricos de vitamina D	70
Figura 18. Niveles de actividad enzimática de catalasa	78

Índice de cuadros

Cuadro 1. Estudios de beta-defensina (HBD-1) y los polimorfismos en la 5'UTR de su gen en enfermedades autoinmunes	30
Cuadro 2. Estudios de vitamina D y de los polimorfismos <i>BsmI</i> , <i>ApaI</i> y <i>TaqI</i> del gen <i>VDR</i> en vitiligo	39
Cuadro 3. Estudios de catalasa y de sus polimorfismos genéticos en vitiligo	45
Cuadro 4. Condiciones para el análisis por PCR-RFLP de los genes <i>DEFB1</i> , <i>VDR</i> y <i>CAT</i>	52
Cuadro 5. Características clínicas y demográficas de los pacientes con vitiligo incluidos en la presente investigación	55
Cuadro 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>DEFB1</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	57
Cuadro 7. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en <i>DEFB1</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	57
Cuadro 8. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>DEFB1</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo	58
Cuadro 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>DEFB1</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio	59
Cuadro 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>DEFB1</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner	60
Cuadro 11. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1) de acuerdo a características demográficas y clínicas de los pacientes con vitiligo	63

Cuadro 12. Niveles séricos de beta-defensina 1 (HBD-1) de acuerdo a los genotipos y haplotipos de <i>DEFB1</i>	64
Cuadro 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	65
Cuadro 14. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	66
Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo	67
Cuadro 16. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio	68
Cuadro 17. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner	69
Cuadro 18. Niveles séricos de vitamina (VD) de acuerdo a características demográficas y clínicas de pacientes con vitiligo	71
Cuadro 19. Niveles séricos de vitamina D de acuerdo a los genotipos y haplotipos de <i>VDR</i>	72
Cuadro 20. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	73
Cuadro 21. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo y controles sanos	74
Cuadro 22. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo al género e historia familiar de vitiligo	75

Cuadro 23. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a su actividad, tipo clínico y tipo de inicio	76
Cuadro 24. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo activo y estable	77
Cuadro 25. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>CAT</i> en pacientes con vitiligo de acuerdo a positividad a comorbilidades autoinmunes y fenómeno de Koebner	77
Cuadro 26. Niveles de actividad enzimática de la catalasa (<i>CAT</i>) en suero de acuerdo a características demográficas y clínicas de pacientes con vitiligo	79
Cuadro 27. Niveles de actividad sérica de catalasa de acuerdo a los genotipos y haplotipos de <i>CAT</i>	80

Participación en congresos y publicaciones

Congresos:

- Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa, Septiembre 2014.
- 1er Simposium Aplicación de la Biología Molecular e Inmunohistoquímica en el Cáncer. Culiacán, Sinaloa, Febrero 2015.
- Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa, Octubre 2015.
- Primer Congreso Internacional de Biomedicina Molecular. Mazatlán, Sinaloa, Noviembre 2015.
- Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa. Mazatlán, Sinaloa, Septiembre 2016.
- XLI Congreso Nacional de Genética Humana. León, Guanajuato, Noviembre 2016.
- 5th Latin American Congress on Autoimmunity. Cancún, Quintana Roo, Noviembre 2017.

Publicaciones:

- Intervirology 2015; 58: 357-362, doi: 10.1159/000443374
- Rev Mex Urol 2018; 78: 419-424, doi: 10.24245/revmexurol.v78i6.2419
- Dermatología CMQ 2018 (aceptado, archivo aún no disponible)
- **Clin Exp Dermatol 2018 Jun 20, doi: 10.1111/ced.13697** (para titulación)



Otorgan el presente **Reconocimiento**

A: Denisse Stephania Becerra Loaiza, Luis Antonio Ochoa Ramirez and Jesús Salvador Velarde Félix

ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES EN EL

Por su Participación con la Ponencia: "ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO TaqI DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D EN PACIENTES CON VITILIGO", Dentro del marco del Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa, celebrado los días 25 y 26 de Septiembre de 2014 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

Dra. Dolores Manjarrez Álvarez
Directora de Vinculación
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Dr. Leonardo Germán Gandarilla
Rector
Universidad Politécnica de Sinaloa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A través de la Unidad Académica
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
Y
EL HOSPITAL CIVIL DE CULIACAN
Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a: *MC. Luis Antonio Ochoa Ramirez*

Por su valiosa participación como ponente en el 1er Simposium APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR E INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CANCER realizado el 20 y 21 de Febrero de 2015 en Culiacán, Sinaloa, México

ATENTAMENTE
"SURSUM VERSUS"
Culiacán, Rosales, Sinaloa, México. 21 de Febrero de 2015

Erika María Celis Aguilera
Dra. Erika María Celis Aguilera
COORDINADORA DE POSGRADO

Dr. Jesús Israel Martínez Félix
DIRECTOR DE CIDOCI

Dra. Carmen Beatriz Caballero-Rodríguez
Dra. Carmen Beatriz Caballero-Rodríguez
COORDINADORA DEL SIMPOSIUM



EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A: Luis Antonio Ochoa Ramírez, Sylvia Páz Diaz Camacho, Denisse Stephania Becerra Loaiza, Luis Alfonso Servín Vázquez, Ana Sylvia Aguilar Sarmiento, Victor Fernando Muñoz Estrada, Jesús Salvador Velarde Félix.

Por su Participación con la Ponencia: Análisis de los Polimorfismos en la Región 5'UTR del Gen DEFB1 en Pacientes con Vitiligo. En modalidad: Oral. Dentro del marco del Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores en el estado de Sinaloa, celebrado los días 1 y 2 de Octubre de 2015 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

Dra. Dolores Manjarrez Álvarez
Directora de Vinculación
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Dr. Leonardo Germán Gandarilla
Rector
Universidad Politécnica de Sinaloa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA

OTORGA LA PRESENTE

Constancia

A

OCHOA RAMÍREZ LUIS ANTONIO, DÍAZ CAMACHO SYLVIA PÁZ,
BECERRA LOAIZA DENISSE STEPHANIA, SERVÍN VÁZQUEZ LUIS ALFONSO,
AGUILAR SARMIENTO ANA SYLVIA, MUÑOZ ESTRADA VÍCTOR FERNANDO,
VELARDE FÉLIX JESÚS SALVADOR.

POR SU PARTICIPACIÓN COMO **PONENTES** EN EL **TRABAJO LIBRE**
Análisis de los polimorfismos en la región 5'UTR
del gen DEFB1 en pacientes con vitiligo.

PRESENTADO EN EL

PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENCIÓN
"SARSUM VERSUS"
CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 29 DE NOVIEMBRE DE 2015

DR. JUAN ELIJO GUERRA LIERA
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Sylvia Paz Díaz Camacho
DRA. SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR

CONACYT

4 ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES EN EL ESTADO DE SINALOA

EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Luis Antonio Ochoa Ramírez, Sylvia Páz Díaz Camacho, Denisse Stefania Becerra Loaiza, Luis Alfonso Servín Vázquez, Jorge Guillermo Sánchez Zazueta, Jesús Salvador Velarde Félix

Por su participación con la ponencia: **Análisis del polimorfismo BsmI del gen del Receptor de vitamina D en pacientes con vitiligo** en modalidad: Ponencia dentro del marco del Cuarto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Sinaloa, celebrado los días 21 y 22 de septiembre de 2016 en la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa, México.

Mtro. Martín Wirocur Iparraguirre
Director de Vinculación
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

M.C. José Isidro Osuna López
Rector
Universidad Politécnica de Sinaloa

5th Latin American Congress on
Autoimmunity
Cancun, Mexico, 26-29 November 2017



CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

This is to certify that

L.A. Ochoa-Ramírez, S.P. Díaz-Camacho, D.S. Becerra-Loaiza, V.F. Muñoz-Estrada,
S.G. Cázarez-Salazar, J.J. Ríos-Tostado, J.G. Sánchez-Zazueta, J.S. Velarde-Félix

presented the abstract entitled

ANALYSIS OF CATALASE GENETIC POLYMORPHISMS AND ENZYMIC ACTIVITY IN MEXICAN VITILIGO PATIENTS

as a poster presentation at the

5th Latin American Congress on Autoimmunity
Cancun, Mexico | November 26-29, 2017

Prof. Luis Javier Jara Quezada
MD, MaMCR, MaACR
LACA 2017 Congress Chairman

Prof. Yehuda Shoenfeld
MD, FRCP, MaACR
LACA 2017 Honorary Chairman

laca.lasvies.com

XLI Congreso Nacional de

Genética Humana
León, Guanajuato 9 - 12 Noviembre 2016

ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA, A.C.

La Asociación Mexicana de Genética Humana

Otorga la presente constancia a:
Ochoa Ramírez Luis Antonio, Díaz Camacho Sylvia Páz,
Becerra Loaiza Denisse Stephania, Servín Vázquez Luis Alfonso,
Sánchez Zazueta Jorge Guillermo,
Velarde Félix Jesús Salvador

Por la presentación del trabajo libre en modalidad Oral:
ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) EN PACIENTES CON VITILIGO

León, Guanajuato 12 de noviembre de 2016

DRA. DORIS DEL C. FINO ESCALANTE
Presidente AMGH

DR. RODRIGO ELBI CASTELLANOS
Secretario AMGH

Stromal Cell-Derived Factor-1-3'A Polymorphism Favors HIV-1 Infection in Mexican Women

Jesús Salvador Velarde-Félix^{a-c} Silvestre Guadalupe Cázarez-Salazar^{a, b}
Sylvia Páz Díaz-Camacho^b Ignacio Osuna-Ramírez^b Luis Antonio Ochoa-Ramírez^b
Jorge Guillermo Sánchez-Zazueta^c Martín Ramírez^d

^aCentro de Medicina Genómica, Hospital General de Culiacán 'Dr. Bernardo J. Gastélum', Servicios de Salud de Sinaloa, ^bMaestría y Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, ^cUnidad Académica Escuela de Biología, Cuerpo Académico Inmunogenética y Evolución UAS-CA-265, Universidad Autónoma de Sinaloa, and ^dLaboratorio de Histocompatibilidad del Hospital General de Culiacán 'Dr. Bernardo J. Gastélum', Servicios de Salud de Sinaloa, Culiacán, Mexico

Key Words

Stromal cell-derived factor-1-3'A · HIV-1 · HIV/AIDS · CD4+ T lymphocytes · Viral load

Abstract

Objective: To evaluate the association of the stromal cell-derived factor-1 (SDF1)-3'A polymorphism to HIV-1 infection, CD4+ T-lymphocyte counts, and viral load levels in a northwestern Mexican population. **Methods:** We investigated allele and genotype frequencies of the SDF1-3'A polymorphism in 634 mestizo individuals from Northwest Mexico (204 HIV-1 infected persons, 256 uninfected blood donors, and 174 uninfected female sex workers) by the PCR-RFLP method and compared them using a χ^2 test. We also searched for correlations between the polymorphism and CD4+ T lymphocyte and viral load counts. **Results:** No differences were observed in the frequencies of alleles and genotypes between patients and controls. However, in female pa-

tients we found a significantly increased prevalence of both the A allele and GA heterozygous genotype compared to male patients, female blood donors, and female sex workers. **Conclusion:** Here we describe the association of the SDF1-3'A polymorphism with HIV-1 infection only in women, but not to CD4+ T-lymphocyte categories, viral load levels in patients with HIV-1/AIDS, or to exposure levels in female sex workers.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

The World Health Organization (WHO) in its last report about the global HIV/AIDS epidemic estimated 2.1 million people were newly infected and 1.5 million people

J.S.V.-F. and S.G.C.-S. contributed equally to this work.

KARGER 125

© 2016 S. Karger AG, Basel
0300-5526/16/0586-0357\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/int

Jesús Salvador Velarde-Félix
Centro de Medicina Genómica
Hospital General de Culiacán 'Dr. Bernardo J. Gastélum'
Juan Aldama y Nayarit s/n. Col. Rosales, Culiacán, Sinaloa, CP 80230 (Mexico)
E-Mail jsvelfe@hotmail.com



Study on vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urinary tract infections conducted in Northwestern Mexico

Estudio de los polimorfismos del gen del receptor de vitamina D en pacientes del noroeste de México con infección urinaria

Denisse Stephania Becerra-Loaiza,¹ Jorge Guillermo Sánchez-Zazueta,² Luis Antonio Ochoa-Ramírez,¹ Ismael Velarde-Rodríguez,³ José Rodríguez-Millán,⁴ Jesús Salvador Velarde-Félix^{1,2,5}

Abstract

OBJECTIVE: To evaluate the influence of the polymorphisms of the vitamin D receptor gene (FokI: rs2228570, BsmI: rs1544410, ApaI: rs7975232, and TaqI: rs731236) on the clinical parameters of patients with urinary tract infections.

MATERIALS AND METHODS: A comparative, prospective, and cross-sectional study was conducted at the *Hospital General de Culiacán Dr. Bernardo J. Gastélum* within the time frame of August 2016 to July 2017. The polymorphisms were detected through the polymerase chain reaction-restriction fragment length method in 119 patients diagnosed with urinary tract infection and in 206 individuals with no urinary tract infection. The data analysis was carried out using the χ^2 and odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95%CI). The logistic regression method, adjusted by age and sex, was employed to evaluate the relation between clinical characteristics and genotypes, utilizing the STATA version 13.0 program. Statistical significance was set at a $p < 0.05$.

RESULTS: We found differences in the prevalence of the CA-ApaI genotype between the study groups. The FokI and BsmI polymorphisms and the TGAT and CGCT haplotypes were associated with certain clinical characteristics.

CONCLUSIONS: A possible link between the vitamin D receptor gene and bacterial urinary tract infection in a Mexican population was suggested.

KEYWORDS: Vitamin D receptor; Urinary tract infection; Polymorphisms; Haplotypes.

Resumen

OBJETIVO: Evaluar la influencia de los polimorfismos del gen del receptor de vitamina D (FokI: rs2228570, BsmI: rs1544410, ApaI: rs7975232 y TaqI: rs731236) en los parámetros clínicos de pacientes con infección de la vía urinaria.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio comparativo, prospectivo y transversal, llevado a cabo en el Hospital General de Culiacán Dr. Bernardo J. Gastélum, entre agosto de 2016 y julio de 2017. Los polimorfismos se detectaron mediante reacción en cadena de la polimerasa PCR. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de χ^2 y la razón de probabilidades (OR), con intervalo de confianza de 95% (IC95%); con la intención de evaluar la relación entre las características clínicas y los genotipos se implementó la prueba de regresión logística ajustada por edad y sexo, con el programa STATAv13.0. Se consideró estadísticamente significativo el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS: El corte con enzimas de restricción se efectuó en 119 pacientes con diagnóstico de infección de la vía urinaria y en 206 individuos sin infección. Se encontraron diferencias en la prevalencia del genotipo CA-ApaI en ambos grupos de estudio. Los polimorfismos FokI y BsmI, y los haplotipos TGAT y CGCT se asociaron con algunas características clínicas.

CONCLUSIONES: Se sugiere un posible vínculo entre el gen del receptor de vitamina D y las infecciones bacterianas de la vía urinaria en la población mexicana.

PALABRAS CLAVES: Receptor de vitamina D; infección de la vía urinaria; polimorfismos; haplotipos.

¹ Postgraduate Degree in Biomedical Sciences, Chemical-Biologic Sciences Faculty.

² Immunogenetic and Evolution Academic Body UAS-CA-265, Biology Faculty.

³ Medicine Faculty, Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

⁴ Department of Internal Medicine.

⁵ Department of Genomic Medicine.

Hospital General de Culiacán Dr. Bernardo J. Gastélum, Culiacán, Sinaloa.

Received: July 2018

Accepted: October 2018

Correspondence


Jesús Salvador Velarde Félix
jvselve@hotmail.com

This article should be cited as

Becerra-Loaiza DS, Sánchez-Zazueta JG, Ochoa-Ramírez LA, Velarde-Rodríguez I, Rodríguez-Millán J, Velarde-Félix JS. Study on vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urinary tract infections conducted in Northwestern Mexico. *Rev Mex Urol*. 2018 nov-dic;78(6):419-24.

DOI: <https://doi.org/10.24245/rev-mexurol.v78i6.2419>

Association of human beta-defensin 1 gene polymorphisms with nonsegmental vitiligo

L. A. Ochoa-Ramírez,¹  D. S. Becerra-Loaiza,¹ S. P. Díaz-Camacho,¹ V. F. Muñoz-Estrada,² E. R. Ríos-Burgueño,² E. Prado-Montes de Oca,³ H. Rangel-Villalobos⁴ and J. S. Velarde-Félix^{1,5,6}

¹Faculty of Chemical and Biological Sciences; ²Center of Research and Teaching in Health Sciences (CIDOCS) and ⁵Faculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan, Sinaloa, Mexico; ³Personalized Medicine National Laboratory (LAMPER), Medical and Pharmaceutical Biotechnology, Research Center in Technology and Design Assistance of Jalisco State (CIATEJ), National Council of Science and Technology (CONACYT), Jalisco, Mexico; ⁴Molecular Genetics Research Institute, University of Guadalajara (CUCH-UdeG), Ocotlan, Jalisco, Mexico; and ⁶General Hospital of Culiacan, Servicios de Salud Sinaloa, Culiacan, Mexico

doi:10.1111/ced.13697

Summary

Background. Vitiligo is a pigmentation disorder of autoimmune aetiology. Polymorphisms in beta-defensin genes have been linked to a predisposition to some autoimmune disorders.

Aim. To evaluate the role of polymorphisms in *DEFB1*, the gene encoding for human beta-defensin (HBD)-1 and its 5' untranslated region in nonsegmental vitiligo.

Methods. In total, 354 participants [171 patients with non-segmental vitiligo and 183 age and sex-matched healthy controls (HCs)], were genotyped by the PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. For 80 of these individuals (40 patients and 40 HCs) serum HBD-1 was also measured by ELISA.

Results. The -44 G allele, CG genotype and GGG haplotype increased the risk for vitiligo ($P < 0.02$ in all cases), whereas the -20 AA genotype seems to be protective ($P = 0.04$). Serum HBD-1 levels were lower in patients with vitiligo than in HCs ($P < 0.01$), as well as in patients with active vitiligo compared with those with stable vitiligo and with HCs ($P < 0.05$ in both cases).

Conclusion. Our results suggest that *HBD-1* and its gene polymorphisms may modulate vitiligo susceptibility and/or disease activity. This is the first report, to our knowledge, of the association of serum HBD-1 levels and *DEFB1* gene polymorphisms with vitiligo.

Introduction

Vitiligo is an acquired pigmentation disorder characterized by the loss of epidermal melanocytes and/or their function. It is a relatively common disorder, with a prevalence rate of 0.2–1%.¹ Although the exact

aetiology of vitiligo remains elusive, autoimmunity is believed to play an important role in disease pathogenesis, as vitiligo is often associated with autoimmune diseases.^{2,3} There is also evidence for a direct role for interferon- γ -producing CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the progression of vitiligo, corresponding to a T helper (Th)1 response.^{4,5} In addition, Th17 response has already been acknowledged to play an important role in vitiligo pathogenesis.^{5–7}

Th17 response is characterized by the elicitation of antimicrobial peptides (AMPs) through interleukin (IL)-17A, IL17F and IL-22 signalling, leading to localized inflammation.⁸ An excess of constitutively expressed AMPs such as human beta-defensin (HBD)-1 may also contribute to local inflammation; for HBD-1,

Correspondence: Dr Jesús S. Velarde-Félix, Faculty of Biology, Autonomous University of Sinaloa, Av. de las Américas y Blvd. Universitarios s/n, Ciudad Universitaria, Culiacan, Sinaloa, Mexico
E-mail: jsvelfe@hotmail.com

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflicts of interest.

Preliminary results were presented at the First International Congress of Molecular Biomedicine. Mazatlan, Sinaloa, Mexico, November 2015.

Accepted for publication 22 February 2018

this is due to its ability to chemoattract neutrophils, immature dendritic cells and T cells directly through chemokine receptor (CCR)6 signalling and indirectly by HBD-3 induction.⁹

Certain polymorphisms in *DEFB1*, the gene encoding for HBD-1, may affect its transcription rate and the expression of HBD-1 protein.^{10,11} In particular, polymorphisms in the 5' untranslated region (UTR) of *DEFB1* exert this effect by altering a putative transcription factor binding site for the nuclear factor- κ B p105 subunit.¹²

Considering autoimmunity, HBD-1 and its gene polymorphisms have been evaluated in psoriasis (PSO), type 1 diabetes (T1D), oral lichen planus (OLP), inflammatory bowel disease (IBD), and systemic and cutaneous lupus erythematosus (SLE and CLE, respectively), with variable degrees of association identified.^{11,13–18} However, to date, there are no similar studies regarding vitiligo susceptibility.

Considering the role of HBD-1 and its gene 5'UTR polymorphisms in autoimmune disease, we hypothesized that they may be involved in vitiligo pathogenesis and/or its clinical characteristics in a Mexican population.

Methods

The study was approved by the Biomedical Research Ethics Committee of the General Hospital of Culiacan, Sinaloa, México, where it was performed. Written informed consent was obtained from all participants.

Subjects

The study group consisted of 171 patients with non-segmental vitiligo (80 males, 91 females) who were referred to General Hospital of Culiacan, Sinaloa, Mexico. Vitiligo diagnosis was made by dermatologists based on clinical findings according to the classification of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference, Bordeaux, 2011.¹⁹ A questionnaire was prepared in order to identify relevant aspects such as the age of onset, anatomy of the lesions, disease activity, concurrent diseases and family background of vitiligo. For disease activity, disease was considered to be stable when repigmentation occurred or no new lesions had appeared in a time period of ≥ 1 year.

The healthy control (HC) group consisted of 183 sex-age matched individuals (90 males and 93 females) who had no vitiligo or any autoimmune diseases and did not have a family background of vitiligo.

Genetic analyses

Peripheral blood samples from participants were collected in tubes with EDTA anticoagulant, and DNA was isolated from the samples. Genotyping for the -52G/A (rs1799946), -44C/G (rs1800972) and -20G/A (rs11362) polymorphisms was performed following the protocol of Estrada-Aguirre *et al.*²⁰ A percentage (5%) of the genotypes was confirmed by sequencing of PCR products (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Serum analyses

Serum samples were separated from coagulated blood and stored at -70°C until use. HBD-1 levels were assessed in serum samples from 80 of the 354 participants (40 patients and 40 HCs; age range 18–45 years) by ELISA. All samples were analysed at the same time using an ELISA kit (HBD-1 ELISA Kit LS-F549; LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for the polymorphisms was calculated with the use of deFinetti software (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Haplotypes were constructed and analysed using SNPStats software (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).²¹ The remaining analyses were performed with SPSS Statistics (v20; IBM SPSS, Armonk, NY, USA). Briefly, conditional logistic regression was used to obtain age-sex adjusted ORs and 95% CIs for case–control comparisons. Associations of clinical variables with polymorphisms were evaluated by logistic regression. Group means differences in serum HBD-1 levels were analysed by Mann–Whitney *U*-test. Graphics were performed with GraphPad Prism (v6; GraphPad, La Jolla, CA, USA). $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Participant data

Clinical and demographical data of the 171 patients with nonsegmental vitiligo included in the present study are shown in Table 1. Genotype frequencies were in agreement with HWE in both the case and control groups.

Polymorphisms and vitiligo

Genotype frequencies were in agreement with HWE in both the case and control groups. As shown in

Table 2, both the -44 CG genotype and G allele frequencies were higher in patients with vitiligo, conferring a 1.77- and 1.83-fold increased risk of developing vitiligo, respectively ($P < 0.02$ for both), whereas the -20 AA genotype seems to be protective against vitiligo by $> 45\%$ ($P = 0.04$; OR = 0.53, 95% CI = 0.28–0.98). No statistically significant differences were observed between patients with vitiligo and HCs

Table 1 Clinical and demographical data of patients with vitiligo.

Characteristic	Total $n = 171$ (%)
Sex	
Male	80 (46.8)
Female	91 (53.2)
Onset	
Early (< 20 years old)	72 (42.1)
Late (\geq 20 years old)	99 (57.9)
Clinical type	
Focal†	8 (4.7)
Acrofacial	16 (9.3)
Vulgaris	133 (77.8)
Universalis	14 (8.2)
Disease activity	
Active (within 1 year)	98 (57.3)
Stable (\geq 1 year)	73 (42.7)
Family history of vitiligo*	97 (56.7)
Autoimmune disease	17 (9.9)
Koebner phenomenon	33 (19.3)

*Reported first-, second- and/or third-degree affected relatives; †bilateral lesions at one anatomical site (e.g. both eyelids).

Table 2 Allelic and genotypic frequencies of *DEFB1*-5'UTR polymorphisms in patients with vitiligo and healthy controls.

Genotype	wV ($n = 171$) n (%)	HCS* ($n = 183$) n (%)	P	OR (95% CI)†
-52 G/A (rs1799946)				
GG	81 (47.4)	89 (48.6)	–	Reference
GA	77 (45)	75 (41)	0.545	1.14 (0.75–1.74)
AA	13 (7.6)	19 (10.4)	0.411	0.71 (0.31–1.62)
A	0.30	0.31	0.806	1.05 (0.70–1.59)
-44 C/G (rs1800972)				
CC	82 (47.9)	111 (60.6)	–	Reference
CG	78 (45.6)	66 (36.1)	0.018	1.77 (1.10–2.85)
GG	11 (6.5)	6 (3.3)	0.103	2.35 (0.84–6.55)
G	0.29	0.21	0.010	1.83 (1.16–2.90)
-20 G/A (rs11362)				
GG	62 (36.2)	53 (29)	–	Reference
GA	81 (47.4)	87 (47.5)	0.271	0.76 (0.46–1.25)
AA	28 (16.4)	43 (23.5)	0.043	0.53 (0.28–0.98)
A	0.40	0.47	0.120	0.68 (0.42–1.10)

HCS, healthy controls; PwV, patients with vitiligo. *In agreement with Hardy–Weinberg equilibrium (-52G/A: $P = 0.59$, -44C/G: $P = 0.38$, -20G/A: $P = 0.53$); †adjusted OR and 95% CI for age and sex.

in allele and genotype frequencies of -52G/A. Furthermore, we found no association of -52G/A, -44C/G or -20G/A *DEFB1* polymorphisms with the clinical characteristics of vitiligo listed in Table 1 (onset, clinical type, disease activity, presence of autoimmune disease, Koebner phenomenon, sex and/or family history) (see Tables S1–S3).

DEFB1 haplotypes and vitiligo

Linkage disequilibrium was observed between the three polymorphisms ($D' > 0.99$, r^2 -52G/A: -44C/G = 0.15, r^2 -52G/: -20G/A = 0.34, r^2 -44C/G: -20G/A = 0.26). As shown in Table 3, three major haplotypes were found, of which GGG was more frequent in patients with vitiligo, being associated with a 1.66-fold increased risk for developing the disorder ($P = 0.01$). Haplotypes were not associated with any of the aforementioned clinical characteristics of vitiligo (data not shown).

Human beta-defensin-1 and vitiligo

Analysis of serum HBD-1 levels showed a significant difference between patient and HC groups, with the patient group having lower HBD-1 levels ($P = 0.001$) (Fig. 1a). When categorized by disease activity, patients with active vitiligo were found to have decreased levels of HBD-1 compared with patients with stable vitiligo ($P = 0.02$) and HCs ($P < 0.001$), although there was no difference between the stable vitiligo and HC groups (Fig. 1b). Serum HBD-1 levels were not associated with any other clinical characteristic nor with any *DEFB1* genotype, allele or haplotype (see Table S4).

Discussion

There is currently little information regarding the role of HBD-1/*DEFB1* in vitiligo. In the present study, we evaluated the role of serum HBD-1 levels and three *DEFB1* 5'UTR polymorphisms in vitiligo, based on their previously reported association with other autoimmune diseases.^{11,13–18}

We found that the G allele and CG genotype at position -44 and the GGG haplotype were associated with an increased risk of developing vitiligo (Table 2, Table 3). These findings are similar to previous reports in SLE, but different from reports on T1D, in which the allele and genotype appeared to have a protective effect.^{15,17} These results could be attributable to an increase in the transcription rate of *DEFB1* mRNA

Table 3 Haplotype frequencies of DEFBI-5' UTR polymorphisms in patients with vitiligo and healthy controls

Haplotype	PwV	HCS	P	OR (95% CI)
GCA	0.40	0.47	–	Reference
ACG	0.30	0.31	0.50	1.13 (0.8–1.59)
GGG	0.29	0.21	0.01	1.66 (1.13–2.45)
GCG	< 0.01	< 0.01	0.81	1.28 (0.17–9.34)

HCS, healthy controls; PwV, patients with vitiligo.

due to the presence of the -44 G allele, increasing constitutive HBD-1 production.^{10–12} This could also be relevant for SLE and T1D, as observed previously.^{15,17} Thus, our findings support the autoimmune hypothesis for vitiligo, considering the chemoattractant properties of HBD-1 for immature dendritic cells and memory T cells, which in the presence of 'danger' signals (e.g. oxidative stress, high levels of IL-6, IL-8 and heatshock protein 70) would promote initial autoantigen presentation and depigmentation flares, respectively,^{5,9} a model similar to that previously suggested by Prado-Montes de Oca *et al.* for atopic dermatitis.²²

Following age/sex adjustment, we found that the -20 AA genotype confers protection against vitiligo (Table 2), contrasting with previous observations for SLE, T1D and Crohn disease,^{15,17,23}; but in agreement with a report on AD, which found the -20 GG genotype to be a genetic risk factor.²² In this context, Zanin *et al.* mentioned that the -20 A allele appears to be related to lower both HBD-1 and gene expression at the tissue level,²³ which might also explain its role as a risk factor for human immunodeficiency virus infection.²⁰ Nevertheless, recent research has failed to prove such an effect on HBD-1 levels, meaning that the DEFBI -20G/A polymorphism needs to be investigated further regarding its functional role.¹¹

In contrast to the protective effect of the -52 A allele and the risk increase of the GCA haplotype observed for SLE,¹⁷ no association of -52G/A and the remaining haplotypes (GCA, ACG and GCG) with vitiligo was found in our study. This difference might be related to the fact that despite both diseases being autoimmune and having cutaneous manifestations, they are driven by distinct immunological components: vitiligo by CD8+ CTLs and SLE by antibodies.^{5,17} Nevertheless, we cannot discard the genetic differences between Mexican and Brazilian populations either, as both explanations could be pertinent to the rest of the aforementioned findings.

Regarding HBD-1 levels, they were unexpectedly lower in patients with vitiligo than in HCs (Fig. 1a), being similar to those for T1D but opposite to those

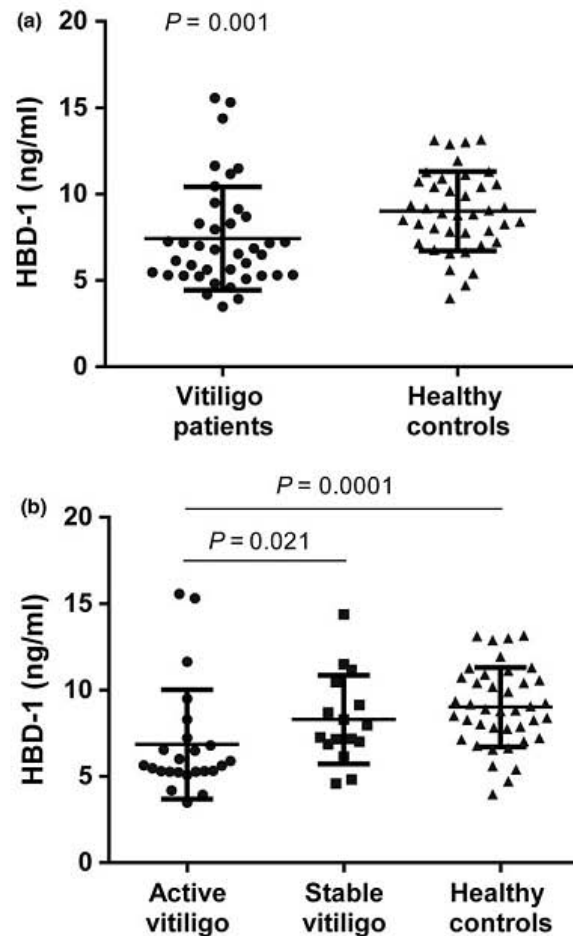


Figure 1 (a,b) Serum human beta-defensin (HBD)-1 levels in patients with vitiligo and in healthy controls (HCs). (a) HBD-1 levels of 40 patients with nonsegmental vitiligo vs. 40 HCs. (b) The patient group was subdivided according to disease activity into active ($n = 24$) and stable ($n = 16$) vitiligo, and their HBD-1 levels were compared against each other and against the HC group. HBD-1 levels were assessed by ELISA, values are expressed as the mean \pm SD.

for OLP, CLE and PSO.^{11,14,18} These relationships might be due to the similar aetiology of vitiligo and T1D, as both are mediated by CD8+ CTLs, in contrast to OLP, CLE and PSO, which involve chronic inflammation.^{11,14,18} However, the methodological approach for HBD-1 assessment may also be responsible; the previous study in T1D was performed on serum (as in our study), whereas the OLP study used saliva and the CLE and PSO studies used skin biopsies.^{11,14,18} Indeed, this could help to explain the lack of effect of DEFBI polymorphisms on systemic HBD-1 levels in our study, which contrasts with the effect observed in analyses of local

gene or protein expression.^{10,11,18} Therefore, it is necessary to perform studies linking local and systemic HBD-1 expression in order to better explain the functional role of its gene polymorphisms, particularly in vitiligo.

Interestingly, we found that patients with active vitiligo had lower HBD-1 levels than those with stable vitiligo, but no differences were observed between stable cases and HCs (Fig. 1b), thus suggesting that low systemic HBD-1 levels are related to disease activity. A possible explanation for this result is that the excessive CD8+ CTL subpopulation activation, characteristic of active vitiligo, demands high glucose expenditure, negatively affecting HBD-1 production, as it is also glucose-dependent.^{4,14,24,25} It is important to mention that we suggest this finding not as a causal effect but as a consequence of the disease, as we did not observe an association between serum HBD-1 levels and *DEFB1* gene polymorphisms, and the latter was not associated with disease activity or any other of the studied clinical characteristics of vitiligo (see Tables S1–S4).

Conclusion

It appears that *DEFB1* gene polymorphisms may modulate vitiligo risk whereas HBD-1 levels might be related to its pathogenesis. The present study is, to our knowledge, the first to associate HBD-1/*DEFB1* with vitiligo. Further genetic and/or functional studies on this defensin are required in order to define its exact role in vitiligo susceptibility and/or pathogenesis.

Acknowledgements

We thank Dr A. Aguilar and Dr L. Servín for their contribution in collecting the patients, and P. García for immunoassay technical support. This work was supported by the Autonomous University of Sinaloa-PROFAPI (Grants: PROFAPI2012/183 and PROFAPI2014/225).

What's already known about this topic?

- Vitiligo risk and pathogenesis have been observed to be influenced by immunogenetic factors.
- Polymorphisms in HBD-1 and its gene *DEFB1* have been associated with autoimmune diseases.

What does this study add?

- The -44 G allele, CG genotype and GGG haplotype increased the risk for vitiligo, whereas the -20 AA genotype seemed to be protective.
- Serum HBD-1 levels were lower in patients with vitiligo than in HCs.
- They were also lower in patients with active than those with stable vitiligo.
- This is the first study to propose a possible association between the *DEFB1* -44 (rs1800972) G allele and vitiligo risk, and between HBD-1 levels and disease activity.

References

- 1 Krüger C, Schallreuter KU. A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *Int J Dermatol* 2012; **51**: 1206–12.
- 2 Choi CW, Eun SH, Choi KH *et al*. Increased risk of comorbid rheumatic disorder in vitiligo patients: a nationwide population-based study. *J Dermatol* 2017; **44**: 909–13.
- 3 Avalos-Díaz E, Pérez-Pérez E, Rodríguez-Rodríguez M *et al*. Autoimmune vitiligo in rheumatic disease in the mestizo Mexican population. *Biomed Rep* 2016; **5**: 176–80.
- 4 Yang L, Wei Y, Sun Y *et al*. Interferon-gamma inhibits melanogenesis and induces apoptosis in melanocytes: a pivotal role for CD8+ cytotoxic T lymphocytes in vitiligo. *Acta Derm Venereol* 2015; **95**: 664–70.
- 5 Manga P, Elbuluk N, Orlow SJ. Recent advances in understanding vitiligo. *F1000Res* 2016; **5**: 2234.
- 6 Zhen Y, Yao L, Zhong S *et al*. Enhanced Th1 and Th17 responses in peripheral blood in active non-segmental vitiligo. *Arch Dermatol Res* 2016; **308**: 703–10.
- 7 Wang CQ, Cruz-Inigo AE, Fuentes-Duculan J *et al*. Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. *PLoS ONE* 2011; **6**: e18907.
- 8 Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP *et al*. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; **203**: 2271–9.
- 9 Yang D, Liu Z, Tewary P *et al*. Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 3131–9.
- 10 Kalus AA, Fredericks LP, Hacker BM *et al*. Association of a genetic polymorphism (-44 C/G SNP) in the human *DEFB1* gene with expression and inducibility of multiple β -defensins in gingival keratinocytes. *BMC Oral Health* 2009; **9**: 21.

- 11 Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R *et al.* DEFB1 polymorphisms and salivary hBD-1 concentration in oral lichen planus patients and healthy subjects. *Arch Oral Biol* 2017; **73**: 161–5.
- 12 Prado-Montes de Oca E, Velarde-Félix JS, Ríos-Tostado JJ *et al.* SNP 668 (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. *Infect Genet Evol* 2009; **9**: 617–25.
- 13 Ozlu E, Karadag AS, Ozkanli S *et al.* The investigation of antimicrobial peptides expression and its related interaction with methotrexate treatment in patients with psoriasis vulgaris. *Cutan Ocul Toxicol* 2017; **36**: 321–6.
- 14 Brauner H, Lüthje P, Grünler J *et al.* Markers of innate immune activity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the effect of the anti-oxidant coenzyme Q10 on inflammatory activity. *Clin Exp Immunol* 2014; **177**: 478–82.
- 15 Németh BC, Várkonyi T, Somogyvári F *et al.* Relevance of α -defensins (HNP1–3) and defensin β -1 in diabetes. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 9128–37.
- 16 Huang Y-P, Wang TY, Wang W *et al.* Association between genetic polymorphisms in DEFB1 and susceptibility to digestive diseases. *Med Sci Monit* 2015; **21**: 2240–50.
- 17 Sandrin-García P, Brandão LA, Guimarães RL *et al.* Functional single-nucleotide polymorphisms in the DEFB1 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians. *Lupus* 2012; **21**: 625–31.
- 18 Kreuter A, Jaouhar M, Skrygan M *et al.* Expression of antimicrobial peptides in different subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 2011; **65**: 125–33.
- 19 Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T *et al.* Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; **25**: E1–13.
- 20 Estrada-Aguirre JA, Osuna-Ramírez I, Montes Prado, de Oca E *et al.* DEFB1 5'UTR polymorphisms modulate the risk of HIV-1 in Mexican women. *Curr HIV Res* 2014; **12**: 220–6.
- 21 Solé X, Guinó E, Valls J *et al.* SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; **22**: 1928–9.
- 22 Prado-Montes de Oca E, García-Vargas A, Lozano-Inocencio R *et al.* Association of β -defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; **142**: 211–18.
- 23 Zanin V, Segat L, Bianco AM *et al.* DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; **67**: 395–8.
- 24 Harris JE. Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo. *Immunol Rev* 2016; **269**: 11–25.
- 25 Jones RG, Thompson CB. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* 2007; **27**: 173–8.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Allelic and genotypic frequencies of DEFB1 5'UTR polymorphisms in patients with vitiligo according to sex and family history of vitiligo.

Table S2. Allelic and genotypic frequencies of DEFB1 5'UTR polymorphisms in patients with vitiligo according to disease activity, clinical type, and type of onset.

Table S3. Allelic and genotypic frequencies of DEFB1 5'UTR polymorphisms in patients with vitiligo according to positivity to autoimmune comorbidity and Koebner phenomenon.

Table S4. Human beta-defensin 1 (HBD1) levels according to the demographic and clinical characteristics of vitiligo.