



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la especialidad de Dermatología

“Análisis de la expresión de microRNA-146a y microRNA 126 exosomal en vitíligo vulgar y su relación con la actividad de la enfermedad”

Dra. Yuriria Asbel Gálvez Juárez

DIRECTOR CLÍNICO

Dr. Juan Pablo Castanedo Cázares

CODIRECTORA CLÍNICA

Dra. María Bertha Torres Álvarez

DIRECTOR METODOLÓGICO

Dr. Juan Diego Cortés García



Análisis de la expresión de microRNA-146a y microRNA 126 exosomal en vitíligo vulgar y su relación con la actividad de la enfermedad por Yuriria Asbel Gálvez Juárez se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Febrero 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL “DR. IGNACIO MORONES PRIETO”

Trabajo de investigación para obtener el diploma en la especialidad de Dermatología

“Análisis de la expresión de microRNA-146a y microRNA 126 exosomal en vitíligo vulgar y su relación con la actividad de la enfermedad”

Dra. Yuriria Asbel Gálvez Juárez

No. de CVU del CONACYT 970542; Identificador de ORCID 0000-0003-0158-6579

DIRECTOR CLÍNICO

Dr. Juan Pablo Castanedo Cázares

No. de CVU del CONACYT 49746; Identificador de ORCID 0000-0002-4291-2265

CO- DIRECTORA CLÍNICA

Dra. María Bertha Torres Álvarez

No. de CVU del CONACYT 121442; Identificador de ORCID 000-0002-9275-911

DIRECTOR METODOLÓGICO

Dr. Juan Diego Cortés García

No. de CVU del CONACYT 418575; Identificador de ORCID 0000-0002-1150-3514

SINODALES

Dra. Liliana Elizabeth Espinal Pérez

Presidente

Dra. Urania del Rocío Castillo Cruz

Sinodal

Dra. Diana Vianey Hernández Blanco

Sinodal

Dra. Esther Layseca Espinosa

Suplente

RESUMEN

Introducción. El vitíligo es un trastorno de hipopigmentación en el que las células blanco son los melanocitos. Los melanocitos son más susceptibles al daño, debido a polimorfismos en genes relacionados con mecanismos antioxidantes. Esto condiciona un desequilibrio en el potencial óxido-reducción que induce su apoptosis. Luego de su destrucción, se liberan proteínas modificadas que eran parte del melanosoma como Melan-A, MART1 y glucoproteína 100 y señales moleculares asociadas a daño como las vesículas conocidas como exosomas que transportan microRNAs, mismos que son capaces de modificar el fenotipo de las células que los internalizan mediante la inhibición de genes. En relación con su papel en vitíligo los microRNA que se estudian en la presente tesis, los relacionados con activación endotelial y con inflamación son microRNA 126 y microRNA 146a, respectivamente.

Objetivo: Determinar la expresión de microRNA-146a y microRNA-126 exosomal en el suero de pacientes con vitíligo vulgar y su relación con la actividad de la enfermedad.

Sujetos y métodos: Se reclutaron 10 pacientes con vitíligo activo que recibieron tratamiento con dexametasona 4 mg tabletas durante 2 días consecutivos a la semana por 2 meses, a los cuales se les tomó una muestra de 5 mililitros para obtención de suero. Antes y después del tratamiento se les tomó la muestra sanguínea, para determinar los niveles de microRNA en suero por RT-qPCR., se realizó el mismo proceso para el grupo control de sujetos sanos.

Resultados: Los niveles de microRNA 146a se encuentran elevados en pacientes con actividad de vitíligo comparados con los controles sanos. Los niveles de microRNA 126 se encontraron disminuidos en pacientes con vitíligo activo comparados con el grupo de control sano. El tratamiento con minipulsos de dexametasona aumenta la expresión en suero de miRNA-126. Los niveles de microRNA146a, disminuyen con el tratamiento sistémico.

Conclusiones. Los niveles de microRNA126 son inversamente proporcionales a la actividad de la enfermedad, los niveles de microRNA 146a se relacionan de forma directamente proporcional a la actividad del vitíligo.

Palabras clave: Vitíligo, skin pigmentation, microRNAs

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Índice.....	2
Lista de cuadros.....	3
Lista de figuras.....	4
Lista de abreviaturas.....	5
Lista de definiciones.....	6
Dedicatorias.....	7
Antecedentes.....	8
Justificación.....	14
Pregunta de investigación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Sujetos y métodos.....	16
Análisis estadístico.....	20
Ética.....	21
Resultados.....	25
Discusión.....	31
Limitaciones y/o nuevas perspectivas de investigación.....	33
Conclusiones.....	34
Bibliografía.....	35
Anexo 1 (Hoja de recolección de datos).....	39
Anexo 2 Documento de consentimiento informado para el paciente.....	40

ANEXO 4

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Cuadro de variables en el estudio Página 17

Cuadro 2. Características clínicas y demográficas de los pacientes con vitíligoPágina 25

ANEXO 5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma del plan de trabajo... ..	Página 20
Figura 2. Análisis del fenotipo de los exosomas por citometría de flujo	Página 26
Figura 3. Microfotografía representativa de la microscopía electrónica de transmisión con unidad de barrido (sTEM)	Página 27
Figura 4. Expresión de los microRNAs exosomales en vitíligo	Página 28
Figura 5. Expresión de los microRNAs exosomales en vitíligo antes y después del tratamiento	Página 29
Figura 6. Correlación con tiempo de evolución y expresión de microRNA146a y microRNA 126	Página 29
Figura 7. Correlación con porcentaje de superficie corporal y expresión de microRNA146a y microRNA 126	Página 30

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **Mir:** MicroRNA
- **RNA:** Acido ribonucleico
- **VCAM:** Molécula de adhesión vascular
- **ICAM:** Molécula de adhesión intercelular
- **Nrf2-ARE/HO-1:** Factor nuclear E2 relacionado con el factor 2 elemento de respuesta antioxidante/hemo1 oxigenasa
- **UPR:** Proteínas no desdobladas
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **ATP:** Adenosintrifosfato
- **UVB-NB:** Ultravioleta B-Banda estrecha
- **pri-miRNA:** microRna primarios
- **RISC:** Proteína argonauta con el complejo multiproteico
- **TYRP1:** Proteína 1 relacionada con la tirosinasa
- **MITF1:** Factor de transcripción asociado a microftalmia
- **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **FGF:** Factor de crecimiento fibroblastos
- **VIDA:** Índice de Actividad de vitíligo
- **sTEM:** Microscopía electrónica de transmisión con unidad de barrido
- **IL1beta:** Interleucina 1 beta
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral
- **NFKB:** Factor nuclear kappa b
- **ACKR2:** Receptor atípico de quimiocinas 2
- **Mm:** Milímetros

LISTA DE DEFINICIONES

- **Vitíligo activo:** Presencia de manchas acrómicas que clínicamente se distingue por presentar patrón tricrómico de las lesiones, manchas en confeti, eritema perilesional y aumento en su diámetro.
- **Vitíligo estable:** Vitíligo sin datos de actividad
- **microRNA:** Subtipo de RNA no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud cuya función es modificar la expresión de genes en la célula donde se expresan
- **Manchas en confeti:** Máculas de 2-3 milímetros alrededor de una mancha acrómica de mayor tamaño
- **Eritema perilesional:** Enrojecimiento con descamación en la periferia de manchas acrómicas
- **Fenómeno de Koebner:** Reproducción de las manchas en sitios de traumatismos cutáneos
- **Apariencia tricrómica de las lesiones**
- **Acromía:** Pérdida de la totalidad del pigmento en la piel
- **VCAM:** Glucoproteína de adhesión celular en las células endoteliales humanas de 110 kDa
- **ICAM:** Glucoproteína de membrana con un dominio extracelular de membrana, es una molécula de adhesión celular expresada en leucocitos y células endoteliales activadas de 85 a 110 kDa. También se le conoce como CD54.
- **Melanosoma:** Organelo en el que se realiza la síntesis, almacenamiento y transporte de melanina que pueden llegar a medir hasta 500 nm.
- **Queratinocito:** Células epidérmicas que realizan síntesis de queratina
- **Melanina:** Polímero insoluble derivados de la tirosina que causa la pigmentación de la piel y pelo

DEDICATORIA

- A mis padres, en especial mi mamá quien siempre me apoyó en mi sueño de ser Dermatóloga
- A mis profesores de Dermatología del Hospital Central
- Al doctor Juan Pablo Castanedo Cázares y al doctor Juan Diego Cortés García por la paciencia y orientación brindada en éste trabajo de investigación

ANTECEDENTES

El vitíligo es una patología que cursa con despigmentación. Se considera autoinmune ya que las células del sistema inmune destruyen melanocitos y/o su desprendimiento de la membrana basal. Esto conduce a la disminución en la síntesis y transferencia de la melanina, por lo que ésta pérdida tiene como consecuencia el desarrollo de máculas acrómicas en piel.

Este trastorno afecta del 0.5 al 2% de la población general sin existir diferencia entre ambos sexos, aunque es más probable que las mujeres acudan a recibir atención médica, ya que a diferencia de los hombres éstas se preocupan más por su la enfermedad (1). La edad de presentación es variable, aunque hasta el 50% de los afectados inician con la enfermedad antes de los 20 años de edad (1).

1. Estrés oxidativo

Este es un factor endógeno que se ha descrito en los melanocitos de los pacientes con vitíligo. Se observa aumento en algunas enzimas que traducen estrés oxidativo, como son las especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo, singlete de oxígeno, anión superóxido). Estas se producen en condiciones normales como parte del metabolismo celular; sin embargo se han encontrado incrementadas en pacientes con vitíligo tanto en células de sangre periférica (2,3) como en melanocitos. Paradójicamente, la producción de melanina aumenta la concentración de estos aniones incrementando el estrés. Otras condiciones en las que se produce exceso de especies reactivas de oxígeno son durante la diferenciación, proliferación y apoptosis celular. Se han identificado otros factores que contribuyen a la elevación de especies reactivas como lo son anomalías en las vías antioxidantes (vía Factor nuclear E2 relacionado con el factor 2 elemento de respuesta antioxidante/hemo1 oxigenasa (Nrf2-ARE/HO-1) (4); y la disminución de enzimas como la catalasa y glutatión peroxidasa (5); además de otros antioxidantes no enzimáticos que afectan el equilibrio óxido reducción (6).

El daño al melanocito se desencadena por la acumulación de péptidos no procesados y algunas citocinas en el retículo endoplásmico, que conducen a la apoptosis y posteriormente a la exposición de sus antígenos. Esto despierta una respuesta inmune mediante la vía en contra de proteínas no desdobladas (UPR) (7). También se ha descrito que la calcireticulina proveniente del retículo endoplásmico de monocitos, macrófagos, células de Langerhans, linfocitos T, neutrófilos, cuya función es regular la concentración de calcio intracelular, se encuentra involucrada en la apoptosis del melanocito (7).

Otro factor involucrado es la disfunción mitocondrial que puede llevar a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, así como los defectos en su membrana, principalmente debido a la distribución de colesterol y cardiolipina (3). El daño oxidativo es también evidente en el DNA de pacientes con vitiligo, ya que existe aumento de 8-2dehidroxiguanosina en suero y piel, además de que algunos polimorfismos de vías involucradas para reparar el daño causado predisponen mayor riesgo de vitiligo, como el APE1-Asp148Glu (8). Además del melanocito, los queratinocitos adyacentes también se afectan produciendo daño a su membrana mitocondrial alterando la síntesis de lípidos (2).

Otros factores que se relacionan a la alteración de estrés oxidativo en melanocitos y queratinocitos son la activación de la vía dependiente de p53 y de RNASET2 (2), vías que son producidas en estrés oxidativo y que alteran la supervivencia celular.

Los factores exógenos incluyen radiación ultravioleta, infecciones, estrés emocional, anormalidades neurales, embarazo, fármacos, vacunación, exposición a citotóxicos como el fenol, hormonas, y fármacos (2).

Las moléculas liberadas del melanocito apoptótico mediante exosomas son reconocidas como antígenos debido a su modificación por el estrés oxidativo al que estuvieron expuestos, dando como resultado la pérdida de la tolerancia inmune ante éstos (7). La activación de células dendríticas cuando los neoantígenos son liberados de los exosomas, entre los que se incluye el Adenosintrifosfato (ATP), activarán la vía del inflamosoma criopirina y fomentará la maduración de la célula dendrítica (2). Como

consecuencia de esta interacción de la célula de Langerhans en la presentación de antígenos con linfocitos T, se incrementa la migración de linfocitos T residentes en zonas lesional y perilesional. Este proceso se estimula mediante la proteína de choque térmico 70, que aumenta la expresión de marcadores de maduración de las células de Langerhans. (9,10)

Los linfocitos T aumentan la expresión de proteína de choque térmico 70, generando un ciclo de retroalimentación positiva que induce la destrucción del melanocito. La proporción de linfocitos CD8 citotóxicos que se encuentran tanto en piel lesional como perilesional en vitíligo activo y estable, es mayor que la de CD4+, sobre todo en los casos de vitíligo activo (11).

Los antígenos contra los que se dirige la respuesta inmune incluyen a los que se encargan de la síntesis de melanina como Melan A/ tirosinasa, y la glucoproteína 100 (12).

Debido a que en su fisiopatogenia participan el estrés oxidativo y el sistema inmune, existen diversas modalidades de tratamiento dirigidas a esas causas. Sin embargo hasta hoy no existe un tratamiento completamente eficiente para ésta enfermedad. Algunas estrategias terapéuticas buscan reducir las especies reactivas de oxígeno, como la radiación ultravioleta. De igual forma, la repigmentación que ofrece el tacrolimus tópico también se debe a la reducción en el estrés oxidativo (2). Otras intervenciones incluyen la desactivación de la respuesta inmune, evitando la infiltración de células citotóxicas y favoreciendo el incremento de linfocitos T reguladores, como es el caso de UVB-Nb (2).

El éxito de los tratamientos depende del tiempo de evolución de los pacientes, ya que existe una menor tasa de repigmentación cuando la condición tiene más de un año de evolución (1). Esto se debe a que la extensión del daño celular se vuelve irreversible.

2. MicroRNA-146a

Los microRNA al igual que los RNA circulares y los RNA largos no codificantes, se encuentran en el grupo de RNAs no codificantes. En el 2015 existían cerca de 2000 tipos de microRNA humanos (13).

Están conformados por RNA de una sola cadena con 18 a 25 nucleótidos, que al unirse de forma no específica con RNA mensajeros regulan la expresión de genes. Son codificados en las regiones intergénicas e intrones del DNA, y generados mediante la vía RNA polimerasa III. Son importantes ya que aproximadamente el 60% de los genes de proteínas en los seres humanos están regulados mediante la participación de microRNAs (14).

Los microRNA provienen de la transcripción de secuencias más largas o microRna primarios (pri-miRNA), que son procesados en el núcleo por la enzima Drosha endonucleasa RNA III. Estos suceden a los premiRNA, que son transportados por el complejo exportina5/RAN-GTP hacia el citoplasma en donde la endonucleasa Dicer escinde el premiRNA para originar dos nucleótidos 3'. En su proceso de maduración se requiere la acción de una cadena de mirNA para ser transportada en la proteína argonauta con el complejo multiproteico (RISC) o complejo silenciador inducido por RNA.

Estudios previos han demostrado la participación de microRNA en vitiligo tanto en la vía del estrés oxidativo como en el desarrollo de autoinmunidad. En piel afectada se han encontrado elevados los miR-1, miR-133b, miR135a, miR-183, miR-190, miR-214, miR-301b, miR-30a-3p, miR-375, miR-487a, miR-517c, y miR-616 (15).

Estudios en cultivos celulares han observado relación entre la presencia de microRNAs y estrés oxidativo (16).

En cuanto a la severidad de la enfermedad por área de superficie corporal afectada, se ha documentado el posible papel de miR- 574-3p, miR-16, miR-19b, y miR-720 ya que se observó su aumento en suero de pacientes con vitiligo no segmentario, comparado con controles sanos (17).

Existe relación entre la elevación de ciertos microRNA como el microRNA16, y la actividad de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, CUCI y Crohn (17). El valor de miR-146a exosomal se encuentra aumentado en suero de pacientes con vitiligo vulgar comparado con sujetos sanos, además de que ya se ha establecido su incremento en pacientes con artritis reumatoide en células de sangre periférica (18). Otro de los microRNA que juega un papel importante en la fisiopatología del vitiligo es miR-155. El perfil de citocinas secretado por los melanocitos y queratinocitos induce su expresión, debido a que desregula el crecimiento de los linfocitos CD8 disminuyendo su expresión, aumentando el número de linfocitos T reguladores favoreciendo la proliferación de melanocitos (19). El MicroRNA 211 se encarga de promover la melanogénesis inhibiendo el receptor 2 de crecimiento transformante beta, que a su vez disminuye la expresión de las enzimas tirosinasa y TYRP1. El miR-25, se incrementa cuando existe estrés oxidativo siendo su gen blanco el MITF1 (factor de transcripción asociado a microftalmia) teniendo como consecuencia la disminución de la síntesis de melanina, y una mayor actividad en vitiligo (20).

Los miRs también podrían ser sujetos de blanco terapéutico ya que por ejemplo, la disminución del Mir-9 se asocia a la migración de melanocitos de la piel perilesional posterior al tratamiento con láser excimer (21).

3. MicroRNA-126

El miR-126 participa en la angiogénesis aumentando la expresión de factores de transcripción angiogénicos como son factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor de crecimiento fibroblastos (FGF). Su expresión es mayor en tejidos con alta vascularización como corazón y pulmón (22).

Las moléculas blanco de miR-126 son VCAM-1, e integrina alfa 6 por lo que traduce un papel importante en la angiogénesis y en la migración celular.

En vitiligo se ha encontrado en algunos estudios en el suero de pacientes afectados disminución en la expresión de este microRNA, desconociéndose si existe relación con la actividad de la enfermedad.

Debido a la pérdida de la adherencia de los melanocitos con los queratinocitos que existe en el vitíligo, se ha intentado demostrar la modificación en la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 (Molécula de adhesión vascular 1, e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) (23). Sin embargo, los niveles en piel sana son relativamente bajos, ya que, queratinocitos y melanocitos muestran escasa expresión (24).

Otros estudios no han encontrado diferencia en su cantidad en piel con fenómeno de Koebner y en lesiones estables. No obstante, se ha demostrado la disminución de la expresión tanto de ICAM-1 como VCAM-1 en la capa basal de la epidermis de piel lesional de pacientes sin progresión, comparada con piel sana (23), a diferencia del borde activo de las lesiones, en donde se ha demostrado aumento de la expresión de ICAM-1 en más capas de la epidermis (25). Existe la teoría que en las lesiones activas esté relacionado con la disminución de la expresión de miR-126, ya que las moléculas de adhesión VCAM1 e ICAM-1 están aumentadas por la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de células inflamatorias en la piel lesional.

El vitíligo es uno de los principales trastornos pigmentarios, caracterizado por recaídas frecuentes que traducen aumento en la actividad de la enfermedad. Clínicamente se manifiesta con aumento en el diámetro de las máculas despigmentadas, aparición de nuevas manchas en sitios de trauma (fenómeno de Koebner), o manchas nuevas de 3 a 5 mm en la periferia de manchas previas lo que se conoce como despigmentación en confetti. Los marcadores clínicos anteriormente descritos ayudan a instaurar de forma oportuna el tratamiento sistémico antiinflamatorio con corticoesteroides. El esquema de pulsos de dexametasona vía oral a dosis bajas de 2.5-10 mg durante dos días consecutivos a la semana, reduce la actividad del vitíligo hasta en el 91% de los casos. Por lo tanto, si fuera posible modificar la expresión de miR-146a y miR-126 exosomal por medio de transfección de su inhibidor y promotor respectivamente, en los pacientes con vitíligo estable, una vez disminuida la inflamación sistémica sería posible modular la actividad de la enfermedad y así favorecer la repigmentación.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, no existe ningún estándar diagnóstico no invasivo que nos permita determinar la actividad del vitíligo, de forma objetiva. El estándar diagnóstico para establecer la actividad de la enfermedad es la biopsia del borde de la lesión buscando el aumento en la expresión de los linfocitos CD8 mediante estudios de inmunohistoquímica. Se requiere de un marcador de actividad, que pueda obtenerse de forma sencilla con la intención de administrar tratamiento sistémico de forma oportuna al paciente que así lo amerite, ya que la terapéutica indicada para el paciente está determinada por la actividad o estabilidad del vitíligo.

Los miRNAs se han utilizado como marcadores de pronóstico y actividad en enfermedades neoplásicas tanto sólidas como hematológicas; así como en enfermedades inflamatorias de la piel, como el caso de psoriasis y dermatitis atópica. Los miRNAs exosomales tienen la característica de encontrarse en cualquier fluido corporal (suero, plasma, orina, sudor, saliva, etc.). Esto permite que su obtención sea mediante procedimientos menos invasivos, a diferencia de la biopsia. El miR-146a exosomal se encuentra aumentado en vitíligo. Existe evidencia in vitro de que la disminución de la expresión de miR-146a exosomal disminuye la proliferación de queratinocitos en pacientes con psoriasis.

Además, la supresión de miR-146a en cultivos celulares aumenta la expresión de ICAM y VCAM1, lo que sustentaría la existencia de una menor expresión de miR126, ya que el aumento del infiltrado inflamatorio estaría relacionado con la activación endotelial y la inflamación en lesiones con vitíligo, como lo han demostrado modelos in vitro. Por lo tanto, el aumento de ICAM1 en piel de vitíligo activo, podría traducir disminución de mir-126 y este a su vez podría implicar mayor actividad de la enfermedad.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe relación entre la expresión de miR-146a y miR-126 exosomales en pacientes con vitíligo y la actividad de la enfermedad?

HIPÓTESIS

El aumento de la expresión de miR-146a y la disminución de la expresión de miR-126 exosomales en suero de pacientes con vitíligo vulgar se relaciona con la actividad de la enfermedad.

OBJETIVOS

- Objetivo general

a) Determinar la expresión de miR-146a y miR-126 en el suero de pacientes con vitíligo estable y activo.

- Objetivos específicos

b) Comparar la expresión de miR-146a y miR-126 exosomal en suero de pacientes con vitíligo vulgar activo y vitíligo vulgar estable.

c) Evaluar la expresión de miR-146a y miR-126 exosomal en suero de pacientes con vitíligo activo, antes y después del tratamiento sistémico.

SUJETOS Y MÉTODOS

Diseño del estudio.

Tipo de estudio: analítico, prospectivo, antes y después.

Metodología.

Lugar de realización: Departamento de Dermatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Universo de estudio: Pacientes con vitíligo que acudan a valoración al Departamento de Dermatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

Criterios de selección:

a) Inclusión:

Pacientes con diagnóstico clínico de vitíligo activo y estable en regiones corporales proximales con superficie corporal afectada entre 10 a 30% de superficie corporal total

- Con edad de 18 a 60 años
- Sexo indistinto
- Sin tratamiento sistémico dos meses previos
- Firma de consentimiento informado para participar en el estudio

b) Exclusión

- Vitíligo segmentario, acrofacial y acral
- Pacientes con antecedente de infarto agudo al miocardio
- Pacientes embarazadas o en lactancia
- Antecedente de dermatosis inflamatorias (psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto)
- Antecedente de enfermedad mental o autoinmune
- Antecedente de enfermedad autoinmune

c) Eliminación (si aplica)

- Abandonar tratamiento
- Abandonar seguimiento
- No utilizar el tratamiento según lo indicado
- Uso de tratamientos diferentes a los indicados
- Fallecimiento durante el seguimiento.
- Embarazo durante el estudio
- Aparición de otras enfermedades autoinmunes durante su seguimiento

Variables en el estudio

- Variable Dependiente
- Variable Independiente
- Variables de Control (confusoras)

CUADRO 1: Cuadro de variables en el estudio

DEPENDIENTE				
VARIABLE	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Expresión de miR146a y miR126 exosomal	Expresión relativa del mir-146 a y miR126 exosomal en pacientes con vitiligo	0-infinito	Unidades relativas	Continua
INDEPENDIENTE				
Tratamiento	Administración de 4 mg vía oral de dexametasona en 2 días consecutivos semanales	0: No 1: Si	N/A	Dicotómica

Actividad de la enfermedad Determinada con Escala VIDA	Índice de actividad por la escala VIDA Lesiones en confetti, eritema perilesional en el margen, fenómeno de Koebner	-1: Estable por al menos un año y con repigmentación espontánea 0 : Estable por lo menos en el último año 1: Actividad en el último año 2: Actividad los últimos 6 meses 3: Actividad los últimos 3 meses 4: Actividad las últimas 6 semanas	+1 a +4	Nominal
DE CONTROL (CONFUSORAS)				
Sexo	Sexo del paciente	0: Hombre 1: Mujer	años	Nominal
Edad	Edad del paciente	18-60	años	Nominal
Variedad de vitiligo	Vitiligo vulgar en tronco	0: No 1: Si	N/A	Dicotómica

Tipo de muestreo. No aleatorizado consecutivo

Cálculo del tamaño de la muestra

Diferencia estimada en la expresión de algún miR, miR-146a y miR-126, exosomal ≈ 35%, alfa 0.05 y poder del 80%

$$n = 2 (Za + Zb)2S2 / d2$$

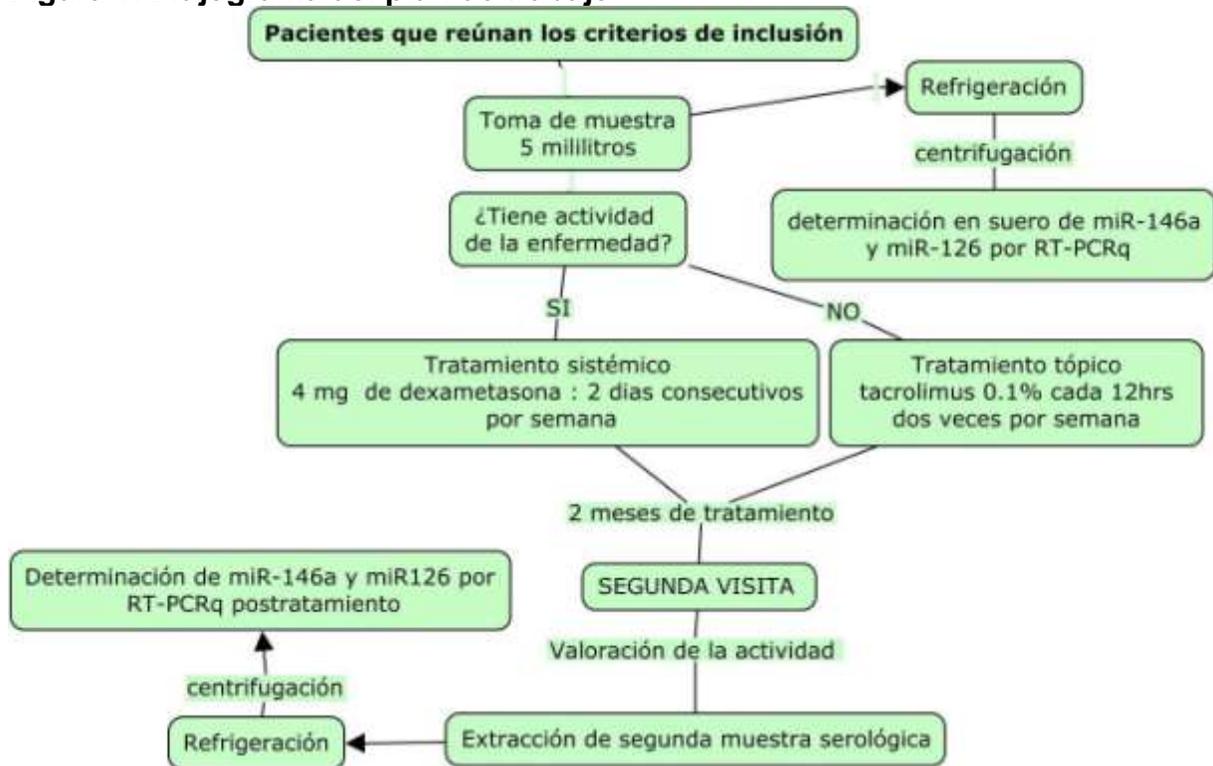
Tamaño de muestra ~ 20 pacientes en total

- a) 10 pacientes con vitíligo estable: a quienes se les tomó una muestra sanguínea en la primera valoración y otra muestra en la consulta de seguimiento a los 2 meses.
- b) 10 pacientes con vitíligo activo: a quienes se les tomó una muestra sanguínea en la primera valoración y se dió tratamiento con dexametasona 4 mg durante dos días seguidos a la semana. Se citaron a consulta subsecuente 2 meses después, en esa cita de seguimiento se les tomó otra muestra sanguínea.

Plan de trabajo

1. Reclutamiento de pacientes: a. Exploración física y recolección de historia clínica a través de entrevista personal.
b. Solicitud de consentimiento por escrito para participación en protocolo de investigación.
c. Toma de fotografías clínicas basales
d. Se recolectaron 5 ml de sangre en zona antecubital, posterior a antisepsia de la zona que se puncionó
2. Inicio de tratamiento con 4mg de dexametasona, dos días consecutivos por semana durante 8 semanas.
3. La muestra de sangre se centrifugó para obtener el suero.
4. Del suero se aislaron exosomas mediante el kit Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen, Life Technologies, California).
5. Se realizó la extracción de RNA de los exosomas mediante la técnica de Trizol-Cloroformo, posteriormente se determinará la expresión del miR-146a y miR-126 exosomal por RT-qPCR.
6. Posterior a los 2 meses de tratamiento se valoró la mejoría clínica y se tomarán 5 mL de sangre por venopunción.
7. Se repitieron los pasos 4 y 5.

Figura 1. Flujograma del plan de trabajo



ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La expresión relativa de miRNA-126 y miRNA-146a fueron analizados antes y después del tratamiento y comparado con controles sin dermatosis.

- T de Student para comparar entre vitíligo activo y estable
 - T de Student para comparar entre vitíligo antes y después del tratamiento.
 - Para la correlación: Pruebas de correlación de Pearson o Spearman
- Se consideró el valor de $P= 0.05$ para significancia estadística.

ÉTICA

La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. La presente tesis se considera una investigación con riesgo mínimo.

Según el Artículo 17 Título Segundo De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud se considera **Investigación con riesgo mínimo**. En este caso incluye la extracción de una muestra de 5 mililitros en la primera visita, y posteriormente después de dos meses de iniciado en el tratamiento en la consulta subsecuente.

La metodología diagnóstica que se utilizará se considera de riesgo mínimo por lo que no se transgreden las normas de la conferencia de Helsinki de 1964 y su revisión de 2013.

Se obtendrá el consentimiento informado a través de un documento en donde se especifica el objetivo del estudio, tiempo de duración, así como los métodos y técnicas que se utilizarán.

Esta investigación respeta la declaración de Helsinki de 1964 que incluye, entre otros, los siguientes puntos:

- a. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales.
- b. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.
- c. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes.
- d. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos deben describirse claramente y ser justificados en un protocolo de investigación.

e. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación pertinente antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser transparente en su funcionamiento, debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida y debe estar debidamente calificado. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes.

f. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal.

g. La participación de personas capaces de dar su consentimiento informado en la investigación médica debe ser voluntaria.

Ésta investigación respeta **la NOM-012-SSA3-2012**, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos que incluyen entre otros puntos

h. Toda investigación debe garantizar de manera clara, objetiva y explícita, la gratuidad de la maniobra experimental para el sujeto de investigación, lo cual deberá ser considerado en el presupuesto de la investigación, de conformidad con el numeral 10.6, de esta norma

i. El investigador principal, así como los demás profesionales y técnicos de la salud que intervengan en una investigación, deberán cumplir en forma ética y profesional las obligaciones que les impongan la Ley General de Salud y el Reglamento, así como esta norma

j. El titular de la institución o establecimiento y los Comités en materia de investigación para la salud correspondientes, deben actuar de manera imparcial y objetiva, con apego estricto a los principios éticos y científicos, en todos los asuntos que se desprendan de la investigación que se esté llevando a cabo en sus instalaciones, especialmente cuando se trate de atender las quejas que formulen los sujetos de investigación, por sí o a través de sus representantes legales.

k. El sujeto de investigación, sus familiares, tutor o representante legal, tienen el derecho de retirar en cualquier tiempo, su consentimiento para dejar de participar en la investigación de que se trate, en el momento que así se solicite.

l. La carta de consentimiento informado es requisito indispensable para solicitar la autorización de un proyecto o protocolo de investigación, por lo que deberá cumplir con las especificaciones que se establecen en los artículos 20, 21 y 22 del Reglamento.

Esta investigación respeta **a las normas del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación, título segundo, Capítulo I, artículos 3-27** que incluye los siguientes puntos

- La investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan:

I. Conocimiento de los procesos biológicos y psicológicos en los seres humanos;

II. Conocimiento de los vínculos entre las causas de enfermedad, la práctica médica y la estructura social;

III. Prevención y control de los problemas de salud;

- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

- De acuerdo con lo estipulado en el artículo 14. La Investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases:

II.- Se fundamentará en la experimentación previa realizada en animales, en laboratorios o en otros hechos científicos.

III.- Se deberá realizar sólo cuando el conocimiento que se pretenda producir no pueda obtenerse por otro medio idóneo.

Deberá ser realizada por profesionales de la salud, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actúe bajo la supervisión de las autoridades sanitarias

competentes y que cuente con los recursos humanos y materiales necesarios, que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.

- En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.
- El consentimiento informado deberá formularse por escrito y deberá reunirse por escrito y deberá reunir los requisitos que marca el artículo 22.

2. Esta investigación de acuerdo con las normas y acuerdos antes descritos será sometida a aprobación del Comité de Investigación y Ética en Investigación que ha sido conformado conforme a la Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación y los Comités Hospitalarios de Bioética publicados por la Comisión Nacional de Bioética.

Se asegura la confidencialidad de los datos obtenidos. El presente estudio se considera de riesgo mínimo, se realizará exploración física para valorar la actividad de vitíligo, se tomarán datos clínicos y de laboratorio de su expediente.

RESULTADOS

Pacientes

Se incluyeron 15 pacientes, de los cuales 10 mostraban por interrogatorio y exploración física vitíligo activo, así como 5 pacientes con vitíligo estable.

Características clínicas y demográficas de los pacientes

La mayoría de los pacientes fueron mujeres, 4 hombres, de los cuales, 2 mostraron actividad de la enfermedad. Todos presentaron un porcentaje de afectación corporal de al menos 10%. La edad media de los pacientes fue de 41.7 años. Todos los pacientes que presentaron actividad tenían fenómeno de Koebner, apariencia tricrómica de las lesiones o manchas en confetti.

CUADRO 2: Características clínicas y demográficas de los pacientes con vitíligo. VIDA: Escala de actividad de la enfermedad de vitíligo.

Género (femenino/masculino)	(8/2)
Edad (años)	41.7 ± 14.7 (rango 19-65)
Duración de enfermedad (años)	16.4± 10.6 (rango 6-38)
Superficie corporal afectada (%)	16.35 ± 8.4 (rango 9-35)
Escala VIDA	
	+4 2
	+3 3
	+2 5
Efectos secundarios del tratamiento	Dermatitis acneiforme (2) Insomnio día de toma de tratamiento (2)

Análisis del fenotipo de los exosomas por citometría de flujo

Tomando como base el tamaño de perlas magnéticas (100 nm) se seleccionaron eventos de este tamaño. Posteriormente se identifican los exosomas con marcajes positivos para CD9, CD63 y CD81. Por tamaño y fenotipo se determina que son exosomas.

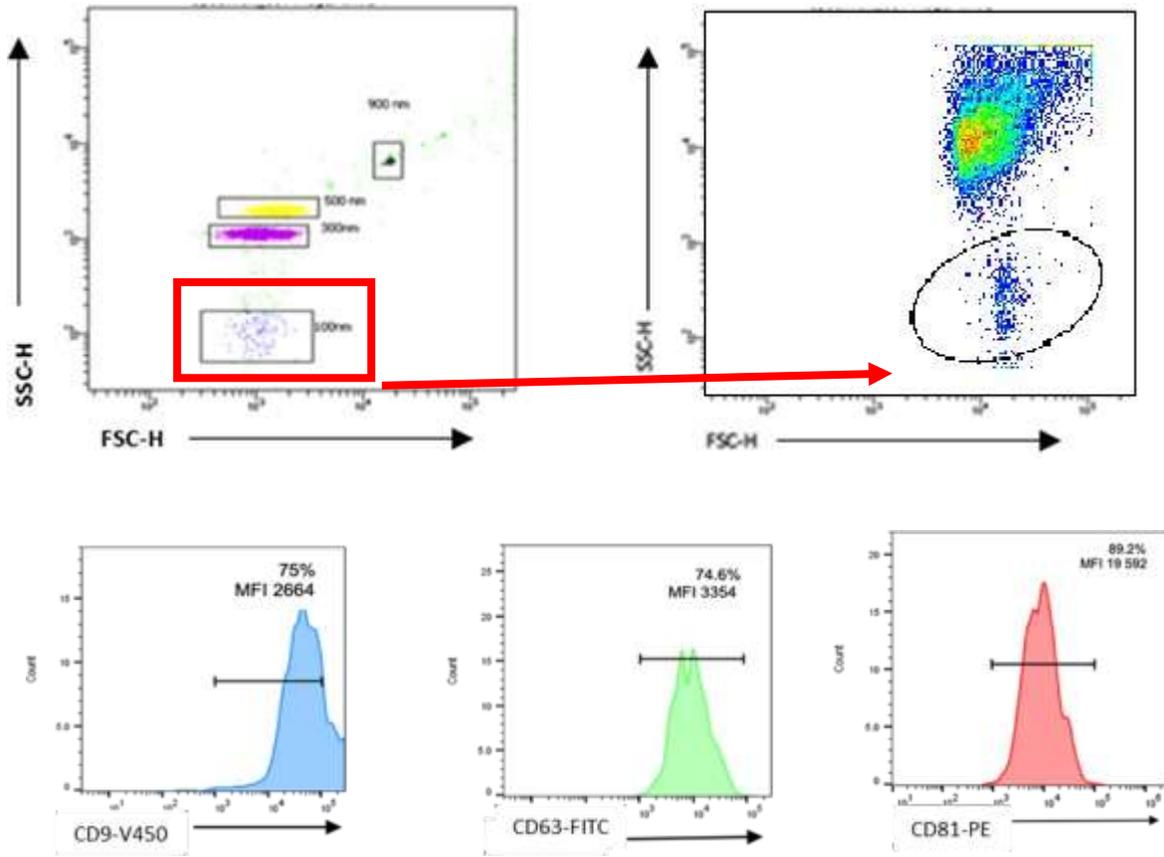


FIGURA 2. Análisis del fenotipo de los exosomas por citometría de flujo.

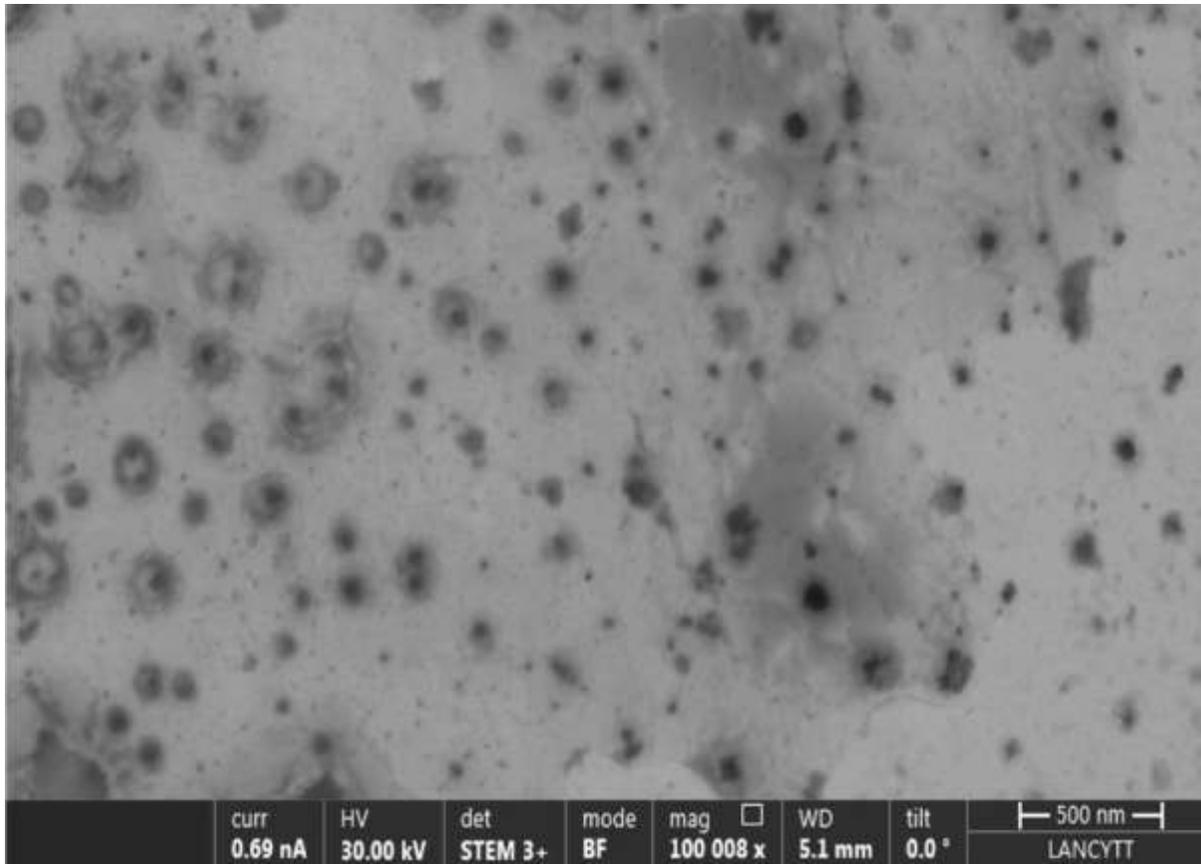


Figura 3. Microfotografía representativa de la microscopía electrónica de transmisión con unidad de barrido (sTEM). Se observa la presencia de Vesículas de 100 a 300 nm, características de exosomas

Expresión basal de microRNA 126 y microRNA 146a

Los niveles de microRNA126 se encontraron disminuidos en pacientes con actividad de vitíligo comparado con controles sanos.

Comparado con controles sin dermatosis se encuentra aumento de los niveles de microRNA 146a si se compara con pacientes con actividad de vitíligo sin tratamiento durante por lo menos 2 meses previamente.

Comportamiento clínico de los pacientes posterior a tratamiento

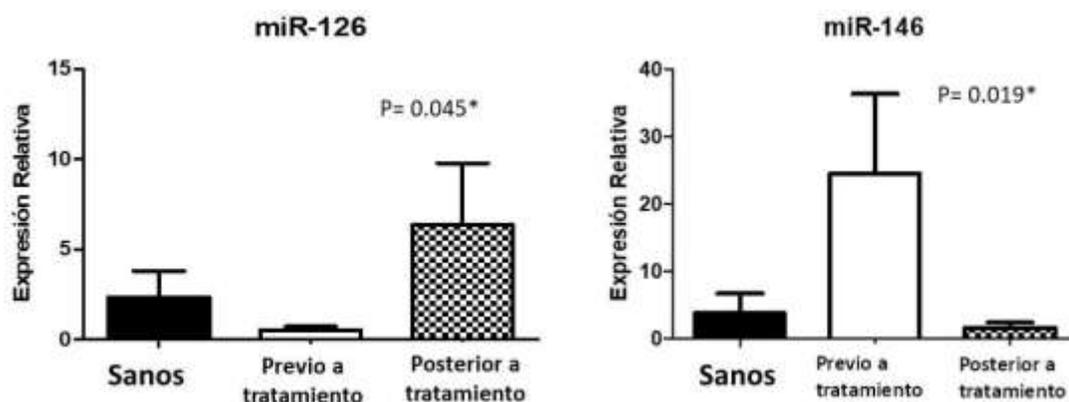
Del grupo de los pacientes con vitíligo activo, uno no estabilizó la enfermedad (10%). Los efectos adversos reportados fueron insomnio el día de la toma de la dexametasona en dos pacientes y dos pacientes con dermatitis acneiforme que resolvieron al suspender el tratamiento.

Expresión de microRNA 126 antes y después del tratamiento

Los niveles de microRNA 126 aumentan de forma estadísticamente significativa después de recibir tratamiento sistémico con dexametasona 4 mg vía oral dos días consecutivos durante 8 semanas (1 VS 8, $P=0.045$, T Student).

Expresión de microRNA 146a antes y después del tratamiento

Los niveles de microRNA 146a disminuyen de forma estadísticamente significativa posterior a la administración del tratamiento sistémico con dexametasona 4 mg dos días consecutivos por semana durante 8 semanas. (25 VS 1, $P=0.019$, T Student)



* Kruskal-Wallis post hoc de Dunn's

FIGURA 4. Expresión de los microRNAs exosomales en vitíligo. Niveles de expresión relativa de a) miR-126 y b) miR-146 en suero de pacientes con vitíligo, antes y después del tratamiento por RT-qPCR. Como grupo control (sanos) se evaluaron suero de sujetos sanos sin dermatosis.

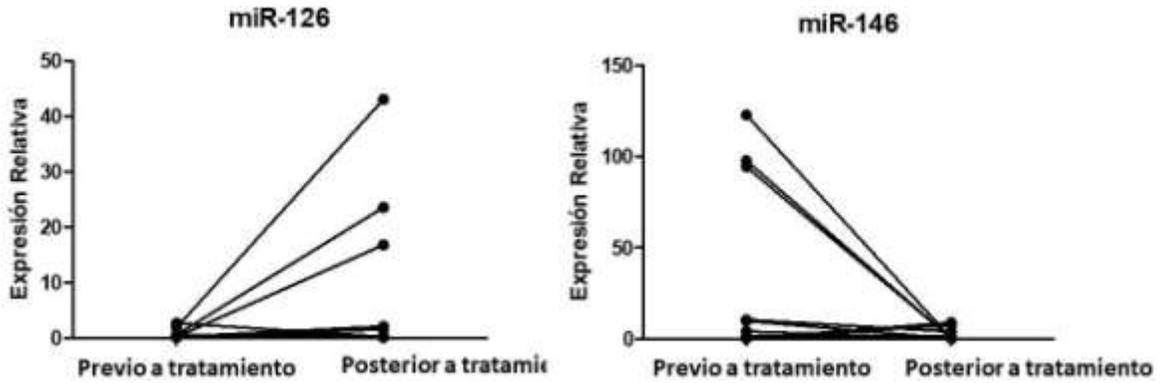


FIGURA 5. Expresión de los microRNAs exosomales en vitíligo antes y después del tratamiento

Correlación con tiempo de evolución y expresión de microRNA146a y microRNA 126

No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la expresión de ambos microRNA para la correlación con tiempo de evolución expresada en años.

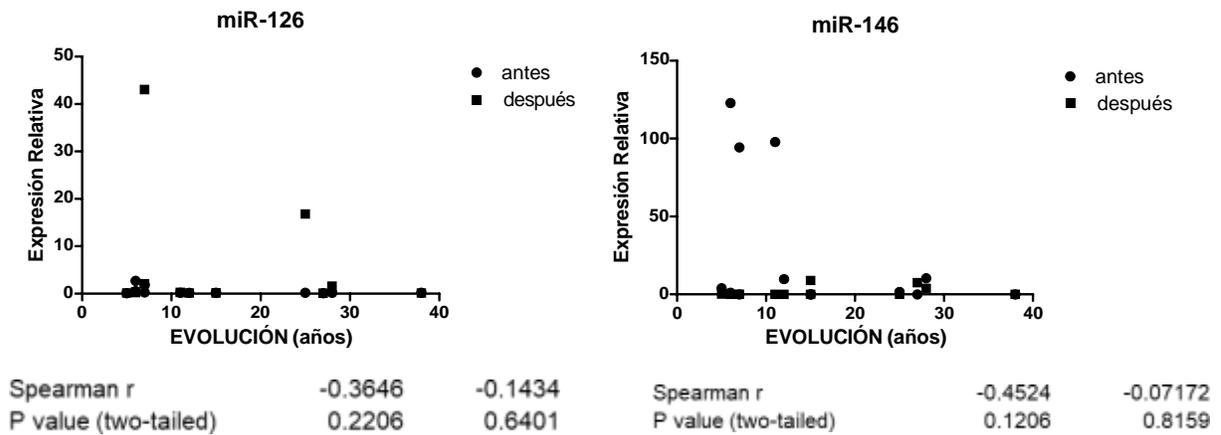


Figura 6. Correlación con tiempo de evolución y expresión de microRNA146a y microRNA 126

Correlación con porcentaje de superficie corporal y expresión de microRNA146a y microRNA 126

No existe correlación en cuanto al porcentaje de superficie corporal afectado con la expresión de éstos dos tipos de microRNA, ni antes ni después de recibir el tratamiento antiinflamatorio

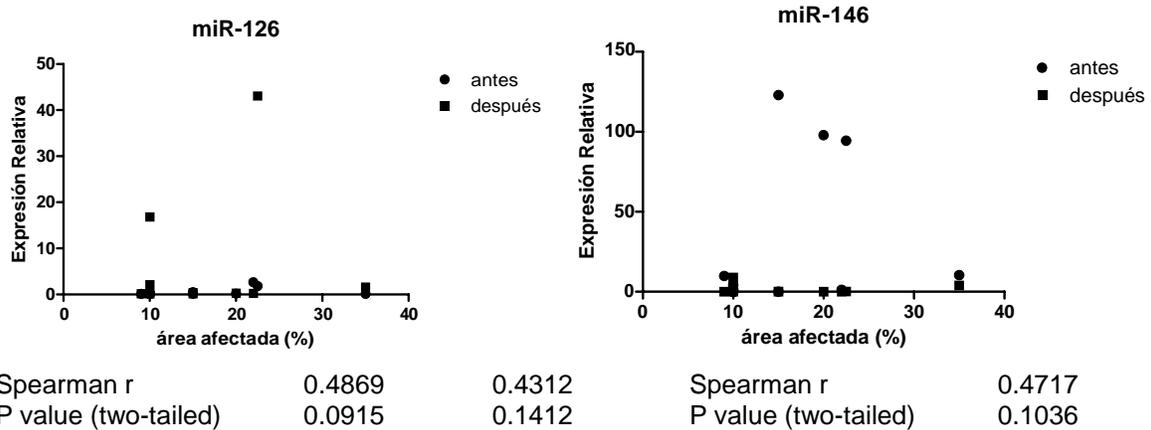


Figura 7. Correlación con porcentaje de superficie corporal y expresión de microRNA146a y microRNA 126

DISCUSIÓN

El aumento de miRNA146a es una respuesta secundaria a inflamación de los queratinocitos, por lo que se considera un microRNA con función antiinflamatoria. Así mismo se encarga de modular la respuesta de los linfocitos T reguladores para suprimir las respuestas Th1 (26,27). Además, se ha descrito su participación antiinflamatoria en modelos murinos en otras enfermedades inflamatorias como psoriasis y dermatitis por contacto irritativa. (28,29,30)

En modelos con psoriasis se ha detectado que, la disminución de la expresión de mirRNA146a lleva al aumento de sus genes blanco, en las células expuestas a citocinas proinflamatorias como son factor de necrosis tumoral e IL17A. (31)

Las citocinas asociadas a progresión de vitíligo son IL-17, TGF- β , IFN- γ , IL-1 β (32). La expresión de miRNA-146a es inducida por algunas de estas citocinas, las más importantes son IL1beta, TNF, NFKB, siendo la primer citocina mencionada la probable causante del aumento de miRNA146a en pacientes con actividad de vitíligo.

Previamente se ha documentado la elevación de microRNA146a en suero de pacientes con melanoma uveal, de igual manera, su blanco cuya función es la regulación de la supervivencia, diferenciación y supervivencia del melanocito, es el factor de transcripción de microoftalmia (MITF) (33). En el contexto de los pacientes con vitíligo, el aumento de microRNA 146a puede disminuir la transcripción de este factor de transcripción, disminuyendo la cantidad de melanina transferida hacia los queratinocitos y con esto la falta de pigmentación en la piel en los pacientes.

Nuestros resultados confirman la presencia de inflamación sistémica en pacientes con vitíligo activo.

Se había informado la elevación de los niveles de microRNA 146a en pacientes con vitíligo segmentario comparado con sujetos sanos, sin embargo, no se había realizado

su determinación en otras variantes clínicas de la enfermedad encontrando resultados similares. Tampoco se había investigado su valor durante la actividad de la enfermedad.

El fenómeno de Koebner en pacientes con vitíligo y la participación de microRNA puede explicarse de igual manera a la que ocurre en otras enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis sistémica; padecimientos en los que una proteína denominada ACKR1 cuya función es la limitación de la inflamación ocasionada por los linfocitos T, en sitios de trauma su expresión se encuentra disminuida, lo que favorece aumento de la inflamación en estas zonas del cuerpo teniendo como consecuencia despigmentación en la piel. Así mismo este efecto es reproducible por el aumento de miRNA 146a en los queratinocitos que se encuentran bajo un ambiente de inflamación como lo son las zonas de trauma leve, lo que favorece el desarrollo de las manchas en zonas de presión, fricción o traumatismo. (34)

Este efecto puede explicar el papel de microRNA 146a en vitíligo, así como la presencia de fenómeno de Koebner en los pacientes con actividad de la enfermedad.

Respecto a la disminución de microRNA 126 en el suero de pacientes con vitíligo y su aumento después del tratamiento antiinflamatorio sistémico. Se ha publicado que la disminución de microRNA126 reduce la expresión de FOXP3 y con esto aumentar la función de los linfocitos TCD8+, lo anterior comprobado en modelos de cáncer de mama murinos (35). Así mismo en pacientes con vitíligo, la vía por la cual existe disminución de éste microRNA126 puede explicar el aumento del infiltrado linfocítico CD8+ que es de utilidad para determinar la actividad de la enfermedad por histopatología.

LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Debido a la pandemia por COVID-19 y para evitar la pérdida de pacientes durante el protocolo de investigación, se determinó que el tiempo de seguimiento sería inferior al reportado en los esquemas convencionales de minipulsos de dexametasona que es de 13 semanas. Sin embargo, se observaron resultados estadísticamente significativos en la población estudiada.

Lo ideal es seguir a mayor tiempo a los pacientes como mínimo 13 semanas, así como la incorporación de nuevos pacientes a nuestro grupo de estudio.

Un área de oportunidad en el presente estudio sería determinar la presencia de infiltrado de linfocitos con predominio CD8+ antes y después de finalizar el tratamiento sistémico para correlacionar los valores de microRNA en suero y en piel y determinar una posible relación de causalidad en la cantidad de infiltrado encontrado y la cantidad de los microRNA en suero.

CONCLUSIONES

Se puede utilizar la expresión de mir146a o de mir126 para valorar la actividad de la enfermedad como un método menos invasivo comparado con la toma de biopsia.

Los valores de microRNA 146a están relacionados de forma directamente proporcional a la actividad de la enfermedad.

La determinación de microRNA 126 se relaciona de forma inversamente proporcional a la actividad de la enfermedad.

Encontramos evidencia en que estos microRNA participan en la actividad de la enfermedad y que lograr antagonizarlos puede incidir en la terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodrigues, M., Ezzedine, K., Hamzavi, I., Pandya, A. and Harris, J.,. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2017. 77(1), pp.1-13
2. Xie H, Zhou F, Liu L, et al. Vitiligo: How do oxidative stress-induced autoantigens trigger autoimmunity?. *J Dermatol Sci*. 2016;81(1):3-9.
3. Dellanna ML, Ottaviani M, Bellei B, Albanesi V, Cossarizza A, Rossi L, et al. Membrane lipid defects are responsible for the generation of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells from vitiligo patients. *Journal of Cellular Physiology* 2009.
4. Jian Z, Li K, Song P, et al. Impaired activation of the Nrf2-ARE signaling pathway undermines H₂O₂-induced oxidative stress response: a possible mechanism for melanocyte. degeneration in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2221-2230.
5. Sravani PV, Babu NK, Gopal KV, et al. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009;75(3):268-271.
6. Denat L, Kadekaro A, Marrot L, Leachman S, Abdel-Malek Z. Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(6):1512-1518.
7. Boniface K, Seneschal J, Picardo M, Taïeb A. Vitiligo: Focus on Clinical Aspects, Immunopathogenesis, and Therapy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;54(1):52-67.).
8. Wei C, Jian Z, Wang L, Qiang H, Shi Q, Guo S, et al. Genetic variants of the APE1 gene and the risk of vitiligo in a Chinese population: A genotype–phenotype correlation study. *Free Radical Bio Med* 2013;58:64-72.
9. Mosenson JA, Zloza A, Klarquist J, Barfuss AJ, Guevara-Patino JA, Poole IC. HSP70i is a critical component of the immune response leading to vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(1):88-98.

10. Sanchez-Sosa S, Aguirre-Lombardo M, Jimenez-Brito G, Ruiz-Argüelles A. Immunophenotypic characterization of lymphoid cell infiltrates in vitiligo. *Clin Exp Immunol*. 2013;173(2):179-183
11. Abdallah M, Lotfi R, Othman W, Galal R. Assessment of tissue FoxP3+, CD4+ and CD8+ T-cells in active and stable nonsegmental vitiligo. *Int J Dermatol*. 2014;53(8):940-946.
12. Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, et al. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Exp Dermatol*. 2013;22(4):245-250.
13. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3-14.
14. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009) A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genom Proteom Bioinform* 7(4):147–154..
15. Mansuri MS, Singh M, Dwivedi M, Laddha NC, Marfatia YS, Begum R (2014) MicroRNA profiling reveals Differentially expressed microRNA signatures from the skin of patients with nonsegmental vitiligo. *Br J Dermatol* 171(5):1263–1267.
16. Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep*. 2016;49(6):311-318.).
17. Shi, Y. L., Weiland, M., Li, J., Hamzavi, I., Henderson, M., Huggins, R. H., MicroRNA expression profiling identifies potential serum biomarkers for non-segmental vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(3):418-421.
18. Shi YL, Weiland M, Lim HW, Mi QS, Zhou L (2014) Serum miRNA expression profiles change in autoimmune vitiligo in mice. *Exp Dermatol* 23(2):140–142.
19. Yan S, Shi J, Sun D, Lyu L. Current insight into the roles of microRNA in vitiligo. *Mol Biol Rep*. 2020;47(4):3211-3219.
20. Shi Q, Zhang W, Guo S, Jian Z, Li S, Li K et al (2016) Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo. *Cell Death Differ*23(3):496–508.
21. Su M, Yi H, He X, Luo L, Jiang S, Shi Y (2019) miR-9 regulates melanocytes adhesion and migration during vitiligo repigmentation induced by UVB treatment. *Exp Cell Res* 384(1):111615
22. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(2):261-271.

23. Reichert Faria A, Jung JE, Silva de Castro CC, de Noronha L. Reduced immunohistochemical expression of adhesion molecules in vitiligo skin biopsies. *Pathol Res Pract.* 2017;213(3):199-204.
24. Hedley SJ, Metcalfe R, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Mac Neil S. Vitiligo melanocytes in long-term culture show normal constitutive and cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Br J Dermatol.* 1998;139(6):965-973.
25. Ahn SK, Choi EH, Lee SH, Won JH, Hann SK, Park YK. Immunohistochemical studies from vitiligo comparison between active and inactive lesions. *Yonsei Med J.* 35 (1994) 404-10.
26. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 2011; 208:1189–201.
27. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* 2010; 142:914–29. [PubMed: 20850013]
28. Rebane A, Runnel T, Aab A, Maslovskaja J, Ruckert B, Zimmermann M, et al. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2014; 134:836–47 e11. [PubMed: 24996260]
29. Urgard E, Lorents A, Klaas M, Padari K, Viil J, Runnel T, et al. Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society.* 2016; 235:195–204. [PubMed: 27269729].
30. Srivastava A, Nikamo P, Lohcharoenkal W, Li D, Meisgen F, Xu Landen N, et al. MicroRNA-146a suppresses IL-17-mediated skin inflammation and is genetically associated with psoriasis. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2016
31. *J Invest Dermatol.* 2017 September ; 137(9): 1945–1954.
32. Speeckaert R, Speeckaert M, De Schepper S, van Geel N. Biomarkers of disease activity in vitiligo: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2017;16(9):937-945

33. Russo A, Caltabiano R, Longo A, et al. Increased Levels of miRNA-146a in Serum and Histologic Samples of Patients with Uveal Melanoma. *Front Pharmacol.* 2016;7:424. Published 2016 Nov 15. doi:10.3389/fphar.2016.00424
- 34) Shams K, Kurowska-Stolarska M, Schütte F, Burden AD, McKimmie CS, Graham GJ. MicroRNA-146 and cell trauma down-regulate expression of the psoriasis-associated atypical chemokine receptor ACKR2. *J Biol Chem.* 2018;293(8):3003-3012. doi:10.1074/jbc.M117.809780
35. Qin A, Wen Z, Zhou Y, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *J Cell Mol Med.* 2013;17(2):252-264. doi:10.1111/jcmm.12003

ANEXOS

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre:				
Edad:				
Fecha de Nacimiento:				
Teléfono:				
Tratamiento actual	Porcentaje de superficie corporal afectada	Tratamientos previos	Presencia de alguno de los siguientes signos	Indice de actividad con la escala VIDA
			<ul style="list-style-type: none"> a) Fenómeno de Koebner b) Manchas en confeti c) Vitiligo inflamatorio 	<p>-1: Estable por al menos un año y con repigmentación espontánea</p> <p>0 : Estable por lo menos en el último año</p> <p>1: Actividad en el último año</p> <p>2: Actividad los últimos 6 meses</p> <p>3: Actividad los últimos 3 meses</p> <p>4: Actividad las últimas 6 semanas</p>
Variedad de vitiligo:				
Año de diagnóstico				
Tratamiento:				
Tiempo sin tratamiento previo				