



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

Factores de transcripción de las células T residentes de memoria (TRM) en pacientes con vitiligo antes y después del tratamiento con fototerapia UVB-BE

Dr. Jorge Armando Valenzuela Gutiérrez

DIRECTOR CLÍNICO
Dr. Juan Pablo Castanedo Cázares

DIRECTOR METODOLÓGICO
Dr. Juan Diego Cortés García

Enero 2023



Factores de transcripción de las células T
residentes de memoria (TRM) en
pacientes con vitiligo antes y después del
tratamiento con fototerapia UVB-BE by
Jorge Armando Valenzuela Gutiérrez is
licensed under a [Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-
CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



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
**Factores de transcripción de las células T residentes de memoria (TRM) en
pacientes con vitiligo antes y después del tratamiento con fototerapia UVB-BE**

Dr. Jorge Armando Valenzuela Gutiérrez

DIRECTOR CLÍNICO

Dr. Juan Pablo Castanedo Cázares

DIRECTOR METODOLÓGICO

Dr. Juan Diego Cortés García

SINODALES

Dra. Liliana Elizabeth Espinal Pérez
Presidente

Dr. José Rubén Bayardo Delgadillo
Sinodal

Dr.Sc Eneida Turiján Espinoza
Sinodal

Dra. María Bertha Torres Álvarez
Sinodal suplente

Enero 2023



RESUMEN

El vitiligo es el trastorno adquirido de despigmentación más común y se caracteriza por una pérdida selectiva de melanocitos. Las células T residentes de memoria (TRM) podrían estar implicadas en las recidivas. La fototerapia UVB de banda estrecha (UVB-BE) tiene efecto inmunomodulador e induce distintos patrones de repigmentación. El objetivo del estudio fue determinar los niveles de las TRM y sus factores de transcripción antes y en cada patrón de repigmentación inducido por un ciclo de fototerapia. El aumento de Blimp-1, Hobit, Runx3 ó Notch1 se usó como marcador de diferenciación y mantenimiento de TRM, mientras que la disminución de Blimp-1 y/o Hobit, como marcadores de diferenciación en células T circulantes de memoria (TCM). Se incluyeron 11 pacientes con vitiligo estable y que completaron un ciclo de fototerapia. Todos los pacientes mostraron los 3 patrones de repigmentación y lesiones que no respondieron al final de las 30 sesiones. Se tomaron biopsias de 3mm de piel lesional y no lesional, y de cada patrón de repigmentación; las cuales fueron evaluadas por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) e inmunofluorescencia directa. La piel lesional presentó mayor infiltración de TRM CD69+CD103+ en comparación con piel no lesional. Las TRM disminuyeron en diferente cantidad en cada patrón de repigmentación. El patrón folicular presentó aumento en Runx3 y disminución en Blimp-1. Por el contrario, los patrones marginal y difuso mostraron disminución de Runx3 y aumento de Blimp-1. Las lesiones que no respondieron, presentaron disminución de Blimp-1. La repigmentación se asoció con una disminución en las TRM, la cual fue mayor pero no completa en los patrones marginal y difuso. Cada patrón mostró distinto perfil de factores de transcripción, lo cual podría estar relacionado con su diferente comportamiento clínico. En los patrones marginal y difuso predominó la diferenciación en TRM pero menos mantenimiento de las mismas. En lesiones que no respondieron, predominó diferenciación en TCM. En el patrón folicular, diferenciación en TCM y mantenimiento de TRM con estímulo para inducir al Blimp-1. En conclusión, la modificación de TRM y sus factores de transcripción podría mejorar la respuesta al tratamiento, con mayor duración en la repigmentación y menos recaídas.

Palabras clave: vitiligo, fototerapia, patrones de regimentación, factores de transcripción, células T residentes de memoria, Blimp-1, Hobit, Runx3, Notch1

ÍNDICE

RESUMEN	4
ÍNDICE.....	6
LISTA DE CUADROS / TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	10
LISTA DE DEFINICIONES.....	11
DEDICATORIAS	12
RECONOCIMIENTOS	13
1. ANTECEDENTES	14
I. VITILIGO, UNA ENFERMEDAD DE MEMORIA DE LA PIEL.....	14
II. CÉLULAS T RESIDENTES DE MEMORIA (T _{RM}).....	16
IIA. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS (T _{RM}).....	17
IIB. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS CÉLULAS (T _{RM}).....	18
IIC. CÉLULAS T RESIDENTES DE MEMORIA (T _{RM}) EN EL VITILIGO	19
III. EFECTO DE LA FOTOTERAPIA EN EL VITILIGO.....	20
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
6. SUJETOS Y MÉTODOS	26
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
8. ÉTICA.....	32
9. RESULTADOS.....	34
I. Características demográficas de los pacientes.....	34
II. Cantidad de células TRM CD69+CD103+ y su disposición entre los distintos patrones de repigmentación.....	35
III. Expresión de los factores de transcripción de las células TRM en piel sana y piel lesional, así como entre los patrones de repigmentación.....	36
10. DISCUSIÓN	38
11. LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	41
12. CONCLUSIONES	42
13. BIBLIOGRAFÍA.....	43
Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para PCR en tiempo real. Los diferentes cebadores usados para evaluar la expresión de mRNA. Tm= temperatura de anidaje. C = concentración	46
Tabla 2. Características clínicas de los 11 pacientes con vitiligo tratados con 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.....	47
Figura 2. Infiltración cutánea de células TRM CD69+CD103+. Comparación representativa de H&E e inmunofluorescencia directa. a) piel con vitiligo antes del tratamiento, y b) folicular, c) difuso, d) marginal y e)acrómico que no respondió	

después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. (x400). Células TRM
CD69+CD103+ marcadas con una flecha.48

LISTA DE CUADROS / TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para PCR en tiempo real. Los diferentes cebadores usados para evaluar la expresión del ARNm. Tm= temperatura de anidaje. C = concentración 46

Tabla 2. Características clínicas de los 11 pacientes con vitiligo tratados con 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. 47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Patrones de repigmentación en vitiligo después de un ciclo de fototerapia UVB-BE. Imágenes representativas de un paciente con vitiligo a) antes y b) después de 30 sesiones, mostrando el patrón marginal, difuso, folicular yacrómico sin respuesta. 34
- Figura 2. Infiltración cutánea de células TRM CD69+CD103+. Comparación representativa de H&E e inmunofluorescencia directa. a) piel con vitiligo antes del tratamiento, y b) folicular, c) difuso, d) marginal y e) acrómico que no respondió después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. (x400). Células TRM CD69+CD103+ marcadas con una flecha. 48
- Figura 3. Niveles de células TRM CD69+CD103+ en piel con vitiligo después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. Intensidad media de fluorescencia de a) CD69+, b) CD103+ y c) TRM CD103+CD69+. Los resultados corresponden a la media +/- desviación estándar de 3 pacientes. * Diferencia significativa con $p < 0.05$ (valores de P para ANOVA). L = lesión; P = folicular; D = difuso; M = marginal; y A = acrómico 35
- Figura 4. Expresión de los factores de transcripción de las células TRM. Expresión relativa de RNAm medida por PCR-RT a) Notch1, b) Runx3, c) Hobit, y d) Blimp-1 en biopsias de piel de pacientes al inicio y en cada patrón de repigmentación al finalizar 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. Los resultados fueron normalizados con respecto al gen 18s. Los resultados corresponden a la media +/- desviación estándar de 30 pacientes. * Diferencia significativa con $p < 0.05$ (valores de P para prueba t). HS = piel sana; L = lesión; P = folicular; D = difuso; M = marginal; y A = acrómico 36

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- **TRM:** Células T residentes de memoria
- **TCM:** Células T circulantes de memoria
- **UVB-BE:** Fototerapia con radiación ultravioleta B de banda estrecha
- **Blimp-1:** Proteína 1 de maduración inducida por linfocitos B
- **Hobit:** Homólogo de Blimp-1 en células T
- **Runx3:** Factor de transcripción 3 relacionado con Runx
- **Notch1:** Proteína 1 homóloga de muesca del locus neurogénico
- **CXCL9:** Ligando 9 de quimiocina
- **CXCL10:** Ligando 10 de quimiocina
- **mTOR:** Diana de rapamicina en células de mamífero
- **qRT-PCR:** Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño

LISTA DE DEFINICIONES

- **Vitiligo estable:** sin datos clínicos de actividad en al menos 6 meses, es decir, presencia de lesiones en confeti, patrón tricrómico o inflamatorio, y/o fenómeno de koebner
- **Vitiligo activo:** lesiones nuevas en los últimos 6 meses y/o presencia de lesiones en confeti, patrón tricrómico, inflamatorio, ó fenómeno de koebner
- **Lesiones en confeti:** máculas acrómicas puntiformes en la periferia de lesiones de vitiligo
- **Patrón tricrómico:** hipopigmentación, normocromía y eritema alrededor de una lesion acrómica
- **Patrón inflamatorio:** borde eritematoso en una lesión acrómica
- **Fenómeno de koebner:** lesiones de vitiligo en sitios de traumatismo
- **Un ciclo de fototerapia:** al menos 30 sesiones
- **Patrón folicular:** pigmento alrededor del folículo piloso
- **Patón marginal:** pigmento de la periferia hacia el centro
- **Patrón difuso:** pigmento generalizado
- **Lesiones que no respondieron:** sin cambios clínicos despúes de 1 ciclo de fototerapia

DEDICATORIAS

Ayer, hoy y mañana a DIOS...

A mi angelito (a): desde el cielo guías cada uno de mis pasos, iluminas mi camino y me das la fuerza y motivación para siempre ser mejor y nunca dejar de intentar.

A mi Corde: este logro es tan tuyo como mío. Gracias por dejar todo y acompañarme en mi sueño y hacerlo nuestro. Para nada fue fácil, hubo momentos realmente difíciles ... pero jamás te alejaste de mi lado y siempre fuiste, eres y serás ese motor para ser mejor y darte todo “porque lo que tú me das es siempre mucho más”.

A mi mamá: sé que dejaste de lado tus sueños para educarme y formarme. Sé y te agradezco infinitamente cada sacrificio y esfuerzo para que no me faltara nada. A Rodrigo: por tu apoyo incondicional, por siempre ponerme el ejemplo, por siempre enseñarme que el trabajo duro y honesto tiene sus recompensas. Gracias a los dos por dar todo de sí para formarme, por acompañarme en cada paso y ser el motivo de que hoy este aquí.

A mis hermanos (as) que siempre me han enseñado con el ejemplo y me han apoyado en todo.

A mis maestros: por hacerme mejor estudiante, pero sobre todo mejor persona. Por enseñarme que nunca se deja de aprender y que siempre se puede dar más.

A todos (as) los (as) pacientes, residentes y personas que se cruzaron y cruzarán por este hermoso camino de la Dermatología.

... también al pasado que me formó, al presente que me motiva y al futuro que me desafía”

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por convertirse en mi alma mater y por el alto nivel académico de su posgrado en Dermatología.

Al departamento de Dermatología e inmunología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” por siempre tener todo lo necesario para que mi formación sea de excelencia, por siempre apoyarme en cada proyecto, y por ser el mejor centro de Dermatología del país.

Al Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” por la infraestructura y el apoyo para mi formación.

A los pacientes que gentilmente aceptaron participar en este estudio de investigación.

A mi director clínico, director metodológico y co-directores por su constante apoyo y asesoría para lograr que este trabajo de investigación sea un éxito... y probablemente a futuro, la punta de lanza en esta línea de investigación: con lo cual se puedan generar mejores opciones de tratamiento para los pacientes con vitiligo.

1. ANTECEDENTES

I. VITILIGO, UNA ENFERMEDAD DE MEMORIA DE LA PIEL

El vitiligo es el trastorno adquirido de despigmentación más común, se caracteriza por una pérdida selectiva de melanocitos (1). A nivel mundial tiene una prevalencia de 0.5-2% pero en México es del 2.6-4%. Su etiología no se conoce del todo, pero se incluyen factores genéticos, ambientales, anomalías intrínsecas de los melanocitos, estrés oxidativo y desregulación autoinmune:

- Genética: existe riesgo del 6% de presentar la enfermedad si se tiene un familiar de primer grado afectado con vitiligo, comparado con 1% en la población general. La concordancia entre gemelos es del 23%. En estudios del genoma se muestra como un trastorno autosómico dominante con penetrancia incompleta y se han reportado 50 locus de genes que aumentan el riesgo de presentar la enfermedad (1,2).
- Estrés oxidativo: existe aumento en la sensibilidad a agentes exógenos y baja expresión de catalasa que propicia niveles altos de especies reactivas de oxígeno. Así mismo, las células epidérmicas liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que activan a los linfocitos T Residentes de Memoria (1,2)
- Desregulación inmunológica: se han encontrado títulos elevados de anticuerpos de melanocitos reactivos, antígenos específicos de melanocitos (CD8+, tirosinasa+, Melan-A/MART-1+, gp100+, TRP-1 y TRP-2) en sangre y piel perilesional. En lesiones tempranas hay linfocitos CD8+ que producen factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 17 e interferón gama. Este último induce la liberación de CXCL9 y CXCL10 por queratinocitos, reclutando CD8+ citotóxicos que destruyen a los melanocitos (1,2).

Actualmente, la hipótesis más aceptada involucra una predisposición genética que junto a estímulos ambientales y el estrés oxidativo, activan células residentes e innatas en melanocitos por medio de exosomas con patrones moleculares de daño; los cuales inducen la generación de interferón gama por los linfocitos, liberando CXCL9/10, y reclutando linfocitos T CD8 que finalmente destruyen a los melanocitos (1,2,3,4).

Clínicamente se presenta como máculas o placas amelanóticas con márgenes diferenciados y bordes convexos principalmente en la cara, dorso de manos, pezones, axilas, ombligo, región sacra, región inguinal y/o anogenital. Se divide en a) segmentario, que es la forma menos común, suele ser unilateral con distribución segmentaria o en banda, y alcanza su máxima extensión en 1-2 años (1,2) y b) no segmentario, que es la forma más común, las lesiones suelen ser simétricas y bilaterales, y a su vez se sub-divide en acrofacial, mucosas, universal, generalizado y mixto (1,2). Así mismo, puede ser a) activo sí tiene lesiones en confeti, patrón tricrómico hasta pentacrómico y/o fenómeno de Koebner, e b) inactivo si no presenta las características descritas previamente. La escala de actividad de la enfermedad de vitiligo (VIDA) clasifica la patología en 6 niveles de puntuación acorde al grado de actividad y temporalidad de la misma (5):

- +4: actividad en las últimas 6 semanas
- +3: actividad hace 6 semanas a 3 meses
- +2: actividad hace 3 a 6 meses
- +1: actividad hace 6 a 12 meses
- 0: sin actividad en al menos 1 año
- -1: sin actividad en al menos 1 año y con repigmentación

El diagnóstico es clínico mediante la observación y documentación de las lesiones características, y se confirma mediante una biopsia de piel; evidenciando una disminución ó ausencia de melanocitos (1).

El tratamiento depende de la extensión, localización, actividad, edad y motivación del paciente. Se divide en dos fases:

- 1) Estabilización: para pacientes con lesiones activas, por medio de la inmunomodulación. Dentro de las distintas opciones, los esteroides por vía oral y específicamente los pulsos de dexametasona por 3-6 meses presentan buena respuesta clínica.
- 2) Repigmentación: para pacientes con lesiones estables, por medio de la inmunomodulación, estimulación de melanocitos y de células madre del folículo piloso. Se han empleado los esteroides tópicos potentes 15 días al mes por 6 meses, con más de 75% de repigmentación en el 50% de los pacientes. Inhibidores de calcineurina tópicos como tacrolimus y/o pimecrolimus. Fototerapia UVB-BE que es ideal en vitiligo generalizado que afecta más del 10% de la superficie corporal, y que ha reemplazado a la terapia PUVA ya que tiene menos efectos adversos y mayor tasa de repigmentación (1,6). Sin embargo, tienen pobre respuesta en la zona distal de extremidades y labios, y requieren protocolos de sostén ya que el 40% de las lesiones recurren en el primer año después de la suspensión del tratamiento (7,8). Planteando la pregunta de si existe implicación del sistema inmune de forma local que condicione un estímulo constante y ataque crónico sobre los melanocitos (9).

II. CÉLULAS T RESIDENTES DE MEMORIA (T_{RM})

Los linfocitos T tienen un papel en la infección, inflamación y la autoinmunidad. Se dividen en células T vírgenes y células T de memoria, dependiendo de la exposición a antígenos, la primera no presenta exposición y la segunda sí. Las células T de memoria se clasifican en: a) células T circulantes de memoria central (T_{CM}) que expresan quimiocina CCR7, altos niveles de L-selectina CD62L, y están en ganglios linfáticos, y b) las células T efectoras de memoria (T_{EM}), que carecen de CCR7-CD62L pero expresan niveles altos de receptores de superficie (antígeno leucocitario

cutáneo, CCR4, CCR8, CCR10, CCR17-19), llevan células a la piel, promueven salida a circulación y entrada a tejidos (3,10,11).

Recientemente, se ha descrito una población de células T de memoria llamadas residentes de memoria (T_{RM}), que residen en la piel en número de 20 billones en adultos sanos, carecen de recirculación, proliferan localmente, y producen citocinas inflamatorias. (11). Se ha mencionado que la activación aberrante de las mismas puede causar el desarrollo o mantenimiento de trastornos como psoriasis y vitiligo (10). Las células T residentes de memoria (T_{RM}) al igual que las células T de memoria circulantes emergen de precursores de células T que carecen del marcador celular efector KLRG1 IL-7Ra. Aún no se conoce en qué etapa se separan de las células de memoria circulantes; pero el proceso es regulado por interleucina 12, 15 e interferón gama (3,10,11).

IIA. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS (T_{RM})

Las células T residentes de memoria (T_{RM}) expresan marcadores de superficie específicos. Los mejor caracterizadas son CD103+ CD69+ CD49a+. La ausencia de estos marcadores, conlleva a la disminución pero no eliminación completa de las (T_{RM}) (2,3,10,12):

- CD4+/CD8+: son co-receptores del receptor de células T.
- CD69: es un marcador de activación de células T, necesario para el desarrollo de las células TRM y retención temprana en tejido mediante disminución de expresión del receptor 1 de esfingosina 1 fosfato. Se encuentra principalmente en la dermis. (13)
- CD103: retención persistente por la expresión de su ligando E-cadherina. Se encuentra principalmente en la epidermis. (13)
- CD49a: produce altos niveles de interferón gama, perforina y granzima B, es estimulada por la interleucina 15.

IIB. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS CÉLULAS (T_{RM})

Las vías de señalización mTOR, el factor transformante beta y la interleucina 15, controlan el desarrollo y supervivencia de las células T_{RM}. La eomesodermina (EOMES) y el factor de transcripción 1 (TCF1) están aumentados en T_{CM} y disminuidos en T_{RM} (10,14). Los factores de transcripción regulan la diferenciación y supervivencia de las células T_{RM}; por lo que la pérdida de alguno compromete su desarrollo en piel y no de células de memoria circulantes. (11). Se evalúan con la prueba reacción en cadena de la polimerasa, midiendo su expresión relativa con valores de cero a infinito:

- Homólogo de Blimp-1 en células T (Hobit): gen Zfp683. Es esencial para el mantenimiento a largo plazo de la granzima B (2) y el desarrollo de las células TRM al bloquear CCR7 y S1PR1. Se ha encontrado aumentado en las células TRM de modelos murinos (12).
- Proteína de maduración inducida por linfocitos B (Blimp-1): gen Prdm1. Es inducido por Runx3, inicia la función efectora citotóxica estimulando la expresión de la granzima B y hace sinergia con Hobit para el desarrollo de las células TRM (2,12). Así mismo, inhibe la diferenciación de células T vírgenes en células circulantes de memoria (TCM). La pérdida de Blimp-1 y/o Hobit compromete el desarrollo de células TRM pero no de células TCM (15). Se ha encontrado elevado en las células TRM de modelos murinos.
- Factor de transcripción 3 relacionado con Runx (Runx3): tiene impacto en la presencia de las células CD69+ y CD103+, por lo que es indispensable para el mantenimiento de las células TRM. Su actividad es en la etapa efectora de los precursores TRM, mantiene expresión de granzima B; y su sobreexpresión es suficiente para promover la expresión de CD103. Por otra parte, puede inducir la expresión de Blimp-1 y Hobit (12,16).
- Notch1: es receptor de superficie, responsable del mantenimiento de CD103+ T_{RM}, facilitando la unión de T_{RM} al epitelio (17,18).

IIC. CÉLULAS T RESIDENTES DE MEMORIA (T_{RM}) EN EL VITILIGO

Las lesiones recurren en 40% en el primer año de suspender el tratamiento, y en el mismo sitio; lo cual sugiere que se desarrolla autoinmunidad de memoria local (9). La piel perilesional contiene TRM CD8+CD69+, que persisten más de un año. Así mismo, el infiltrado es CD103+ y CD103-, que tienen actividad citotóxica moderada y secretan interferón gama y factor de necrosis tumoral alfa. En un estudio reciente en piel lesional, un grupo de linfocitos CD8+CD49+ en presencia de interleucina 15, secreta interferón gama, perforina y granzima; mientras que otro grupo con CD8+CD49- secreta interleucina 17; y en ambos se presenta apoptosis de melanocitos (7,14,19,20). La formación de TRM requiere interleucina 15, 17 y factor transformante beta, pero para el mantenimiento sólo interleucina 15; la cual se produce en tejidos periféricos y se une a CD215, CD122, CD132. Así mismo, las TRM producen quimiocina CXCL9 y CXCL10 que se unen a la quimiocina CXCR3 en la superficie de las células T de memoria central y potencia el reclutamiento de estas hacia la piel. Las TCM CXCR+ CD8+ tienen capacidad proliferativa aumentada comparada con pacientes sanos (7,14,21).

Sin embargo, esto no es suficiente para el mantenimiento del vitiligo, se requiere de linfocitos T de memoria circulantes en sangre; así como disfunción de las células T reguladoras, las cuales tienen papel en regeneración de células madre foliculares; por lo que la inhibición de las T reguladoras por las TRM y citocinas, tienen efecto indirecto en la inhibición de la regeneración de melanocitos (3).

Estos hallazgos sugieren un papel importante de las TRM en la patogenia del vitiligo, por lo que tratamientos dirigidos podrían ser benéficos para los pacientes:

- Depleción selectiva de células T de memoria recirculantes e inhibición de su migración: modelo murino con inhibidor de S1P (FTY720) causa depleción selectiva con repigmentación, pero sin afectar número de T_{RM} (7,10).

- Prevenir diferenciación y mantenimiento en piel: Anticuerpos contra IL15 (anti-CD122) depletan las T_{RM} en piel, mientras que el bloqueo por corto tiempo reduce el interferón gama; (14) inhibidores JAK3 bloquean a la IL15.
- Prevenir acumulación durante exacerbaciones: la terapia de mantenimiento disminuye la activación y proliferación local de T_{RM}. En enfermedad diseminada habría que emplear esteroides, metotrexato, y/o inhibidores JAK.

III. EFECTO DE LA FOTOTERAPIA EN EL VITILIGO

La fototerapia se usa para el vitiligo desde hace más de 3500 años (6,22). PUVA ha sido reemplazada por UVB-BE (6,22,23). Westerhof & Nieuweboer compararon UVB-BE con PUVA 2 veces por semana, en el primer grupo 67% repigmentaron a 4 meses comparado con 46% (22). La fototerapia es fundamental para:

- 1) Detener progresión: mediante inmunomodulación con estimulación epidérmica de interleucina 10 que induce diferenciación de linfocitos T reguladores, disminución de células inflamatorias, depleción de células de Langerhans y apoptosis de células T (22,24).
- 2) Repigmentación: mediante diferenciación y migración de melanocitos perilesionales o inmaduros del folículo, aumento de endotelina 1 y factor básico de crecimiento fibroblástico por queratinocitos lo cual promueve proliferación de melanocitos, actividad metaloproteinasas 2 en melanocitos aumentando migración, aumento de tirosinasa e inhibición de células T efectoras y TRM. (22,24,25,26).

El impacto de luz UV en la persistencia, fenotipo y especificidad de las TRM en la piel está poco descrito. En un estudio publicado en 2016, la exposición a UVB-BE causó disminución de expresión de integrinas α v β 6 y α v β 8 que se requieren para la producción del factor transformante beta que mantiene expresión de CD103 en TRM, y que permite la retención; establecieron que la RUV dosis-dependiente influencia la retención y fenotipo de las TRM al modular las citocinas cutáneas (24,27).

Min-Bae et al muestran que la UVB-BE presenta respuesta leve en 62% a 3 meses y 74% a 6 meses; respuesta moderada 13% a 3 meses y 19% a 6 meses. Así mismo mencionan que la cara y cuello repigmentan en 44%, las extremidades 17% y las manos y pies 0% a 6 meses (23). Esmat et al mencionan que la eficacia para lograr más del 75% de repigmentación con UVB-BE es 16-63% comparado con 20% en PUVA. Así mismo mencionan como efectos adversos de la UVB-BE al prurito, eritema, quemadura, xerosis, sin riesgo aumentado de cáncer de piel (22). Los patrones de repigmentación son periférico 40%, folicular 26%, mixto 34%. El periférico se observa en cara 59% y zona acral 60%; el folicular en tronco 52% y cuello 42%; y el mixto en tronco 44%. Así mismo, 85% mantienen la repigmentación tras 1 año de discontinuar fototerapia, con recaída de 55% en 11 pacientes a 2 años (8,22,23).

El *vitiligo working group* estableció las siguientes recomendaciones para la fototerapia UVB-BE: enfermedad diseminada con superficie afectada mayor del 5%; frecuencia óptima 3 veces por semana, pero 2 veces por semana es aceptable; dosis inicial 200mJ/cm² y aumentar 10-20%, con dosis máxima en cara 1500mJ/cm² y en cuerpo 3000; valorar respuesta después de 30 sesiones. Así mismo, establecen lo siguiente:

- Los factores que impactan en el resultado son: actividad, ya que la repigmentación es más notoria en enfermedad estable. La progresión y poliosis son datos de poca respuesta en el vitiligo segmentario. Las zonas acrales responden menos por variación en la densidad de folículos pilosos (22).
- Los obstáculos a tener en cuenta son: detención en la repigmentación por adaptación epidérmica, siendo indicación de parar terapia y administrar corticoesteroides; falta de repigmentación; aparición de nuevas lesiones, siendo indicación de emplear fármacos para estabilizar; falta de apego, hay mayor apego en jóvenes y en quienes se explica ampliamente; oscurecimiento

de piel normal, con lo cual hay que cubrirla ó usar filtro solar durante la fototerapia (22).

2. JUSTIFICACIÓN

El vitiligo es uno de los motivos de consulta más frecuentes en dermatología, con una prevalencia en México de 2.6-4%. Las lesiones acrómicas responden de forma parcial y temporal a los distintos tratamientos que existen en la actualidad, lo cual llega a afectar la calidad de vida y la autoestima de los pacientes.

La fototerapia es uno de los tratamientos con mayores tasas de repigmentación. Sin embargo, las lesiones tienden a recurrir en el 40% de los pacientes y suelen hacerlo en el mismo sitio de lesiones previas. Por lo que se cree que la autoinmunidad local tienen un rol importante en la patogenia de la enfermedad y en la resistencia y/o respuesta parcial a los distintos tratamientos.

En años recientes, se han creado modelos murinos donde se muestra la participación de las células T residentes de memoria (T_{RM}) en la patogenia del vitiligo, así como en la repigmentación de las lesiones al bloquear dichas células. Por lo que es importante evaluar si la fototerapia UVB-BE disminuye la expresión de las TRM y sus factores de transcripción en los pacientes con vitiligo; con lo cual puedan sugerirse protocolos de tratamientos combinados y/o de mantenimiento más efectivos, que logren mayores tasas de repigmentación y una respuesta clínica sostenida que sea más satisfactoria para los pacientes.

Se considera un estudio experimental e innovador ya que hasta la fecha no se cuenta con un tratamiento que inhiba de forma sostenida las células T residentes de memoria (TRM) de la piel y no se ha publicado acerca del efecto de la fototerapia en las TRM y sus factores de transcripción en pacientes con vitiligo. Así mismo, se considera un estudio unicéntrico y transversal, ya que solamente se incluyeron pacientes de un centro dermatológico y sólo se tomaron biopsias al término de un ciclo de fototerapia, respectivamente.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción en pacientes con vitiligo antes y después del tratamiento con 30 sesiones de fototerapia UVB-BE?

4. HIPÓTESIS

La fototerapia UVB-BE disminuye la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción en pacientes con vitiligo.

5. OBJETIVOS

- Objetivo general: medir la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción en pacientes con vitiligo antes y después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.
- Objetivos específicos:
 - Determinar la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción en piel lesional antes de la fototerapia UVB-BE.
 - Determinar la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción en piel lesional después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.
 - Comparar la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción antes y después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.
- Objetivos secundarios:
 - Comparar la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción entre los patrones de repigmentación después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.
 - Comparar la respuesta clínica con la expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción después del tratamiento con 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.

6. SUJETOS Y MÉTODOS

Diseño del estudio.

- Tipo de estudio: Analítico, prospectivo, antes y después del tratamiento con fototerapia UVB-BE con dosis inicial de 200 mJ/cm², frecuencia de 3 veces por semana, duración total mínima de 30 sesiones.

Metodología.

- Lugar de realización: departamento de Dermatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Universo de estudio: pacientes con diagnóstico de vitiligo que acudieron al servicio de Dermatología del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí, México.
- Período en que se realizó: agosto del 2021 a junio del 2022.
- Criterios de selección:
 - Inclusión: sexo indistinto, mayores de 18 años, firmar el consentimiento informado, acudir a la consulta de dermatología del Hospital Central, tener diagnóstico clínico de vitiligo estable con superficie corporal afectada mayor del 10%, no tener tratamiento sistémico en los últimos 3 meses, no tener tratamiento tópico en el último mes y tener lesiones de cualquier tiempo de evolución.
 - Exclusión: vitiligo activo, acral, universal, segmentario, superficie corporal afectada menor del 10%, no poder o querer acudir a fototerapia al menos 2 veces por semana, tener otra enfermedad inflamatoria de la piel, tener enfermedades autoinmunes o inflamatorias, estar embarazadas o en lactancia, tener enfermedades mentales, tener antecedente de cáncer de piel, tener cicatrización tipo queloide.
 - Eliminación (si aplica): pacientes que habiendo firmado el consentimiento, decidan ya no participar; que no acudan a seguimiento;

que no completen al menos 30 sesiones de fototerapia UVB-BE y que no acepten toma de biopsias antes y después.

Variables:

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción después de la fototerapia UVB-BE	Expresión relativa	0-infinito	N/A	Numérica Continua
Independiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Expresión de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción antes de la fototerapia UVB-BE	Expresión relativa	0-infinito	N/A	Numérica Continua
Tratamiento con fototerapia	Fototerapia UVB-BE 2-3 sesiones por semana por 30 sesiones	Antes y después	N/A	Categórica Dicótoma
Variables de Control (confusoras)				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Tiempo de evolución	Años desde el inicio de las lesiones	0 – 100	Años	Numérica Continua
Localización de las lesiones	Topografía de las lesiones	0 = Cara 1 = Tronco, cuello y proximal de extremidades	N/A	Dicótoma
Actividad de la enfermedad	Presencia o ausencia de koebner, patrón tricrómico, patrón inflamatorio, lesión en confeti	0 = activa 1 = estable	N/A	Dicótoma

Plan de trabajo

- Reclutamiento de pacientes: se realizó invitación al protocolo de investigación en la consulta y mediante llamada telefónica a los pacientes con diagnóstico de vitiligo de la base de datos del departamento de Dermatología. De los que aceptaron participar, se realizó la firma del consentimiento informado, historia

clínica, exploración física, toma de fotografías clínicas y toma de biopsia por sacabocado de 3mm de piel lesional y piel no lesional.

- Inicio de tratamiento: se inició fototerapia con dosis sugerida acorde al fototipo, la cual se fue incrementado o disminuyendo 15% según la tolerancia de cada paciente. Se dieron 3 sesiones semanales hasta completar 30. En cada visita se valoró la tolerancia y/o presencia de efectos adversos, según lo cual se disminuyó la dosis y/o suspendió la fototerapia por algunas sesiones.
- Valoración al término del protocolo: se tomaron fotografías clínicas, se valoró la respuesta clínica según el grado de repigmentación y se tomaron biopsias por sacabocado de 3mm de los patrones de repigmentación que presentaron los pacientes, así como de las áreas que no respondieron a la fototerapia.
- Obtención de muestras: A cada paciente se le tomaron biopsias por sacabocado de 3mm bajo protocolo de asepsia y antisepsia con clorhexidina y anestesia local con lidocaína/epinefrina. Una de piel lesional y otra de piel sana antes de iniciar la fototerapia, y una de cada patrón de repigmentación al finalizar las 30 sesiones. Las muestras fueron almacenadas en frascos estériles a -80°C hasta su procesamiento.
- Procesamiento de la muestras para PCR en tiempo real (qRT-PCR): Las biopsias fueron lisadas mecánicamente en nitrógeno líquido y el RNA total se extrajo usando un gradiente de fenol-cloroformo para cada muestra, se sintetizó cDNA de 1 µg del RNA total en un volumen de 10 µL usando el *High Capacity cDNA reverse transcription kit (Appliedbiosystems)*, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La PCR en tiempo real se llevo a cabo en el equipo *MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA)* con 40 ciclos. Usamos 10 µL con 1 µL de cDNA, 5 µl de *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)*, 0.2 µL de cada cebador 20 µM (*ADN ARTIFICIAL S. DE R.L. DE C.V., Guanajuato, México*) y 3.6 µl H₂O DEPC. La secuencia de los cebadores utilizados se describe en la **tabla 1** (Ver anexos). Los resultados se obtuvieron normalizando cada muestra respecto a su control endógeno (18s). Expresión normalizada= gen problema/18s.

- Procesamiento de las muestras para inmunofluorescencia directa: Las biopsias de piel perilesional, lesión antes del tratamiento y de cada patrón de repigmentación fueron congeladas para realizar cortes de 4 μm los cuales se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, que se lavó con buffer de fosfatos (PBS) por 5 minutos. Después se bloquearon con γ -globulina (*eBiosciences-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) por 15 minutos y se lavaron con PBS. Posteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-CD69-PE (*eBiosciences*) y anti-CD103-FITC (*eBiosciences*) por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad en cámara húmeda. Después, los cortes se lavaron con PBS y se contratiñeron con DAPI (4mg/mL) (*ThermoScientific*) y finalmente se fijaron con medio de montaje PBS-Glicerol (1:9). Se utilizaron laminillas sin teñir o sin anti-CD69 o sin anti-CD103 para descartar la fluorescencia inespecífica y quitar la fluorescencia basal al momento de tomar las imágenes. Las laminillas fueron evaluadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse (*Nikon Instruments Inc; Melville, NY, USA*). Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software *Infinity Analyze* versión 6.5.2 (*Teledyne Lumenera; Ottawa, Ontario, Canadá*) para generar una imagen que contenga los marcadores de TRM CD69 y CD103 en el mismo campo visual (*merge*) que permitiera cuantificar la intensidad de la fluorescencia de las células CD69+CD103. Finalmente, la cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software *ImageJ v1.44* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*) contabilizando la fluorescencia en los campos seleccionados con células dobles positivas en unidades de fluorescencia.
- Finalmente se realizó la estadística y análisis de datos.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tipo de muestreo.

- Se realizó muestreo por conveniencia de todos los pacientes con diagnóstico de vitiligo que acudieron al servicio de Dermatología del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí, México, de agosto del 2021 a junio del 2022.
- En 2018, Richmond et al mostraron en un modelo murino, una diferencia de 5-40% con mediana y media de 22.5% en la cantidad de (T_{RM}) CD8+ CD69+ CD103+ en epidermis después de tratamiento dirigido contra interleucina 15, la cual es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de las (T_{RM}) (28, 29). Por lo que, la “n” o tamaño de muestra se calculó teniendo en cuenta un modelo con estudio para contraste de hipótesis unilateral, en el que se pretende comparar medias de las células T residentes de memoria (T_{RM}) antes y después del tratamiento con fototerapia UVB-BE; estableciendo una magnitud de diferencia clínicamente relevante de 30%, disminución típica en otros trastorno de la piel del 30%, aceptando riesgo de 0.05 y deseando poder estadístico de 80% para detectar diferencias si es que existen (30):

$$n = \frac{2(Za + Zb)^2 * S^2}{d^2}$$

$$n = \frac{2(1.64 + 0.84)^2 * 0.3^2}{0.3^2}$$

$$n = 12$$

- Se obtuvo un tamaño de muestra de 12, sin embargo al final del estudio se incluyeron 11 pacientes. De los cuales se tomaron biopsias de la siguiente forma:

ANTES DE LA FOTOTERAPIA UVB-BE	DESPUÉS DE LA FOTOTERAPIA UVB-BE
<ul style="list-style-type: none"> - 1 muestras de piel lesional - 1muestras de piel sana 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 muestras de patrón repigmentación folicular - 1 muestras de patrón repigmentación periférico - 1 muestras de patrón repigmentación difuso - 1 muestras de patrón repigmentaciónacrómico

Análisis.

- El análisis descriptivo se realizó usando medidas de distribución central como media y desviación estándar.
- Se incluyó un solo grupo con dos muestras, la media de la expresión relativa de las células T residentes de memoria (T_{RM}) y sus factores de transcripción antes y después del tratamiento con fototerapia UVB-BE.
- La diferencia entre la piel sana y lesional se analizó mediante prueba t y la diferencia entre piel lesional y los distintos patrones de repigmentación mediante ANOVA y Kruskal–Wallis para datos paramétricos y no paramétricos, con pruebas post hoc de Bonferroni y Dunn’s, respectivamente.
- El análisis se realizó usando el programa *GraphPad Prism 5.0 software* (San Diego, CA). Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

8. ÉTICA

Este protocolo fue evaluado y autorizado por el Comité Académico de Dermatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Así mismo, fue aprobado por el Comité de ética y por el Comité de investigación de dicha institución, otorgando el registro 63-21. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

En apego a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud:

- Artículo 14: el protocolo se fundamentó en estudios previos donde se muestra repigmentación después de fototerapia UVB-BE; sin embargo no hay estudios que evalúen la modificación en las células T residentes de memoria. Se ha redactado consentimiento informado el cual se discutió ampliamente con cada paciente, haciendo énfasis en los potenciales riesgos y el potencial beneficio. Se realizó por personal capacitado y adiestrado, es decir médicos dermatólogos certificados y residentes de dermatología en formación.
- Artículo 16: Se guardó y guardará la confidencialidad de los pacientes en todo momento. En caso de difusión y/o publicación posterior, se guardará confidencialidad al tratar los datos con un número de identificación.
- Artículo 17: Se consideró una investigación con riesgo mínimo ya que se realizó intervención o modificación intencionada en los individuos que participaron, por medio de la fototerapia UVB-BE que es un tratamiento usado comúnmente en pacientes con vitiligo. Así mismo, se tomaron biopsias en sacabocado de 3mm, las cuales se realizan de forma rutinaria y al ser menor o igual de 3mm no suelen dejar cicatriz, y presentan riesgo de infección y sangrado mínimo.
- Capítulo III: se llevó a cabo en pacientes mayores de edad
- Capítulo IV: no se incluyeron mujeres embarazadas o que estuvieran dando lactancia.

En apego al código de Nuremberg:

- Se realizó el consentimiento informado de forma escrita, el cual fue voluntario y pudo ser revocado en cualquier momento sin ningún tipo de efecto.
- Pretendió estudiar la modificación de las células T residentes de memoria en pacientes con vitiligo, con lo cual sugerir/lograr mejores tratamientos
- No existen estudios en humanos que evalúen la modificación de las TRM con la fototerapia. La eficacia comprobada de la fototerapia para repigmentar y los pocos y tolerables efectos secundarios, así como las altas tasas de recurrencia justifican el presente protocolo.
- Se tomaron biopsias con trocar de 3 mm para disminuir los riesgos de sangrado, infección y cicatrización anómala al mínimo.
- No se presentaron efectos adversos severos ni muerte ni incapacidad por el uso de fototerapia.
- El riesgo no excedió el beneficio
- Los pacientes tuvieron acceso a urgencias y/o consulta de dermatología en todo momento en caso de duda y/o efectos adversos
- El protocolo fue llevado a cabo exclusivamente por personal del departamento de dermatología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.
- Los pacientes podían revocar el consentimiento informado y con esto su participación en cualquier momento, sin ninguna consecuencia.
- Se tuvo disponibilidad de suspender el protocolo en cualquier momento.

En apego a la declaración de Tokio: el protocolo no favoreció, aceptó ni buscaba torturar o algún procedimiento inhumano; en todo momento se respetó la dignidad y derechos de los participantes.

9. RESULTADOS

I. Características demográficas de los pacientes

Once pacientes cumplieron los criterios de inclusión y completaron el ciclo de 30 sesiones. La media de edad fue de 41 años (± 18 años), la relación hombre-mujer fue de 2:9, la media del tiempo de evolución de la enfermedad fue de 13 años (± 12 años), la media de la superficie corporal total afectada fue de 24% ($\pm 6\%$), y la media de la dosis total acumulada fue de 14,943 mJ/cm² ($\pm 4,843$ mJ/cm²). Esto se presenta en la **tabla 2** (Ver anexos). Todos los pacientes mostraron mejoría clínica después de la fototerapia y desarrollaron los tres patrones de repigmentación así como lesiones acrómicas que no respondieron. Esto se muestra a continuación en la **Figura 1. Patrones de repigmentación en vitiligo después de fototerapia UVB-BE:**

a)



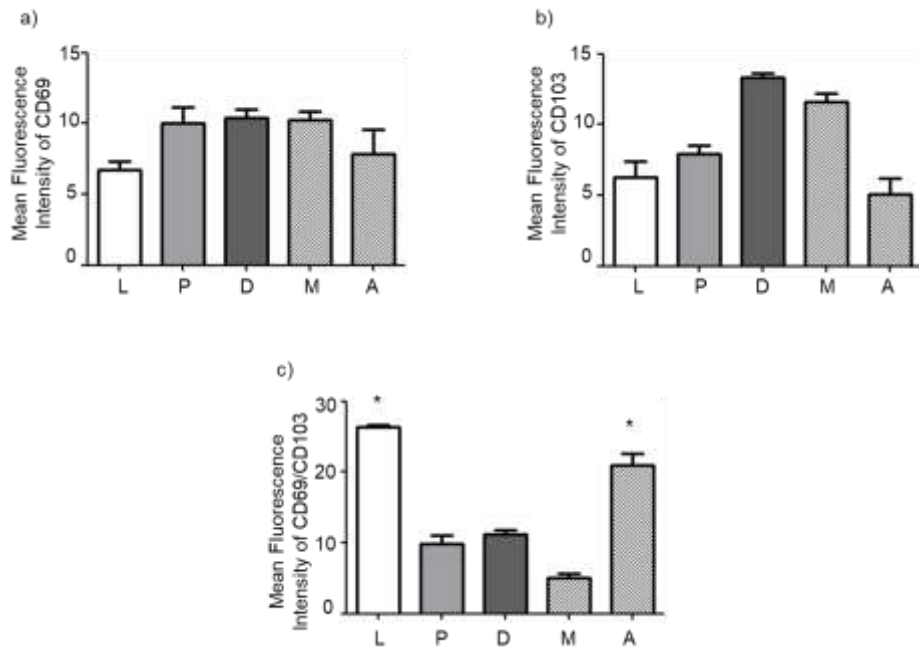
b)



**Imágenes representativas de un paciente con vitiligo a) antes y b) después de 30 sesiones, mostrando patrón marginal, difuso, folicular y acrómico sin respuesta*

II. Cantidad de células TRM CD69+CD103+ y su disposición entre los distintos patrones de repigmentación

Existió una disminución en la fluorescencia de las TRM CD69+CD103+ en todos los patrones de repigmentación en comparación con la piel lesional (ANOVA, $p < 0.05$). La intensidad media de fluorescencia fue menor en el patrón marginal (5 ± 3), seguido por el difuso (10 ± 2), folicular (10 ± 4) y finalmente elacrómico (20 ± 3). Además, cuando se analizó individualmente, la intensidad media de la fluorescencia de las células CD103+ fue mayor en el patrón difuso (14 ± 3) y marginal (12 ± 3). Mientras que las CD69+ fue menor en piel lesional (6 ± 2) y lesiones acrómicas que no respondieron (7 ± 3). Esta información es presentada en la **Figura 2** (Ver anexos) y en la **Figura 3. Niveles de células TRM CD69+CD103+ en piel con vitiligo después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. Intensidad media de fluorescencia de a) CD69+, b) CD103+ y c) TRM CD103+CD69+:**



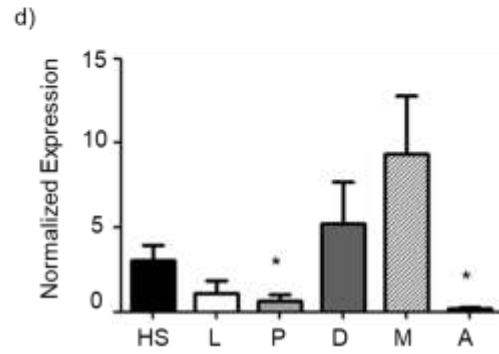
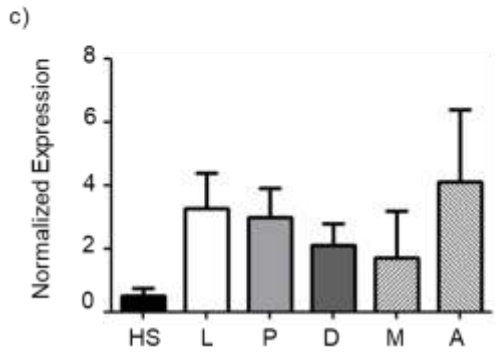
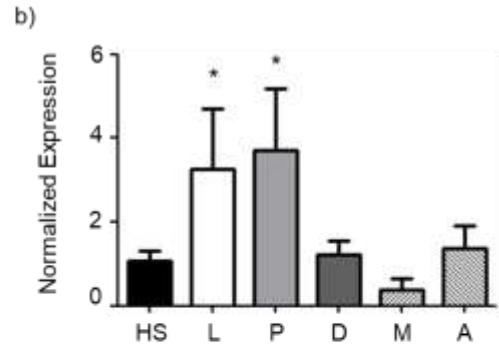
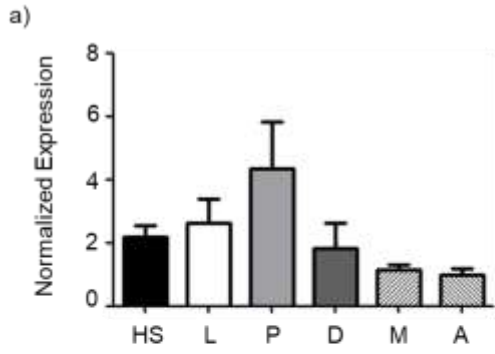
*Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar de 3 pacientes. * Diferencia significativa con $p < 0.05$ (valores de P para ANOVA). L = lesión; P = folicular; D = difuso; M = marginal; y A = acrómico

La localización y organización de las TRM CD69+CD103+ fue diferente en los distintos patrones de repigmentación. En la piel lesional y el patrón acrómico se observan en dermis papilar en disposición en hilera hacia el estrato basal. En el patrón difuso se observan en pequeños agregados en la dermis papilar y reticular superficial. En el patrón marginal se observan en pequeños agregados en dermis papilar y en hilera en las papilas dérmicas. En el patrón perifolicular se observan en banda en la dermis reticular superficial y perianexial. Esto es presentado en la **Figura 2** (Ver anexos).

III. Expresión de los factores de transcripción de las células TRM en piel sana y piel lesional, así como entre los patrones de repigmentación

La expresión de Runx3 y Hobit fue mayor en piel lesional comparado con piel sana (Mann-Whitney, $p < 0.03$ y $p < 0.04$, respectivamente), mientras que la expresión de Blimp1 fue menor en piel lesional comparado con piel sana (Mann-Whitney, $p < 0.01$). No se encontró diferencia significativa en la expresión de Notch1.

El patrón perifolicular mostró mayor expresión de Runx3 (Kruskal-Wallis, $p < 0.04$), menor expresión de Blimp1 (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) y no mostró diferencia significativa en la expresión de Notch1 ni Hobit. Tanto el patrón difuso como el marginal mostraron menor expresión de Runx3 (Kruskal-Wallis, $p < 0.04$), mayor expresión en Blimp1 (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) y no mostraron diferencia significativa en la expresión de Notch1 ni Hobit. El patrón acrómico mostró menor expresión de Blimp1 (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$) y no mostro diferencia significativa en la expresión de Notch1, Hobit ni Runx3. Esto se muestra en la **Figura 4. Expresión de los factores de transcripción de las células TRM. Expresión relativa de mRNAs medidos por PCR-RT a) Notch1, b) Runx3, c) Hobit, y d) Blimp-1 en biopsias de piel de pacientes al inicio y en cada patrón de repigmentación al finalizar 30 sesiones de fototerapia UVB-BE:**



*Los resultados fueron normalizados con respecto al gen 18s. Los resultados corresponden a la media +/- desviación estándar de 30 pacientes. * Diferencia significativa con $p < 0.05$ (valores de P para prueba t). HS = piel sana; L = lesión; P = folicular; D = difuso; M = marginal; y A = acrómico

10. DISCUSIÓN

La expresión de las TRM disminuyó en todos los patrones de repigmentación y en las lesiones que no respondieron, al término de un ciclo de fototerapia UVB-BE. Así mismo, la expresión de los factores de transcripción de las células TRM fue diferente antes y después de un ciclo de fototerapia UVB-BE, así como entre los distintos patrones de repigmentación.

El vitiligo es causado por una destrucción selectiva autoinmune de melanocitos (1,7). Sus recaídas suelen ser del 40% en el primer año y en el mismo sitio de lesiones previas (3), sugiriendo la participación de la autoinmunidad local. Estudios previos en modelos de ratones han mostrado que las células TRM CD8+CD69+CD103+, un subconjunto de linfocitos T, están incrementadas en las lesiones de vitiligo (3,13). Estas células expresan factores de transcripción específicos, que regulan su diferenciación y mantenimiento (2,7,8). La fototerapia UVB-BE induce patrones de repigmentación de duración variable, por medio de activación, migración y diferenciación de melanocitos, e inmunomodulación (18). Esta diferencia en la duración de cada patrón de repigmentación podría estar relacionada con la modificación causada por la fototerapia en la cantidad y localización de las células TRM. Por lo tanto, su caracterización incluyendo sus factores de transcripción en cada patrón de repigmentación, podría ser útil para entender el papel de la autoinmunidad local en la respuesta a los diferentes tratamientos, duración de la pigmentación y recaídas.

En este estudio, se evaluaron los cambios en las células TRM CD69+CD103+ y sus factores de transcripción entre los patrones de repigmentación inducidos por UVB-BE. Los resultados mostraron que las células TRM y sus factores de transcripción se expresan de diferente forma. Las lesiones estaban más infiltradas por las células TRM CD69+CD103+ en comparación con la piel sana, con localización predominante en la capa basal (3). También mostró una mayor expresión de Runx3 y Hobit con

menor expresión de Blimp-1, lo que implica que las células TRM existentes y la granzima B tengan un mantenimiento a largo plazo, causando un ataque crónico a los melanocitos, y un estímulo para el desarrollo de células TRM nuevas (2,7). Contrario a lo reportado en estudios previos, se encontró una disminución en la expresión de Blimp-1, lo cual implica menor diferenciación en células TRM pero un estímulo para la diferenciación de las células T vírgenes en células TCM (9). Por lo tanto, la diferencia en la expresión de los factores de transcripción de las células TRM podría estar relacionado con la mejoría clónica en los diferentes patrones de repigmentación inducidos por fototerapia UVB-BE.

Las células TRM CD69+CD103+ disminuyeron de forma diferente en cada patrón de repigmentación después de un ciclo de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE, lo cual fue respaldado por la variación en sus factores de transcripción. Las células TRM CD69+CD103+ disminuyeron 60% en el patrón folicular, mostrando una expresión más baja de Blimp-1 y aumentada de Runx3, lo que significa menos infiltración de células TRM y función citotóxica, pero un estímulo para la diferenciación de las células T vírgenes en TCM (6,9), y un estímulo para el mantenimiento a largo plazo de las células TRM e inducción de Blimp-1 (7,11,13). Estos hallazgos pueden explicar el comportamiento clínico más común de este patrón que se manifiesta con una repigmentación más rápida en comparación con los demás patrones, pero una involución rápida. Las células TRM CD69+CD103+ disminuyeron 60 % y 80 % en los patrones difuso y marginal, respectivamente. Presentando aumento en la expresión de Blimp-1 y menor expresión de Runx3, lo que significa una mayor disminución de las células TRM existentes en comparación con el patrón folicular y las lesiones que no responden, pero un estímulo para la inducción de Blimp-1 y diferenciación de células T vírgenes en nuevas células TRM y no en células TCM (6,9), con menor mantenimiento a largo plazo de las mismas. Estos hallazgos pueden estar de acuerdo con la observación clínica de mayor estabilidad y duración en la repigmentación de estos patrones, pero son frecuentes las recaídas ya que no eliminan completamente las células TRM (18). Las células TRM CD69+CD103+

disminuyeron aproximadamente un 20 % en las lesiones que no respondieron, mostrando una menor expresión de Blimp-1. Este fue el patrón con la menor disminución de las células TRM, exhibiendo un estímulo para la diferenciación de células T vírgenes en TCM lo cual genera una señal constante para la producción de células efectoras (6,9); hallazgos posiblemente relacionados con su falta de respuesta.

Contrario a estudios publicados previamente, se encontró una disminución en la expresión de Blimp-1 en la piel lesionada, patrón folicular y lesiones que no respondieron, lo cual podría implicar una diferenciación de células T vírgenes en células TCM y no en células TRM. En modelos de ratones se ha observado una reducción relativa pero no una eliminación completa de las células TRM, mediante el uso de anticuerpos anti-CD122 que bloquean la interleucina-15 (7,19), y ruxolitinib o tofacitinib que inhiben la señalización a través de IFN-g y evitan la acumulación de células T en la piel (21). Sin embargo, nunca se ha medido en humanos ni después del tratamiento con fototerapia, por lo que, hasta donde sabemos, este es el primer estudio en humanos con vitiligo que demuestra la asociación entre la fototerapia, los patrones de repigmentación, las células TRM y los factores de transcripción. Por lo tanto, se muestra que la modificación de las células TRM y sus factores de transcripción por medio de la fototerapia UVB-BE, podría estar relacionada con la formación de nuevo pigmento y la persistencia del mismo en cada patrón. Esto podría sugerir la necesidad de nuevos protocolos de fototerapia o tratamientos de mantenimiento para la supresión sostenida de las células TRM, con lo cual se podría conseguir una repigmentación duradera.

11. LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Sólo se incluyó una muestra relativamente pequeña de pacientes y no se evaluaron aquellos con vitiligo activo, ya que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de repigmentación y no el de estabilización.

Futuras perspectivas de investigación podrían ser:

- Medición longitudinal de las TRM y sus factores de transcripción a los 4, 8 y 12 meses post-fototerapia para evaluar si las modificaciones encontradas en el presente trabajo se mantienen en el tiempo ó tienden a volver a los valores pre-fototerapia. Así como su correlación con el comportamiento clínico de la repigmentación y/o recidivas.
- Medición longitudinal de las TRM y sus factores de transcripción utilizando protocolos de fototerapia de mantenimiento con 1 sesión semanal y/o tratamientos combinados para evaluar si esto mantiene el bloqueo de las TRM y sus factores de transcripción. Así como su correlación con el comportamiento clínico de la repigmentación y/o recidivas.
- Comparar las TRM y sus factores de transcripción entre pacientes con lesiones activas y estables, para evaluar si existe diferente perfil de las mismas y por lo tanto requieran diferentes tratamientos dirigidos.
- Comparar la expresión de las TRM y TCM, para evaluar la inter-relación entre ambas vías en la patogenia del vitiligo, respuesta a tratamientos y recidivas.

12. CONCLUSIONES

En conclusión, se proporciona información acerca de la modificación de las células TRM y sus factores de transcripción mediante el empleo de fototerapia UVB-BE, así como la diferente expresión entre cada patrón de repigmentación. En este trabajo, la repigmentación se asoció con una disminución en la cantidad de las células TRM, la cual fue mayor pero no completa en los patrones marginal y difuso. En cada patrón de repigmentación se encontró una diferente expresión de los factores de transcripción, lo cual podría estar relacionado con el diferente comportamiento clínico.

En la piel lesionada predominó la diferenciación en células TCM con ataque crónico de los melanocitos. En el patrón marginal y difuso, diferenciación en células TRM con disminución en el mantenimiento a largo plazo de las mismas. En el patrón folicular, diferenciación en células TCM y mantenimiento a largo plazo de las TRM con estímulo para inducción de Blimp-1. Mientras que en las lesiones que no respondieron, diferenciación en células TCM.

Estos hallazgos podrían establecer nuevas fronteras en el tratamiento del vitiligo, con tratamientos potenciales que modifiquen las células TRM y sus factores de transcripción, para mejorar las tasas de respuesta clínica, lograr repigmentación de mayor duración y disminuir las recaídas.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *The Lancet*. 2015;386(9988):74-84.
2. Frączek A, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. The Role of TRM Cells in the Pathogenesis of Vitiligo—A Review of the Current State-Of-The-Art. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3552.
3. Boniface K, Seneschal J. Vitiligo as a skin memory disease: The need for early intervention with immunomodulating agents and a maintenance therapy to target resident memory T cells. *Exp Dermatol*. 2019;28(6):656-61.
4. Chen L, Shen Z. Tissue-resident memory T cells and their biological characteristics in the recurrence of inflammatory skin disorders. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(1):64-75.
5. Coias J, Hynan LS, Pandya AG. Lack of correlation of the patient-derived Vitiligo Disease Activity Index with the clinician-derived Vitiligo Area Scoring Index. *J Am Acad Dermatol*. mayo de 2018;78(5):1015-6.
6. Zubair R, Hamzavi IH. Phototherapy for Vitiligo. *Dermatol Clin*. 2020;38(1):55-62.
7. Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment. *Annu Rev Immunol*. 2020;38(1):621-48.
8. Silpa-Archa N, Weerasubpong P, Junsuwan N, Yothachai P, Supapueng O, Wongpraparut C. Treatment outcome and persistence of repigmentation from narrow-band ultraviolet B phototherapy in vitiligo. *J Dermatol Treat*. 2019;30(7):691-6.
9. Xu Q-N, Zhu H-Q. The Roles of Skin-Resident Memory T Cells in Dermatoses. *Int J Dermatol Venereology*. 2019; 2 (1): 29-32
10. Riding RL, Harris JE. The Role of Memory CD8 + T Cells in Vitiligo. *J Immunol*. 2019;203(1):11-9.
11. van der Gracht ETI, Behr FM, Arens R. Functional Heterogeneity and Therapeutic Targeting of Tissue-Resident Memory T Cells. *Cells*. 2021;10(1):164.

12. Willemsen M, Linkutė R, Luiten RM, Matos TR. Skin- resident memory T cells as a potential new therapeutic target in vitiligo and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(5):612-22.
13. Tokura Y, Phadungsaksawasdi P, Kurihara K, Fujiyama T, Honda T. Pathophysiology of Skin Resident Memory T Cells. *Front Immunol.* 2021;11:618897.
14. Khalil S, Bardawil T, Kurban M, Abbas O. Tissue-resident memory T cells in the skin. *Inflamm Res.* 2020;69(3):245-54.
15. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, Liao Y, Nota B, Seillet C, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science.* 2016;352(6284):459-63.
16. Milner JJ, Toma C, Yu B, Zhang K, Omilusik K, Phan AT, et al. Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. *Nature.* 2017;552(7684):253-7.
17. Samat AAK, van der Geest J, Vastert SJ, van Loosdregt J, van Wijk F. Tissue–Resident Memory T Cells in Chronic Inflammation—Local Cells with Systemic Effects? *Cells.* 2021;10(2):409.
18. Behr FM, Chuwonpad A, Stark R, van Gisbergen KPJM. Armed and Ready: Transcriptional Regulation of Tissue-Resident Memory CD8 T Cells. *Front Immunol.* 2018;9:1770.
19. Richmond JM, Strassner JP, Rashighi M, Agarwal P, Essien KI, Pell LS, et al. Resident memory and recirculating memory T cells cooperate to maintain disease in a mouse model of vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2019 Apr;139(4):769-778
20. Wu H, Liao W, Li Q, Long H, Yin H, Zhao M, et al. Pathogenic role of tissue-resident memory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2018;17(9):906-11.
21. Sasson SC, Gordon CL, Christo SN, Klenerman P, Mackay LK. Local heroes or villains: tissue-resident memory T cells in human health and disease. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(2):113-22.
22. Esmat S, Hegazy RA, Shalaby S, Chu-Sung Hu S, Lan C-CE. Phototherapy and Combination Therapies for Vitiligo. *Dermatol Clin.* 2017;35(2):171-92.

23. Bae JM, Jung HM, Hong BY, Lee JH, Choi WJ, Lee JH, et al. Phototherapy for Vitiligo: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2017;153(7):666.
24. Rana S, Byrne SN, MacDonald LJ, Chan CY-Y, Halliday GM. Ultraviolet B Suppresses Immunity by Inhibiting Effector and Memory T Cells. *Am J Pathol.* 2008;172(4):993-1004.
25. Lin F, Sun X, Lei J, Xu A. Altered circulating memory T cells in vitiligo cases followed NB-UVB therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2022;38(1):76-82.
26. Castanedo-Cázares JP, Cortés-García JD, Fuentes-Ahumada C, Martínez-Rosales K, Torres-Álvarez B. Repigmentation patterns induced by NB-UVB and their relationship with melanocytic migration and proliferation in vitiligo. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2016;32(5-6):269-75.
27. Patra V, Laoubi L, Nicolas J-F, Vocanson M, Wolf P. A Perspective on the Interplay of Ultraviolet-Radiation, Skin Microbiome and Skin Resident Memory TCR $\alpha\beta$ + Cells. *Front Med.* 2018;5:166.
28. Richmond JM, Strassner JP, Zapata L, Garg M, Riding RL, Refat MA, et al. Antibody blockade of IL-15 signaling has the potential to durably reverse vitiligo. *Sci Transl Med.* 2018;10(450)
29. Azzolino V, Zapata L, Garg M, Gjoni M, Riding RL, Strassner JP, et al. Jak Inhibitors Reverse Vitiligo in Mice but Do Not Deplete Skin Resident Memory T Cells. *J Invest Dermatol.* 2021;141(1):182-184.e1.
30. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investig En Educ Médica.* 2013;2(8):217-24

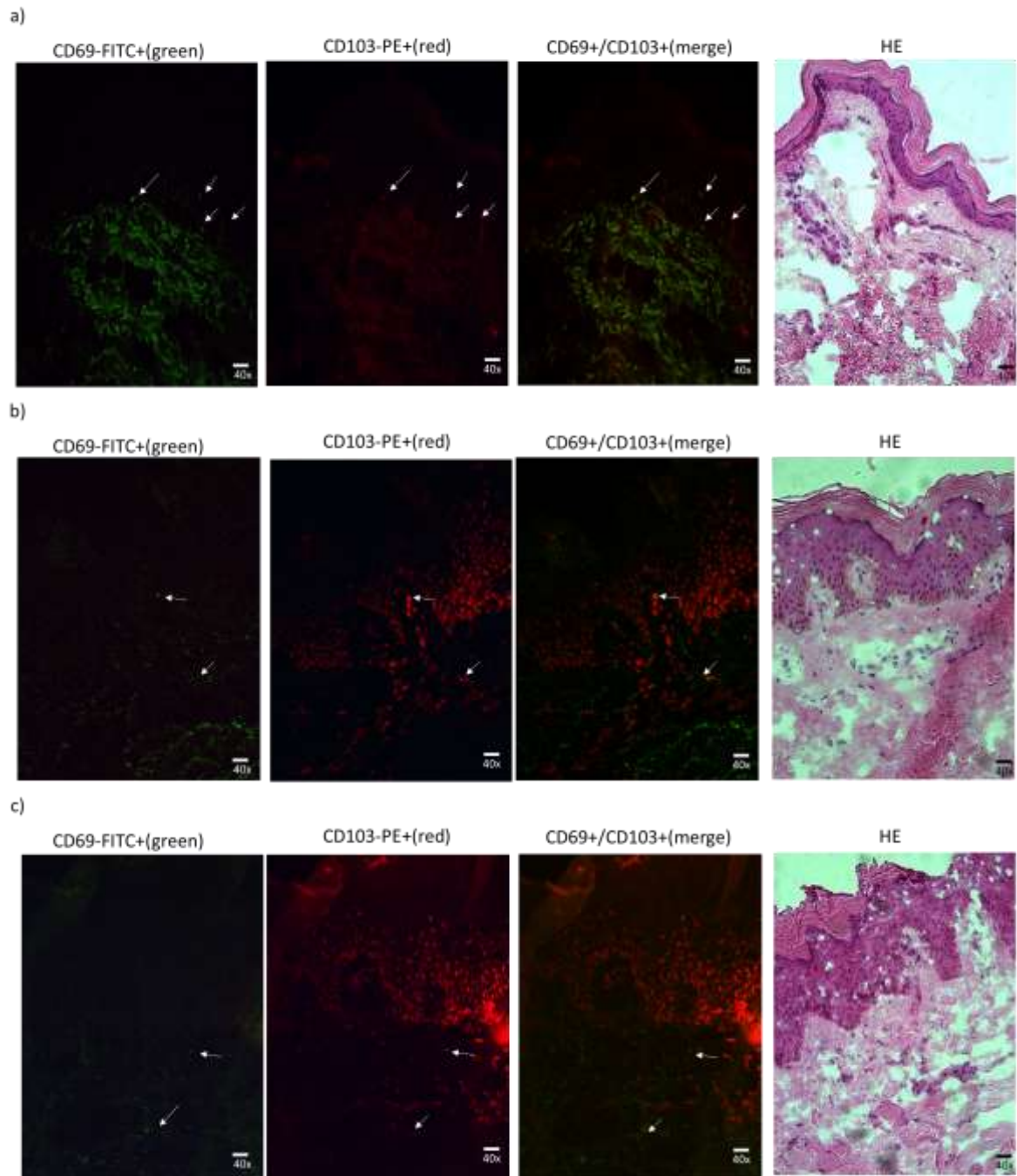
Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para PCR en tiempo real. Los diferentes cebadores usados para evaluar la expresión de mRNA. Tm= temperatura de anidaje. C = concentración

Gen	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)	C (nM)	Gen Bank Access
Blimp-1	GTGTCAGAACGGGATGAACA	GCTCGGTTGCTTTAGACTGC	60	200	NM_001198
Hobit	CATATGTGGCAAGAGCTTTGG	GGCAAGTTGAGTGAAGCTCT	60	200	NM_001114759.3
Runx3	GAGTTTCACCCTGACCATCACT	TGTGCTCGGTGTCACCCGCAT	60	200	NM_001031680.2
Notch1	CACGCTGACGGAGTACAAGT	GGCACGATTTCCCTGACCA	60	200	NM_017617.5
18s	GGCACGATTTCCCTGACCA	GCTGGAATTACCGCGGCT	60	200	NR_003286.4

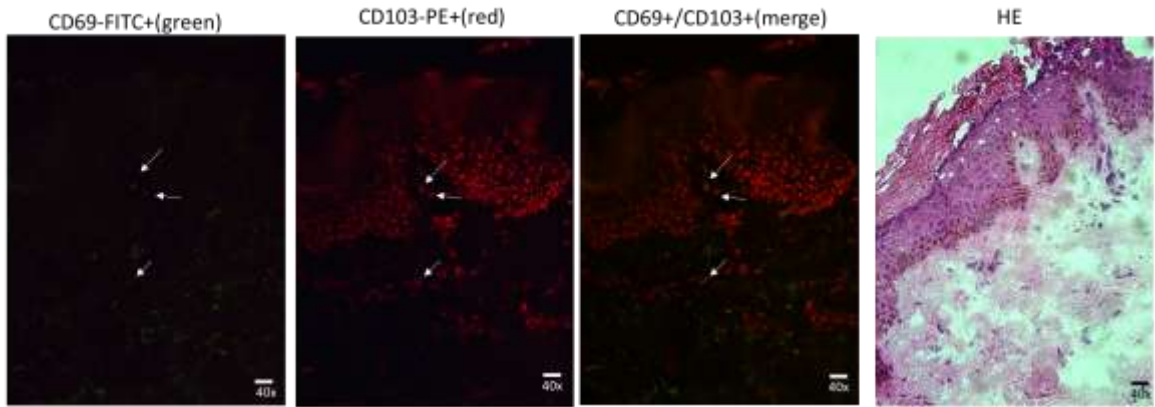
Tabla 2. Características clínicas de los 11 pacientes con vitiligo tratados con 30 sesiones de fototerapia UVB-BE.

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO (n=11)	
Género; n (%)	
Femenino	9 (81)
Masculino	2 (18)
Edad (años); media (DE)	41 (18)
Tiempo de evolución (años); media (DE)	13 (12)
Escala VIDA; n (%)	
0	4 (36)
1	3 (27)
2	4 (36)
Superficie afectada (%); media (DE)	24% (6)
Dosis total acumulada de UVB-BE (mJ/cm ²); media (DE)	14,943 (4,843)

Figura 2. Infiltración cutánea de células TRM CD69+CD103+. Comparación representativa de H&E e inmunofluorescencia directa. a) piel con vitiligo antes del tratamiento, y b) folicular, c) difuso, d) marginal y e) acrómico que no respondió después de 30 sesiones de fototerapia UVB-BE. (x400). Células TRM CD69+CD103+ marcadas con una flecha.



d)



e)

