

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DEL
SISTEMA INMUNE EN PACIENTES CON VITÍLIGO Y/O
HALO NEVUS**

Marta González de Arriba
Salamanca, 2016

Directoras:
Dra. M^aBelén Vidriales Vicente
Dra. Emilia Fernández López

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA
DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES CON
VITÍLIGO Y/O HALO NEVUS

Marta González de Arriba
Salamanca, 2016

Directoras:
Dra. M^a Belén Vidriales Vicente
Dra. Emilia Fernández López

*A mis padres,
Roberto y Gaby*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Belén Vidriales Vicente, directora de esta tesis y promotora de este estudio. Gracias por tu esfuerzo y dedicación, especialmente durante los últimos meses.

A la Dra. Emilia Fernández López, igualmente directora de esta tesis. Gracias por tu tiempo y disponibilidad, tu apoyo, trabajo y comprensión.

Al personal de Laboratorio de Hematología, por su inestimable trabajo, y en especial a Irene, siempre dispuesta y con una sonrisa.

A Manuela, que confió en mí desde el principio, gracias por tus consejos siempre acertados y por tus ánimos. Gracias también al resto del equipo del café matutino, Maite y Carlos, por su apoyo y por hacer que sea agradable cada comienzo de la mañana.

A Mónica, gracias por tu orientación y por brindarme siempre tu ayuda, que seguro, seguiré necesitando.

A Virginia, por tus sabias palabras en los momentos de desánimo.

Al resto del equipo de Dermatología, gracias por vuestra colaboración, sin la cual, este estudio no habría sido posible. Gracias al personal de enfermería, Isabel, Clara y Maribel, por su disponibilidad en la extracción de muestras y su amabilidad en el trato.

A Luis García Ortíz, responsable del estudio estadístico. Gracias por tu esfuerzo y tus consejos.

A Alejandro, que no ha dudado de mí en ningún momento.

El presente trabajo de Tesis Doctoral forma parte de un Proyecto de Investigación de la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, aprobado en la convocatoria de 2013, con el número de expediente GRS 844/A/13 y titulado “CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA, GENÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES CON VITÍLIGO”, llevado a cabo en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, bajo la dirección de la Dra. M^a Belén Vidriales Vicente como Investigadora Principal.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 23

1. EL MELANOCITO Y SU CAPACIDAD INMUNOGÉNICA.....	25
1.1. Melanocito	25
1.1.1. Síntesis de melanina	25
1.1.1.1. Proteínas catalizadoras	25
1.1.1.2. Proteínas melanosomales y transportadoras.....	26
1.1.2. Regulación de la síntesis de eumelanina	21
1.2. Nevus melanocítico	27
1.3. Halo nevus	28
1.3.1. Concepto.....	28
1.3.2. Epidemiología.....	28
1.3.3. Etiopatogenia.....	28
1.3.4. Histopatología.....	28
1.3.5. Evolución y manejo	28
1.4. Melanoma.....	29
1.4.1. Regresión y despigmentación vitiligoide	29
1.4.2. El sistema inmune como diana terapéutica.....	30
1.4.2.1. Interferón.....	31
1.4.2.2. Interleuquina 2.....	31
1.4.2.3. Bloqueo CTLA-4.....	31
1.4.2.4. Bloqueo PD-1	32
1.5. Antígenos relacionados.....	32
1.5.1. Antígenos del cáncer/testículo.....	32
1.5.2. Antígenos de diferenciación	33
1.5.2.1. Proteínas de membrana del melanosoma.....	33
1.5.2.2. Gangliósidos	33
2. VITÍLIGO.....	35
2.1. Concepto y epidemiología.....	35
2.2. Evolución y repercusión sobre la calidad de vida	35
2.3. Diagnóstico y Clasificación.....	35
2.3.1. Vitíligo o vitíligo no segmentario.....	36
2.3.2. Vitíligo segmentario	36
2.3.3. Vitíligo mixto	36
2.3.4. Vitíligo indeterminado.....	36
2.4. Etiopatogenia y comorbilidades	36
2.4.1. Teoría autoinmune.....	37
2.4.2. Teoría neurohumoral	37
2.4.3. Teoría tóxica/autotóxica	38
2.4.4. Otras teorías.....	38
2.5. Histopatología.....	39
2.6. Fenómeno de Koebner.....	40
2.6.1. Clasificación	40
2.6.1.1. Tipo 1: según historia clínica	41
2.6.1.2. Tipo 2: clínicamente.....	41
2.6.1.3. Tipo 3: inducido experimentalmente.....	41
2.6.2. Etiopatogenia	42

2.6.3. Significado clínico	44
2.7. Sistemas de medida de extensión y actividad.....	44
2.7.1. Examen clínico directo y bajo Luz de Wood	44
2.7.2. Vitíligo Area Scoring Index (VASI)	45
2.7.3. Vitíligo European Task Force evaluation system (VETFes).....	47
2.7.4. Vitíligo Disease Activity (VIDA).....	48
2.7.5. Vitíligo Potential Repigmentation Index (VPRI)	49
2.8. Vitíligo segmentario y no segmentario.....	50
2.9. Vitíligo y halo nevus.....	51
2.10. Vitíligo y melanoma	52
3. SISTEMA INMUNE Y VITÍLIGO.....	53;Error! Marcador no definido.
3.1. Hematopoyesis: interleuquinas y factores de crecimiento	54
3.2. Inmunidad innata y autoinmunidad	55
3.3. Inmunidad adaptativa	58
3.3.1. Inmunidad celular	62
3.3.1.1. Linfocitos TCD8+	62
3.3.1.2. Linfocitos TCD4+	63
3.3.1.2.1. Linfocitos Th1 y Th2.....	64
3.3.1.2.2. Linfocitos Th17	64
3.3.1.2.3. Linfocitos T reguladores.....	65
3.3.2. Inmunidad humoral.....	68
3.4. Principales marcadores inmunofenotípicos	69
4. ESTUDIOS GENÓMICOS	71
4.1. Estudios de asociación de genes candidatos.....	71
4.2. Estudios de genoma completo	72
4.2.1. Estudios de ligamiento (Genome-Wide Linkage Studies)	72
4.2.2. Estudios de asociación (Genome-Wide Association Studies).....	73
4.3. Principales loci relacionados con vitíligo generalizado	75
5. ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS.....	77
6. TRATAMIENTO DEL VITÍLIGO	80
6.1. Tratamientos clásicos	80
6.2. Nuevas perspectivas	82
6.2.1. LTreg como diana terapéutica	82
6.2.2. Estatinas e inhibición STAT.....	82
6.2.3. Conversión de fibroblastos en melanocitos funcionales.....	84
6.2.4. Terapias biológicas	85
7. CITOMETRÍA DE FLUJO	86

7.1. Fundamentos básicos de la CMF	86
7.2. Aplicaciones clínicas de la CMF	88
7.3. CMF y caracterización del sistema inmune.....	90
7.3. Estudios inmunofenotípicos mediante CMF en vitíligo	90
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	93
1. JUSTIFICACIÓN	95
2. HIPÓTESIS	95
3. OBJETIVOS	96
3.1. Objetivo principal	96
3.2. Objetivos específicos	96
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	99
1. DISEÑO.....	101
2. PACIENTES Y MUESTRA.....	101
2.1. Selección de casos y controles.....	101
2.2. Variables Clínicas.....	102
3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO	115
3.1 Estudios Inmunofenotípicos en sangre periférica mediante CMF.....	115
3.2 Aislamiento de poblaciones celulares y almacenamiento de sueros	121
6. ESTUDIO ESTADÍSTICO	122
IV. RESULTADOS	123
1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE	125
1.1. Variables Demográficas	125
1.2. Variables Clínicas.....	125
1.2.1. Forma Clínica	125

1.2.2. Tipos Clínicos de VNS y afectación mucosa	127
1.2.3. Fototipo y desencadenantes según forma clínica	128
1.2.4. Grados de afectación según forma clínica.....	129
1.2.3. Caracterización de Halo Nevus	130
1.2.6. Antecedentes personales y familiares.....	131
1.2.7. Tratamiento.....	133
1.3. Variables analíticas de autoinmunidad	133
2. RESULTADOS POR OBJETIVOS	135
2.1. OBJETIVO 1:	135
2.1.1. Casos totales frente a controles	135
2.1.2. Vitíligo no segmentario frente a grupo control	149
2.1.3. Halo nevus frente a grupo control	160
2.2. OBJETIVO 2:	171
2.3. OBJETIVO 3:	173
2.4. OBJETIVO 4:	184
2.4.1. Correlación entre los parámetros inmunofenotípicos y la superficie corporal afectada y grado de despigmentación del vitíligo según VETF en pacientes con VNS.....	184
2.4.2. Parámetros inmuofenotípicos según índice de progresión	187
2.4.3. Parámetros inmunofenotípicos según la capacidad de repigmentación .	190
2.5. OBJETIVO 5:	192
2.5.1. Diferencias clínicas.....	192
2.5.2. Diferencias inmunofenotípicas	193
2.6. OBJETIVO 6:	194
2.6.1. Alteraciones tiroideas	194
2.6.1.1. Presencia de hipotiroidismo	194
2.6.1.2. Presencia de anticuerpos antiPOT elevados.....	196
2.6.2. Antecedentes personales de atopía	197
V. DISCUSIÓN.....	203
VI. CONCLUSIONES	225
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	231

FIGURAS

Fig.1.Melanocito: Síntesis de melanina y transferencia a través de sus prolongaciones dendríticas.....	25
Fig.2. Síntesis de Feomelanina (marrón-rojiza) y de eumelanina (oscura)	26
Fig.3. Imágenes del eritema exudativo multiforme perinévico	27
Fig.4. Imágenes clínicas de halo-nevus, nevus de Meyerson o “halo-dermatitis”, regresión en melanoma e hipopigmentación vitiligoide asociada a melanoma.....	30
Fig.5. Antígenos de melanoma y de melanocitos que son reconocidos por anticuerpos de vitíligo, y sus principales funciones.....	34
Fig.6. Fenómeno de Koebner tipo 2A	42
Fig.7. Fenómeno de Koebner en el vitíligo e integración de sus múltiples mecanismos etiológicos.....	43
Fig.8. Formas clínicas de vitíligo según Benzekri et al.....	45
Fig.9. Evaluaciones estandarizadas para estimar el grado de pigmentación en el cálculo del VASI	46
Fig.10. Porcentajes de superficie corporal según la regla de los 9	47
Fig.11. Puntuación índice VIDA	49
Fig.12. Relación entre el tipo clínico de vitíligo y los melanocitos remanentes	50
Fig.13. Participación de interleuquinas y factores de crecimiento en la hematopoyesis	55
Fig.14. Relación entre inmunidad innata y autoinmunidad. Citoquinas implicadas ..	57
Fig.15. Interacción CPA-LT: primera y segunda señal	60

Fig.16. Tipos de LT: naive, memoria central y memoria efectora y sus distintos patrones de migración.....	61
Fig.17. Espectro de diferenciación de los LTCD4+	63
Fig.18. Participación del sistema inmune en el desarrollo de vitíligo	66
Fig.19. Principales marcadores inmunofenotípicos.....	70
Fig.20. Genes de susceptibilidad en vitíligo generalizado y su relación con otras enfermedades autoinmunes.....	75
Fig.21. Metodología de estudio con microarrays de DNA.....	78
Fig.22. Análisis transcriptómico de biopsias de vitíligo y piel normal	78
Fig.23. Algoritmo terapéutico en vitíligo	81
Fig.24. Fundamento de la citometría de flujo de fluorescencia.....	88
Fig.25. CRD páginas 1 y 2.....	103
Fig.26. CRD páginas 3 y 4	104
Fig.27. CRD páginas 5 y 6	105
Fig.28. Utilidad de la luz de Wood en la valoración de lesiones de vitíligo	106
Fig. 29. Vitíligo segmentario	107
Fig. 30. Vitíligo acrofacial.....	108
Fig. 31. Vitíligo generalizado	108
Fig. 32. Vitíligo universal.....	109
Fig. 33. Vitíligo mucoso y periorifical	109
Fig. 34. HN incipiente y establecido	110
Fig. 35. HN regresados	110
Fig. 36. HN en repigmentación	110
Fig. 37. Leucotriquia asociada a HN	111
Fig. 38. Fenómeno Koebner 1	112
Fig. 39. Fenómeno Koebner 2A	112
Fig. 40. Fenómeno de Koebner 2B, inducido por depilación con pinzas.....	113
Fig. 41. Vitíligo en progresión con despigmentación parcial.....	113
Fig. 42. Vitíligo estable con despigmentación total	114
Fig. 43. Vitíligo en repigmentación.....	114
Fig. 44. Leucotriquia y ausencia de vello: escaso potencial de repigmentación	115
Fig. 45. Citómetro FACSCanto II BD Biosciencias.....	117
Fig. 46. Plots representativos de algunas de la poblaciones analizadas en sangre periférica (I).....	120

Fig. 47. Plots representativos de algunas de las poblaciones analizadas en sangre periférica (II).....121

TABLAS

Tabla.1. Gradación de los rangos de VASI	46
Tabla.2. Recomendaciones para la puntuación de la extensión, estadio y progresión del vitíligo.....	48
Tabla.3. Diferencias entre vitíligo segmentario y no segmentario	50
Tabla.4. Antígenos melanocitarios y su reconocimiento por parte de linfocitos T y anticuerpos en pacientes con vitíligo.....	63
Tabla.5. Principales loci asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar de vitíligo, identificados mediante estudios de asociación y ligamiento sobre el genoma completo	77
Tabla.6. Genes con expresión disminuida en piel de pacientes con vitíligo	79
Tabla.7. Genes sobreexpresados en piel de pacientes con vitíligo.....	80
Tabla.8. Distribución por décadas de la edad de los pacientes reclutados	102
Tabla.9. Plantilla de recogida de datos analíticos.....	120
Tabla.10 . Edad y sexo de la muestra global	125
Tabla.11. Formas clínicas de los pacientes con Vitíligo y/o Halo Nevus	126
Tabla.12. Datos demográficos y tiempo de evolución de las formas clínicas.....	127
Tabla.13. Características de los pacientes con Vitíligo no segmentario (n=30).....	127
Tabla.14. Características de las formas clínicas	128
Tabla.15 . Grados de afectación según grupos clínicos.....	129
Tabla.16. Índices VIDA y DLQI según grupos clínicos	130
Tabla.17. Caracterización de los halo nevus	131
Tabla.18. Antecedentes personales y familiares.....	130
Tabla.19. Tratamientos según grupos clínicos	133

Tabla.20. Datos analíticos según grupos clínicos (I).....	134
Tabla.21. Datos analíticos según grupos clínicos (II)	135
Tabla 22. Caracterización inmunofenotípica de casos totales frente a controles	139
Tabla 23. Caracterización inmunofenotípica de VNS frente a controles	150
Tabla 24. Caracterización inmunofenotípica de HN frente a controles	161
Tabla 25. Código de paciente, poblaciones celulares separadas y número de células obtenidas para cada una de ellas.....	173
Tabla 26. Caracterización inmunofenotípica de VNS frente a HN y/u otras formas de vitiligo.....	174
Tabla 27. Correlación entre superficie corporal y grado de afectación del vitiligo y parámetros inmunofenotípicos en sujetos con vitiligo no segmentario (n=30).....	188
Tabla 28. Parámetros inmunofenotípicos según el índice de progresión	186
Tabla 29. Parámetros inmunofenotípicos según la capacidad de repigmentación ...	191
Tabla 30. Diferencias clínicas entre grupos de HN	193
Tabla 31. Diferencias inmunofenotípicas entre grupos de HN	193
Tabla 32. Caracterización inmunofenotípica en pacientes no hipotiroideos frente a hipotiroideos	195
Tabla 33. Caracterización inmunofenotípica en pacientes con anticuerpos aPOT normales frente a pacientes con anticuerpos aPOT elevados	196
Tabla 34. Caracterización inmunofenotípica en pacientes no atópicos frente atópicos	198

I. INTRODUCCIÓN

1. EL MELANOCITO Y SU CAPACIDAD INMUNOGÉNICA

1.1. Melanocito

Los melanocitos son células derivadas de la cresta neural que migran hacia epidermis, localizándose justo encima de la membrana basal. Su principal función es la síntesis de melanina, responsable del color de la piel y sus anejos. La melanina es producida en el interior de una organela intracelular especializada llamada melanosoma y finalmente es transferida, a través de sus prolongaciones dendríticas, a los queratinocitos adyacentes, con los que conforma una unidad funcional.

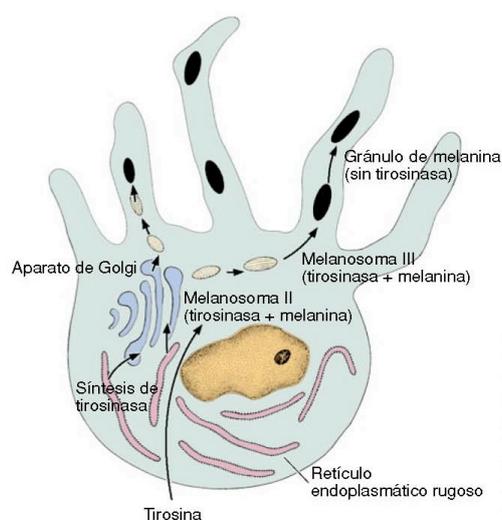


Fig. 1. Melanocito: Síntesis de melanina y transferencia a través de sus prolongaciones dendríticas

1.1.1 Síntesis de melanina

Para la síntesis de melanina se requieren algunas proteínas localizadas en los melanosomas (1):

1.1.1.1. Proteínas que *catalizan* los pasos bioquímicos en la síntesis de melanina:

- Tirosinasa, codificada por el gen TYR
- Proteína 1 relacionada con la tirosinasa, codificada por el gen TYRP-1
- Proteína 2 relacionada con la tirosinasa, codificada por el gen TYRP-2

1.1.1.2. Proteínas con función de *retención* de las estructuras melanosomales y/o *transportadora* de las proteínas melanogénicas o los pigmentos de melanina:

- *Melanoma antigen recognized by T cells*: MART-1, también conocida como Melan-A: forma un complejo con Pmel17, indispensable para su función.

- Pmel17, también conocida como gp100: conforma la matriz fibrilar del melanosoma, permitiendo la síntesis y depósito de la melanina. Frente a esta proteína se utilizan conocidos marcadores inmunohistoquímicos como el HMB-45 (*Human Melanoma Black-45*) para el estudio de tumores melanocíticos.

- Rab7
- Rab27

Todas estas proteínas tienen importancia desde el punto de vista fisiopatológico, diagnóstico y terapéutico en un gran porcentaje de trastornos pigmentarios, como vitiligo, piebaldismo, nevus melanocíticos y melanomas, entre otros (2).

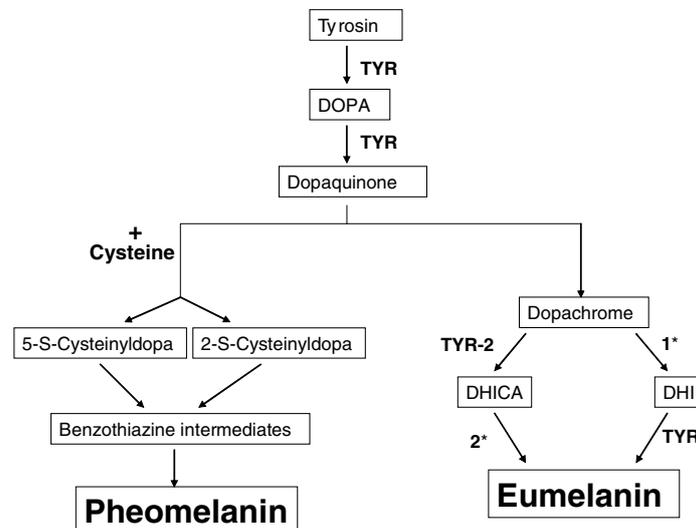


Fig.2. Síntesis de Feomelanina (marrón-rojiza) y de eumelanina (oscura). 1*: Decarboxilación espontánea. 2*: DHIC oxidación, en humanos mediada por TYR y en ratones por TRP-1. TYR = tyrosinase; TRP-1 = tyrosinase-related protein 1; TRP-2 = tyrosinase-related protein 2; DHICA = 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHI = 5,6-dihydroxyindole.

1.1.2. Regulación de la síntesis de eumelanina

La síntesis de eumelanina es estimulada por la unión de la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α MSH) o melanocortina a su receptor en la membrana de los melanocitos, receptor 1 de melanocortina (MC1R). α MSH es producida tanto por la hipófisis, como por los queratinocitos, células de Langerhans y los propios melanocitos. La unión de α MSH a MC1R eleva los niveles de MC1R mRNA, que a su vez mantiene e incrementa la capacidad de respuesta del melanocito a la melanocortina (1).

La hormona relacionada con la concentración de melanina (MCH) tiene una función contraria a la α MSH, inhibiendo la síntesis de melanina a través de su unión a su receptor, receptor 1 de la hormona relacionada con la concentración de melanina (MCHR1) (1).

1.2. Nevus melanocítico

Los melanocitos pueden encontrarse agrupados formando neoplasias benignas conocidas como nevus o nevi melanocíticos. Los nevi melanocíticos, y por ende los propios melanocitos, tienen una elevada capacidad de estimular el sistema inmune, lo que se pone de manifiesto por el desarrollo de multitud de procesos inflamatorios que suelen acontecer alrededor de ellos. Entre estas dermatosis, la más representativa es el halo nevus o nevus de Sutton, pero existen otras muchas como el nevus targetoide, el nevus de Meyerson (halo-dermatitis), la psoriasis perinéfica, o el eritema exudativo multiforme perinéfico; y en todas ellas subyace un fenómeno inmunológico asociado, aunque finalmente no todas conlleven la desaparición del nevus (3).



Fig. 3. Imágenes del eritema exudativo multiforme perinéfico (3).

Asimismo, se ha descrito la aparición de forma eruptiva de nevus melanocíticos en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores, como pueden ser los pacientes transplantados. La involución de estos nevus, una vez se ha suspendido el tratamiento inmunosupresor, también ha sido notificada. Estos hechos ponen de manifiesto el papel del sistema inmune en la limitación de la proliferación de los melanocitos (4).

1.3. Halo nevus

1.3.1. Concepto

Un halo nevus o nevus de Sutton, es un nevus melanocítico rodeado de un área circular periférica de despigmentación, que puede terminar con la regresión espontánea y completa del mismo. La regresión del nevus también puede existir en ausencia de este anillo (“halo nevus sin halo”). Suelen localizarse en tronco, con predominio en la espalda, y hasta en la mitad de los casos son múltiples (2 o más) (5).

1.3.2. Epidemiología

Está presente en más del 1% de la población, especialmente en niños y adolescentes, sin existir diferencias entre géneros. Los pacientes suelen tener antecedentes familiares de halo nevus o vitiligo. Así mismo, los pacientes con vitiligo tienen una frecuencia de 8 a 10 veces mayor de halo nevus (5,6).

1.3.3. Etiopatogenia

Aunque su causa no está bien establecida, parece existir una destrucción de los melanocitos mediada por linfocitos T CD8 citotóxicos. Sólo en algunos pacientes se pueden objetivar clones de linfocitos T específicos, que se pueden detectar en distintos halo nevi de un mismo paciente, y se han identificado en la zona perilesional a nivel cutáneo, aunque no en sangre periférica. El antígeno exacto desencadenante de la reacción inmune es todavía desconocido (5).

1.3.4. Histopatología

En fases iniciales, se objetiva un infiltrado en banda de linfocitos, predominantemente T, en torno a nidos o tecas de melanocitos del nevus. Posteriormente, se objetiva un

denso infiltrado de linfocitos T con perfil citotóxico (CD8) entre y dentro de los nidos de melanocitos. Finalmente, una vez alcanzada la regresión completa, no se objetivan melanocitos y el infiltrado inflamatorio es escaso (5).

1.3.5. Evolución y manejo

Se distinguen 4 fases clínicas o evolutivas, que suelen acontecer en un plazo de 2 años: 1) aparición del halo despigmentado, 2) el nevus central se torna más claro o eritematoso, 3) regresión del nevus central y 4) despigmentación residual, que puede permanecer estable o repigmentarse espontáneamente.

Es frecuente el desarrollo de leucotriquia (pelos blancos) y su asociación con vitíligo segmentario, lo que ha permitido hipotetizar que la respuesta inmune inicial va dirigida hacia los propios nevocitos y melanocitos del folículo piloso o regiones interfoliculares con mayor frecuencia que en el vitíligo clásico, provocando un daño colateral de los melanocitos circundantes que pertenecen al mismo territorio circulatorio, y favoreciendo así el desarrollo de vitíligo segmentario (7).

El halo nevus no requiere ningún tratamiento.

1.4. Melanoma

La capacidad de estimular el sistema inmune se pone de manifiesto también en el melanoma, resultante de la transformación maligna de los melanocitos. Se trata de una neoplasia altamente inmunogénica, describiéndose un 11% de regresiones tumorales espontáneas, frente al 1.8 % del total de cánceres (5).

1.4.1. Regresión y despigmentación vitiligoide

El melanoma es capaz de estimular el sistema inmune para generar una respuesta humoral y principalmente celular frente a antígenos presentes tanto en los melanocitos como en las células del melanoma. Este hecho tendría como consecuencia el rechazo tumoral, provocando una regresión del tumor primario y/o sus metástasis (aunque no suele ser suficiente para el control de la enfermedad), y secundariamente una despigmentación vitiligoide, focal o a distancia, que no presenta diferencias histológicas ni inmunohistoquímicas con respecto a la ocurrida en el vitíligo propiamente dicho

(2,8–10). Esta despigmentación está presente en el 2-7% de los pacientes con melanoma (frente al 1% de vitiligo en la población general), de forma espontánea o inducida tras inmunoterapia, y hasta en un 20% de los casos incluso antes del diagnóstico del melanoma. Clínicamente es similar al vitiligo clásico, si bien suele aparecer de forma más tardía, y la decoloración suele ser parcial y de distribución parcheada o asimétrica. Fenómenos en halo son frecuentes alrededor de metástasis, cicatrices o nevos preexistentes (5). De este modo, la aparición repentina de lesiones hipopigmentadas o fenómenos en halo en pacientes adultos, debe hacernos prestar mayor atención en el examen minucioso y completo de las lesiones melanocíticas (8,11).

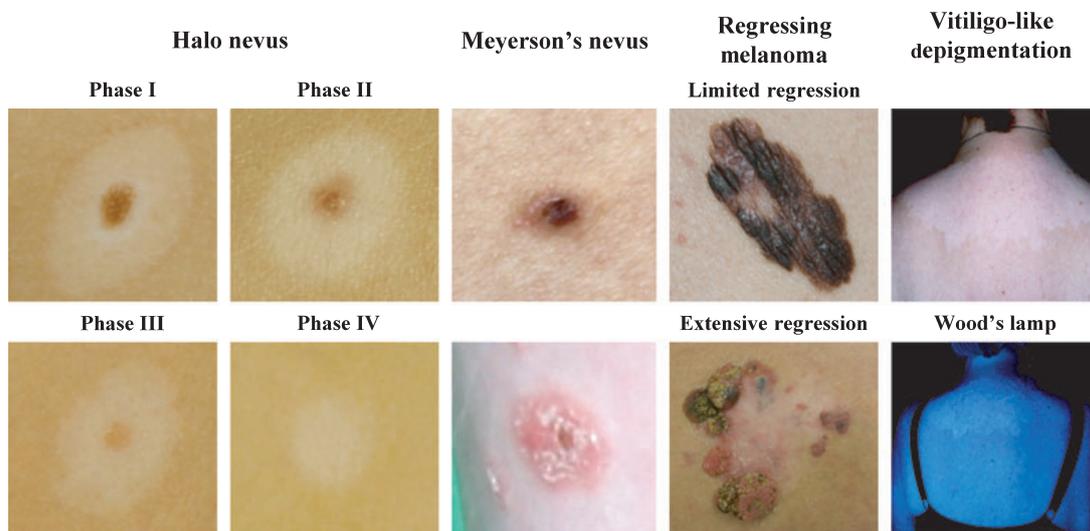


Fig.4. Imágenes clínicas de halo-nevus, nevus de Meyerson o “halo-dermatitis”, regresión en melanoma e hipopigmentación vitiligoide asociada a melanoma (5).

Existen diferencias entre la regresión ocurrida en el melanoma y en el halo nevus. Ambas están mediadas por una destrucción inmune de los melanocitos tumorales, sin embargo, esta regresión suele ser completa en el halo nevus, e incompleta en el melanoma, probablemente debido a una mayor heterogeneidad de las células tumorales, capaces de eludir el sistema inmune. Así, el infiltrado inflamatorio en las áreas de regresión del melanoma es parcheado con un ratio CD4+/CD8+ más elevado que en el caso de un halo nevus, así como una mayor prevalencia de células CD68+ y citoquinas fibrogénicas (12).

1.4.2. El sistema inmune como diana terapéutica

Muchos de los tratamientos adyuvantes utilizados en el melanoma, tanto clásicos como de nueva descripción, tienen como diana el sistema inmune, y tienen como objetivo el desarrollo de respuestas antitumorales dirigidas frente a los melanocitos. Esta interacción favorece el desarrollo de numerosos efectos adversos de carácter autoinmune, entre ellos vitíligo, poniendo de manifiesto el papel de la autoinmunidad en la génesis del mismo. El conocimiento profundo de los mecanismos de acción y efectos secundarios de estos nuevos tratamientos podría ayudar a comprender la etiopatogenia del vitíligo propiamente dicho.

1.4.2.1. Interferon (IFN)

Tanto el IFN α como el IFN β son unas de las citoquinas implicadas en la respuesta inmune innata, especialmente frente a patógenos intracelulares, induciendo la expresión de moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) e inhibiendo la proliferación celular. Su uso en determinadas patologías como la infección por el virus de la hepatitis C, se ha relacionado con el desarrollo de vitíligo en pacientes susceptibles (13).

El interferón alfa se usa igualmente para el tratamiento adyuvante del melanoma maligno, sin embargo sólo una minoría de los pacientes podría beneficiarse de esta terapia. Varios estudios sugieren que el desarrollo de autoanticuerpos o manifestaciones clínicas de autoinmunidad, entre ellas vitíligo, durante el tratamiento adyuvante se ha relacionado con un beneficio significativo en la supervivencia (14,15). Hechos similares se han descrito con el uso de IFN β (9). Por lo tanto, la autoinmunidad provocada por el tratamiento con IFN parece indicar un mejor pronóstico y debe alentar la continuación del mismo.

1.4.2.2. Interleuquina 2 (IL-2)

La IL-2 es una de las principales citoquinas implicadas en la activación de los linfocitos T citotóxicos y células NK. Su uso en melanoma se ha relacionado con el desarrollo de vitíligo en 1/3 de los pacientes que respondieron a la inmunoterapia (16). Igualmente, se ha objetivado un aumento de IL-2 en el suero de pacientes con vitíligo propiamente

dicho (17).

1.4.2.3. Bloqueo CTLA-4

El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) se encarga de la regulación negativa de los LT activados. Su disfunción está relacionada con el desarrollo de vitiligo, especialmente en el contexto de otras enfermedades autoinmunes (18,19). Su bloqueo mediante un anticuerpo específico (ipilimumab) en pacientes con melanoma se ha asociado a un mejor pronóstico y supervivencia global, así como a una frecuencia elevada de efectos secundarios de naturaleza autoinmune como colitis/diarrea y despigmentación vitiligoide, sugiriendo que el CTLA-4 es importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica a autoantígenos (20).

1.4.2.4. Bloqueo PD-1

El receptor PD-1 (*programmed death 1*) es un regulador negativo de los mecanismos de los linfocitos T efectoras que limita la respuesta inmune, también contra las células tumorales. Su bloqueo mediante anticuerpos específicos (lambrolizumab, pembrolizumab, nivolumab) se ha utilizado en pacientes con melanoma avanzado, incluso en aquellos refractarios al tratamiento con ipilimumab u otras terapias dirigidas frente a BRAF, con altas tasas de regresión tumoral (21). Los efectos secundarios autoinmunes son similares a los descritos con ipilimumab, incluyendo vitiligo (20).

Un estudio reciente sugiere además la participación de PD-1 en el agotamiento de los linfocitos T reguladores y el desarrollo de vitiligo activo generalizado (22).

1.5. Antígenos relacionados

La hipopigmentación en asociación con lesiones melanocíticas benignas y malignas es un hecho comunicado con frecuencia. Los pacientes con melanoma y los pacientes con vitiligo desarrollan anticuerpos similares frente antígenos melanocitarios y antígenos específicos de melanoma (1). En el caso de la hipopigmentación vitiligoide asociada a melanoma, probablemente se deba a una respuesta inmune dual contra antígenos presentes tanto en melanocitos como en células tumorales (2).

Los antígenos más relevantes asociados a melanoma pueden clasificarse en (1):

1.5.1. Antígenos del cáncer/ testículo

Están altamente expresados en tejidos normales durante el desarrollo, pero en adultos, su expresión se limita a los *testículos*, la *placenta* y algunos tipos de *cáncer*. En este grupo se encuentran:

1.5.1.1. Familia del antígeno del melanoma: MAGE

1.5.1.2. Familia del antígeno B: BAGE

1.5.1.3. Familia del antígeno G: GAGE

1.5.1.4. New York-esófago: NY-ESO-1

1.5.2 Antígenos de diferenciación

Son antígenos que se expresan tanto en las células *tumorales* como en sus contrapartidas *normales*, y no en otros tipos celulares:

1.5.2.1. Proteínas de membrana del melanosoma:

Tirosinasa

TYRP-1

TYRP-2

Pmel17/gp100

MART-1/Melan-A

1.5.2.2. Gangliósidos:

Se presentan ampliamente en las células de *melanoma*. Se piensa que su papel es el de adhesión célula-célula y célula-matriz, y en la fijación a factores de crecimiento, apuntando hacia el proceso invasivo del tumor.

GD3, GD2, GM2, GM3 y O-acetil GD3

Tanto los pacientes con vitiligo (V) como los pacientes con melanoma y despigmentación vitiligoide (DV) presentan niveles elevados de LTCD8+ frente a MART1 en sangre periférica (23). MART1 y gp100 son consideradas las proteínas más inmunogénicas presentes en los melanocitos, y son hacia las que van frecuentemente dirigidos los LT autorreactivos que infiltran los tumores de melanoma (23).

Las células T reguladoras también están implicadas, *regulando* la activación y expansión de los LT CD8+. Los estudios iniciales que mostraron que un defecto en la función de las células Treg podría contribuir a la despigmentación progresiva de la piel, se realizaron en un modelo de melanoma murino en los que el defecto de células T reguladoras provocó la activación de células T citotóxicas anti-melanoma, que no solo destruyeron los tumores de melanoma, sino también generaron vitíligo como un efecto secundario (24).

Asimismo, en ambos casos (V y DV) se han determinado en suero niveles elevados de autoanticuerpos frente a los antígenos de diferenciación melanocitaria TYR, TYRP-1, TYRP-2 y Pmel17(25)

Antigen	Main function	System of detection
Tyrosinase	The key enzyme in the biosynthesis of melanin	ELISA of mushroom tyrosinase Proteomic approach Radiobinding assay of recombinant human tyrosinase and also ELISA of mushroom tyrosinase Immunoprecipitation DOPastain and by sandwich ELISA (negative results)
TRP-2	Plays a pivotal role in the biosynthesis of melanin and in the rapid metabolism of its toxic intermediates	Western blot and ELISA of recombinant human TRP2
TRP-1	Plays a role in the biosynthesis of melanin and stabilizes tyrosinase by forming a multienzyme complex	Radioimmunoassay of recombinant human TRP1
Pmel17	Forms the fibrillar matrix of the organelle that enables the synthesis and deposition of melanin	Radioimmunoassay of recombinant human Pmel17
MCHR1	MCH/MCHR1 signaling pathway might also function in the regulation of melanocytes and hence melanin production	Radiobinding assays of recombinant human MCHR1
68,90165 kDa	Not known	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot

Fig.5. Antígenos de melanoma y de melanocitos que son reconocidos por anticuerpos de vitíligo, y sus principales funciones (1).

2. VITÍLIGO

2.1. Concepto y epidemiología

El vitíligo es un trastorno adquirido de la pigmentación cutánea y mucosa, caracterizado por la presencia de áreas despigmentadas, secundarias a la pérdida crónica y progresiva de los melanocitos epidérmicos. Tiene una prevalencia estimada de 1% de la población en Estados Unidos y Europa, aunque los rangos van desde menos del 0.1 a más del 8% a nivel mundial, no habiendo diferencias según fototipo o raza (26). A pesar de que las mujeres suelen solicitar tratamiento con mayor frecuencia, parece afectar por igual a hombres y mujeres, si bien en ellas de forma más temprana. En la mitad de los pacientes debuta antes de los 20 años, pudiendo aparecer a edades más tardías o avanzadas. Su debut repentino en pacientes adultos nos debe hacer sospechar otras enfermedades asociadas, siendo recomendable un estudio más minucioso de las lesiones melanocíticas (26).

2.2. Evolución y repercusión sobre la calidad de vida

El curso de la enfermedad es impredecible y puede mantenerse estacionario, puede repigmentarse espontáneamente o tras un tratamiento específico, o bien avanzar progresivamente abarcando áreas extensas de la piel, lo que suele conllevar cierta estigmatización social con consecuencias psicológicas y disminución de la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, la determinación del impacto sobre la calidad de vida medido según la escala DLQI (Dermatology Life Quality Index) determina un rango de puntuación del 4.82 al 14.72, presentando algunos parámetros, como relaciones sociales, ocio o forma de vestir, valores más elevados que en otras enfermedades con conocida repercusión sobre la calidad de vida como es la psoriasis (26). Pese a las diferentes estrategias terapéuticas disponibles en la actualidad, el vitíligo sigue siendo incurable.

2.3. Diagnóstico y clasificación

El diagnóstico es clínico y la enfermedad suele reconocerse fácilmente por la aparición de máculas o manchas hipopigmentadas o acrómicas, es decir blancas, en la piel y las mucosas. Estas manchas se observan más frecuentemente en zonas de fricción o que están sometidas a traumatismos, áreas normalmente más pigmentadas como las regiones periorificiales de la cara, anogenitales o areolares, y suelen hacerse más evidentes en zonas expuestas al sol como son la cara o dorso de las manos.

Así, según su forma clínica, el vitíligo puede clasificarse como (27):

2.3.1. Vitíligo propiamente dicho o vitíligo no segmentario (VNS):

Caracterizado por una distribución multifocal y simétrica de las áreas hipopigmentadas, pudiendo presentar una afectación acrofacial, generalizada (con o sin implicación acrofacial), universal (con un 80-90% de superficie corporal afectada) y mucosa, con más de una mucosa afectada, habitualmente de distribución oro-genital.

2.3.2. Vitíligo segmentario (VS):

Caracterizado porque las máculas o manchas se distribuyen de forma limitada, unilateral y normalmente respetando la línea media.

2.3.3. Vitíligo mixto:

Presenta afectación segmentaria y no segmentaria de forma combinada.

2.3.4. Vitíligo indeterminado

En el que aparecen máculas aisladas y reducidas en tamaño en cualquier localización, pudiendo tratarse de una forma cutánea focal o mucosa pura. Estas formas pueden evolucionar hacia un vitíligo segmentario o no segmentario, o bien permanecer inclasificables.

2.4 Etiopatogenia y comorbilidades

Aunque debido a su naturaleza cutánea, la enfermedad se conozca desde hace siglos, la causa por la que desaparecen los melanocitos no se conoce con exactitud. Se han formulado diferentes teorías sobre su etiopatogenia, atribuyéndolo principalmente a

causas genéticas, autotóxicas, neurohumorales y destacando principalmente la que considera a esta enfermedad de origen autoinmune.

En este sentido, hasta en un 30% de los pacientes puede asociarse a otro tipo de enfermedades autoinmunes como la diabetes, la anemia perniciosa, la enfermedad de Addison, la enfermedad inflamatoria intestinal, la psoriasis, el lupus eritematoso y especialmente las enfermedades tiroideas (26,28).

Asimismo, la mayoría de los tratamientos utilizados, especialmente corticoides, inhibidores de la calcineurina o y/o fototerapia, tienen un conocido efecto inmunosupresor (29,30).

Se ha observado que situaciones como el estrés o los traumatismos (fenómeno de Koebner, véase más adelante) pueden precipitar la aparición de estas lesiones en pacientes predispuestos.

Por tanto, parece ser que en pacientes genéticamente susceptibles, factores como la autoinmunidad, anormalidades neurológicas, estrés, infecciones, factores tóxicos o traumatismos podrían tener un rol patogénico (26).

2.4.1. Teoría autoinmune

La teoría autoinmune es la mejor documentada, en base a los numerosos estudios de asociación genética y de ligamiento en combinación con alteraciones del sistema inmune celular y humoral. Todo ello será ampliamente desarrollado más adelante.

2.4.2. Teoría neurohumoral

Una disregulación del sistema nervioso, local o sistémica, puede ser la causa del daño de los melanocitos en el vitíligo. Este hecho quizá sea más evidente en los casos de vitíligo segmentario, en donde las áreas despigmentadas suelen distribuirse siguiendo trayectos nerviosos, teniendo en cuenta el origen común tanto de los melanocitos como de las células nerviosas en la cresta neural (26).

En piel perilesional y lesional se han objetivado niveles elevados de neuropetido-Y y norepinefrina, así como una disminución de la actividad acetilcolinesterasa parasimpática y aumento de la actividad tirosina hidroxilasa. Este aumento de neurotransmisores y catecolaminas puede ocasionar un daño tóxico directo de los melanocitos, y también indirecto, ya sea por vasoconstricción e hipoxia, o por acúmulo de metabolitos tóxicos derivados de su metabolismo (26).

Asimismo, el vitíligo generalizado suele empeorar en situaciones de estrés. Niveles elevados de ácido homovalínico y vanilmandélico en orina de 24 horas han sido objetivados en pacientes con vitíligo de reciente aparición o en progresión (31).

2.4.3. Teoría tóxica / autotóxica

Esta teoría se basa en que determinadas sustancias, como fenol o quinonas, procedentes de la exposición medioambiental o acumuladas durante el proceso de síntesis de la melanina, pueden dañar los melanocitos en individuos genéticamente predispuestos (26).

Un pequeño subconjunto de los individuos puede desarrollar vitíligo ocupacional o de contacto (VO/VC) tras la exposición a determinadas sustancias químicas. Muchas de estas sustancias se han implicado en la aparición de una leucodermia química. Ambas condiciones se presentan con lesiones de piel despigmentadas bien definidas que se desarrollan tras la exposición al compuesto. Sólo en el caso del vitíligo, la despigmentación se extiende más allá de las zonas de contacto, probablemente a través de un mecanismo inmune.

Los productos químicos más conocidos por desencadenar VO/VC son los derivados fenólicos/catecólicos. En muchos de ellos se ha demostrado su acción citotóxica directa para los melanocitos, debida a la inducción de la apoptosis, tras exposición a dosis altas. Los derivados fenólicos/catecólicos son estructuralmente similares a la tirosina, que es en sí misma un fenol y precursor de la melanina. Determinados datos sugieren que la TYRP-1, facilita la conversión catalítica de estos compuestos, lo que resulta en la generación de radicales libres de oxígeno. La incapacidad genética de los melanocitos de tolerar y/o responder al estrés oxidativo puede ser la base de la etiología del VO/VC (32).

2.4.4. Otras teorías

2.4.4.1. Melanocitorragia

Esta teoría puede explicar en parte el fenómeno de Koebner (FK). Según esta teoría, los melanocitos pueden estar anclados de forma deficiente en la membrana basal, de modo que un pequeño traumatismo o fricción puede provocar su pérdida (33). Así, la fricción repetida de la piel perilesional en pacientes con vitíligo no segmentario puede provocar la pérdida de los melanocitos en las siguientes 4-24 horas (34). La tenascina, una molécula de la matriz extracelular que inhibe la unión de los melanocitos a la fibronectina, parece estar elevada en la piel de pacientes con vitíligo, lo que puede favorecer su pérdida (35). Esta teoría también es apoyada por un estudio reciente que determina una expresión reducida de *Discoidin Domain Receptor 1* (DDR1), un receptor tirosin quinasa involucrado en el anclaje de los melanocitos a la membrana basal epidérmica mediante su unión al colágeno IV, en piel lesional comparada con piel sana (36). Asimismo, se ha objetivado una disminución de la expresión de E-cadherina en piel afectada de pacientes con vitíligo (37). Esta proteína es uno de los principales mediadores de adhesión de los melanocitos a los queratinocitos *in vitro* y también está involucrada en la unión de las células de Langerhans a los queratinocitos, regulando su tolerancia. Una disfunción en este mecanismo podría inducir el desarrollo de una enfermedad autoinmune (38).

2.4.4.2. Disminución de la supervivencia del melanocito:

El *Stem Cell Factor* (SCF) derivado de los queratinocitos es capaz de regular la supervivencia y crecimiento de los melanocitos mediante su unión a los receptores de membrana tirosin-quinasa c-Kit. La disminución en el número de receptores c-Kit (39) en los melanocitos perilesiones, así como la disminución de la expresión del SCF (40) por parte de los queratinocitos circundantes, podría contribuir a la patogénesis del vitíligo.

2.5. Histopatología

En lesiones establecidas, se caracteriza por una ausencia de melanocitos en la epidermis con un escaso infiltrado inflamatorio. En lesiones activas, se objetiva una dermatitis de interfase con vacuolización suprabasal y un infiltrado liquenoide mononuclear en la dermis. Los folículos con pelos pigmentados presentes en la manchas de vitíligo pueden contener melanocitos. De hecho, la duración de la enfermedad está inversamente correlacionada con la presencia de melanocitos en los folículos pilosos (26).

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, en el borde de las lesiones activas se aprecian infiltrados de LTCD8+ autorreactivos, capaces de inducir la apoptosis de los melanocitos, persistiendo un número reducido de los mismos con cambios degenerativos, y prolongaciones dendríticas inusualmente largas (41). Este hecho apoya nuevamente el carácter autoinmune de la enfermedad, así como la presencia de determinadas citoquinas proinflamatorias en piel lesional y marginal, como será comentado más adelante.

2.6. Fenómeno de Koebner

El fenómeno Koebner (FK), también conocido como fenómeno isomórfico, consiste en la aparición de lesiones cutáneas propias de una enfermedad en áreas específicas de piel sometidas a un traumatismo o fricción, en pacientes con determinadas enfermedades cutáneas. Estas lesiones son clínica e histológicamente indistinguibles de la enfermedad original y pueden ser reproducidas experimentalmente (42). Fue descrito por primera vez en 1877 por Koebner en pacientes afectados de psoriasis, pero es común en otras enfermedades dermatológicas, como liquen plano y vitíligo. Aunque se han descrito fenómenos similares en otras entidades como verrugas víricas, moluscos contagiosos o dermatitis alérgicas de contacto, y en gran variedad de otros procesos dermatológicos (42), actualmente sólo se considera en aquellas enfermedades en las que el FK es reproducible en la mayoría de los pacientes a través de diferentes traumatismos, y no es explicado por otros fenómenos de autoinoculación como es el caso de enfermedades infecciosas o alérgicas. Así pues, sólo la psoriasis, el liquen plano y el vitíligo muestran un fenómeno de Koebner verdadero.

2.6.1. Clasificación

La clasificación del FK ha sido propuesta recientemente por el *Vitiligo European Task Force* (VETF)(42).

2.6.1.1. Tipo 1: según historia clínica

¿ Ha presentado algún área despigmentada después de un traumatismo en el *último año*?

Tipo de traumatismo:

- Físico: laceración, corte, escarificación
- Mecánico: fricción
- Químico o térmico (quemaduras)
- Alérgico: de contacto, vacunas, tatuajes
- Presión crónica
- Dermatitis inflamatorias concomitantes
- Tratamientos: radioterapia, fototerapia

2.6.1.2. Tipo 2: clínicamente

A. Despigmentación correspondiente con áreas de repetida presión o fricción (codos y rodillas) o áreas de fricción crónica relacionadas con ropa o accesorios

B. Despigmentación claramente inducida por un traumatismo (linear, puntiforme, dentado)

2.6.1.3. Tipo 3: inducido experimentalmente

- I. Presión o fricción repetida
- II. Traumatismo superficial (epidérmico)
- III. Traumatismo dermoepidérmico

Según esta clasificación, el FK se puede estadificar de la siguiente manera:

- Grado 0: sin evidencia
- Grado I: FK con respuesta tipo 1
- Grado II: FK con respuesta tipo 2A

- Grado III: FK con respuesta tipo 2B
- Grado IV: FK con respuesta tipo 1 + 2B

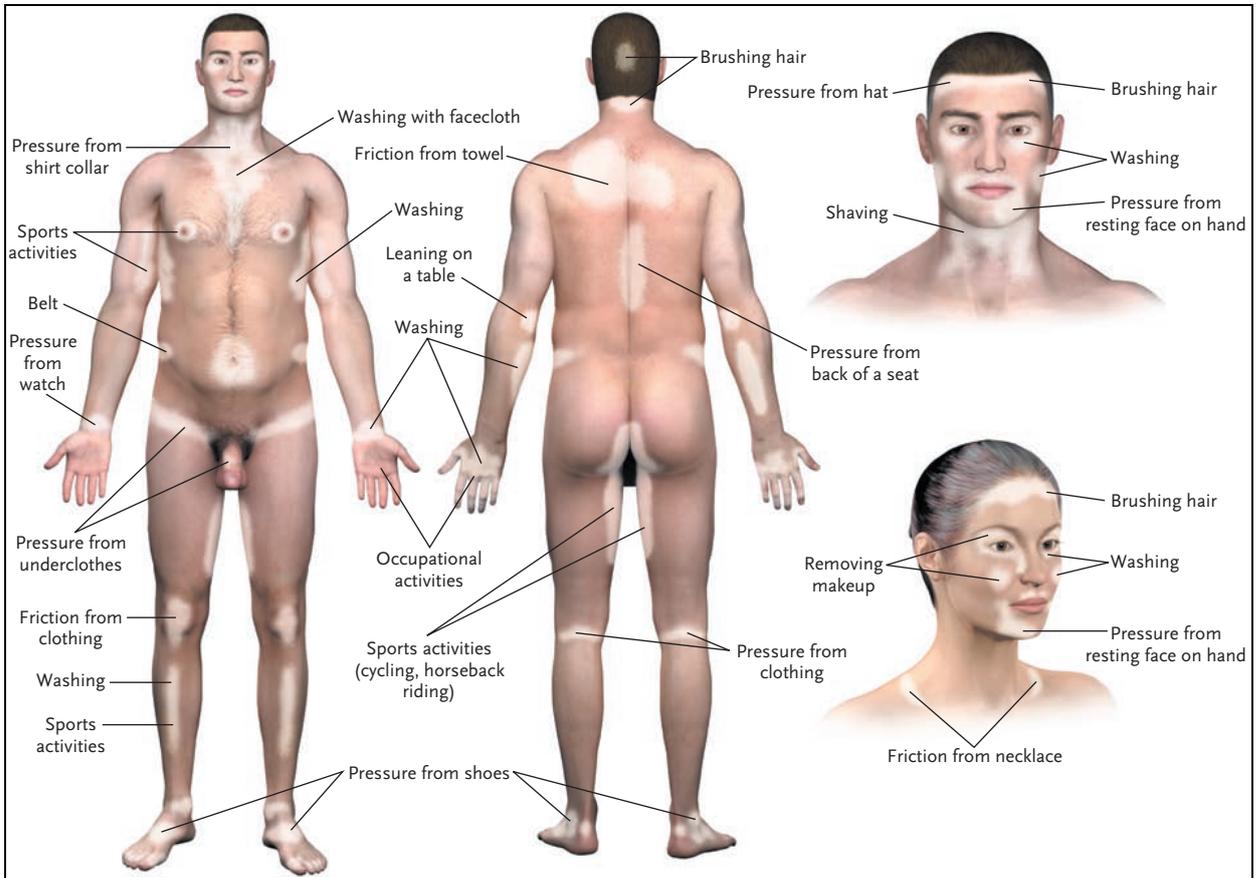


Fig.6. Fénomeno de Kobener tipo 2A (43)

2.6.2. Etiopatogenia

En base a una teoría integradora (42), las hipótesis que pueden explicar la etiopatogenia del FK son similares a las descritas para la génesis del vitíligo en sí mismo, involucrándose factores autoinmunes, defectos en la adhesión del melanocito (*melanocitorragia*), estrés oxidativo o factores de crecimiento y supervivencia del melanocito. Sin embargo, se deben considerar los distintos factores de *koebnerización* (incluyendo trauma mecánico, la irradiación UV, estrés químico...) como desencadenantes fundamentales e iniciales de las diferentes vías fisiopatológicas.

La liberación de citoquinas inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL1, IL6) después de un traumatismo de la piel puede ser el desencadenante esencial para reclutar y activar células T específicas frente a melanocitos en la piel. La respuesta inflamatoria inducida

después de dicho traumatismo también podría sobreexponer los propios melanocitos mediante aumento de expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) y de adhesión (ICAM-1). De hecho, el aumento de expresión de ICAM-1 se ha detectado en lesiones de vitíligo más activas y en lesiones con pérdida de pigmento temprano después de mini-injertos en comparación con lesiones estables y repigmentadas, respectivamente (44).

Se ha demostrado que la inflamación local es necesaria para romper la tolerancia frente a las MHC de clase I. La evidencia experimental sugiere que la tolerancia periférica de los linfocitos T CD8 + citotóxicos específicos frente a los melanocitos se regula en dos pasos. En la fase de inducción, la estimulación y expansión de estas células T in vivo depende estrictamente de colaboración de las células T CD4 +. En la fase efectora, la destrucción autoinmune de melanocitos en la piel depende de la inflamación local, que facilita la migración de las células T en la epidermis y apoya sus funciones efectoras (45).

Asimismo, un traumatismo físico o químico puede incrementar el estrés oxidativo celular, dando lugar a proteínas altamente inmunogénicas, como sustratos de tirosina, que actúen como autoantígenos en la génesis del vitíligo (42). Dicho estrés oxidativo se asociado igualmente a una disminución de la liberación de factores de crecimiento melanocitarios por parte de los queratinocitos, como el *Stem cell factor (SCF)*, que puede conllevar una apoptosis de los melanocitos (40).

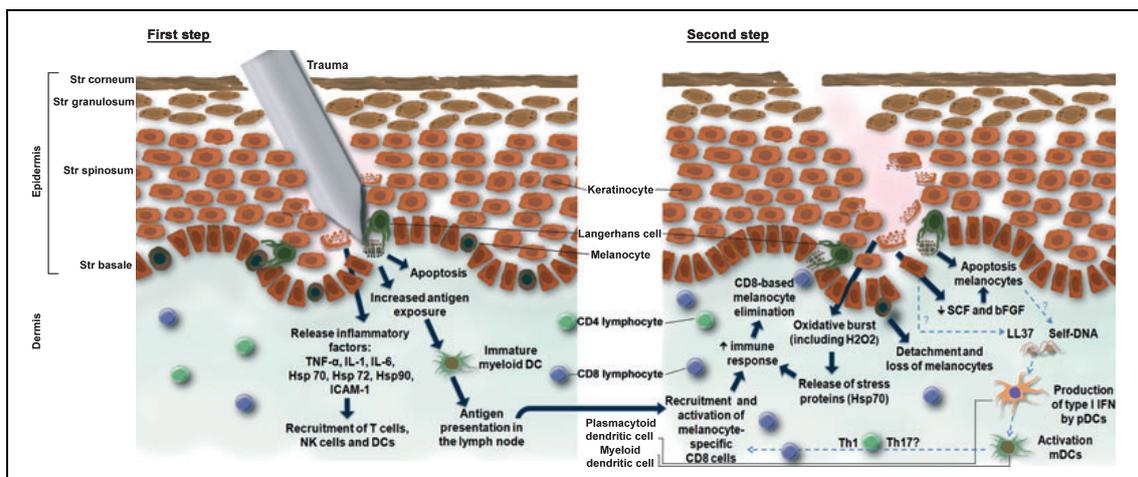


Fig.7. Fenómeno de Koebner en el vitíligo e integración de sus múltiples mecanismos etiológicos: eliminación citotóxica de los melanocitos, aumento del estrés oxidativo, adhesión de los melanocitos defectuosa, y la deficiencia de factores de crecimiento de melanocitos. En el primer paso, son liberados factores proinflamatorios comunes y en el segundo paso, múltiples mecanismos están implicados en la eliminación específica de los melanocitos (42).

2.6.3. Significado clínico

La actividad o estabilidad clínica del vitíligo es difícil de determinar y no siempre se correlaciona con la situación celular y de expresión de determinadas citoquinas proinflamatorias (TNFalfa, IL-1, IL-6) o expresión de ICAM-1, que pueden predisponer al desarrollo de despigmentación tras un mínimo traumatismo (44,46).

Al igual que en la psoriasis, la inducción experimental del FK parece indicar mayor actividad de la enfermedad, y se han encontrado en estos casos niveles más elevados de INF γ en suero (47). Esta inducción permite además predecir una mejor respuesta al tratamiento con corticoides o radiación ultravioleta (42,48). Algunos autores (42,48) proponen confirmar la presencia o ausencia de FK según historia clínica mediante su inducción experimental, y han descrito hasta un 48% de falsos negativos y un 10% de falsos positivos, respectivamente.

Aunque la inducción experimental de FK se ha correlacionado con un estado activo de la enfermedad, esto no supone necesariamente una mayor extensión de la misma, aunque el FK está presente hasta en un 61% de pacientes con vitíligo generalizado, y no ha podido ser provocado en pacientes con vitíligo segmentario (48).

2.7. Sistemas de medida de extensión y actividad

2.7.1. Examen clínico directo y bajo Luz de Wood

Se ha objetivado histológicamente que la reacción inflamatoria previa a la eliminación de los melanocitos ocurrida en el vitíligo es más intensa en el borde de las lesiones activas que en las lesiones estables (49,50). Así pues, el examen clínico de dicho margen bajo luz de día y bajo luz de Wood, puede proporcionar información clínica sobre la actividad de la enfermedad (41).

Benzekri et al (41) analizaron el margen de las lesiones de vitiligo en 50 pacientes, clasificándolos en 4 formas clínicas: a) vitiligo inflamatorio, con bordes eritematosos y sobreelevados, b) vitiligo tricrómico, con un área de despigmentación periférica intermedia entre la lesión acrómica y la piel normal, c) vitiligo hipopigmentado con bordes difusos y d) vitiligo acrómico con bordes bien definidos. El tipo d) es el único asociado a estabilidad de la enfermedad mientras que los otros tres se consideran marcadores de actividad y extensión, existiendo una correlación tanto clínica como histológica (41).

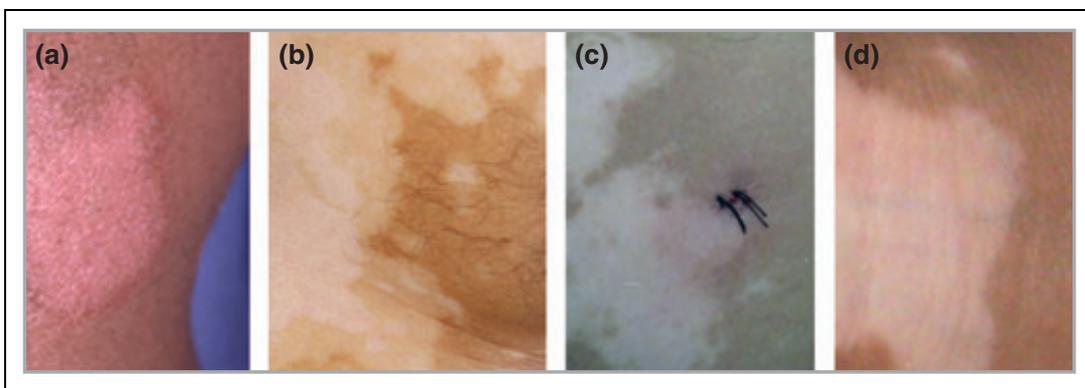


Fig.8. Formas clínicas de vitiligo según Benzekri et al (41).

2.7.2. Vitiligo Area Scoring Index (VASI)

El índice VASI (51) se deriva conceptualmente del índice PASI (Psoriasis Area Severity Index), ampliamente utilizado en psoriasis, y es un método estandarizado para medir la extensión y porcentaje de repigmentación en el vitiligo. Según el VASI, la superficie corporal se divide en 5 regiones: manos, extremidades superiores (excepto manos), tronco, extremidades inferiores (excepto pies) y pies. Las regiones axilares e inguinales están incluidas respectivamente en extremidades superiores e inferiores, mientras que las nalgas están incluidas en extremidades inferiores. Para cada región del cuerpo, el VASI se calcula determinando el producto del área afectada medida en *hand units* (1 hand unit = 1% de superficie corporal) y la extensión de la despigmentación en cada región, medido según un índice fotográfico con valores de 0, 10, 25, 50, 75, 90 y 100%.

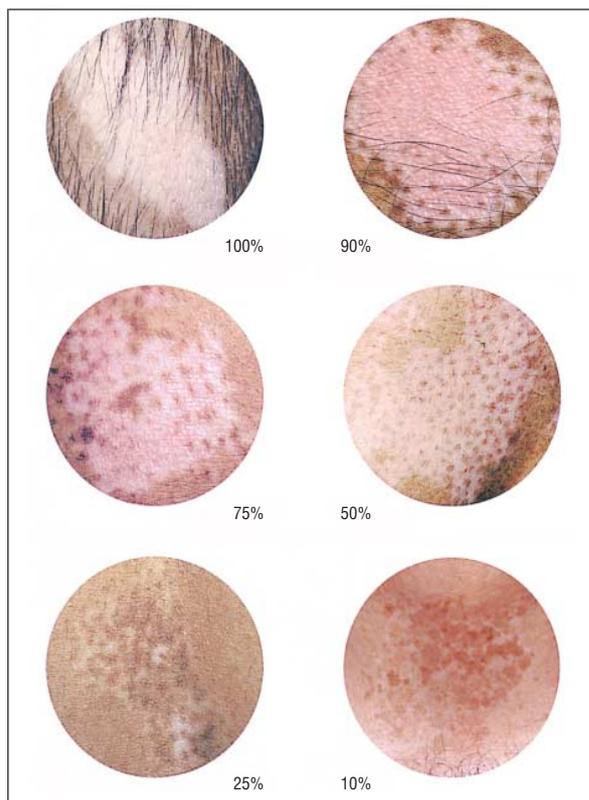


Fig.9. Evaluaciones estandarizadas para estimar el grado de pigmentación para el cálculo del VASI (51)

- 100%, no hay pigmento presente.
- 90%, motas de pigmento.
- 75%, el área despigmentada excede el área pigmentada.
- 50%, las áreas despigmentadas y pigmentadas son iguales.
- 25%, el área pigmentada excede el área despigmentada.
- 10%, motas despigmentadas.

El cálculo del VASI aplicado al total de la superficie corporal, se realizaría sumando las contribuciones de cada región (rango 0-100), según la siguiente fórmula:

$$\text{VASI} = \sum_{(\text{all body size})} (\text{hand units}) \times (\text{depigmentation})$$

VASI score	~-50	Very much worse
VASI score	-50 ~ -25	Much worse
VASI score	-25 ~ -10	Worse
VASI score	-10 ~ 0	Minimally worse
VASI score	0 ~ +10	Minimally improved
VASI score	+10 ~ 25	Improved
VASI score	+25 ~ 50	Much improved
VASI score	+50~	Very much improved

Tabla.1. Gradación de los rangos de VASI (203)

Dos limitaciones importantes de este método son, en primer lugar, que no contempla la evaluación de la cabeza y el cuello, un defecto significativo dada la distribución

acrofacial frecuente del vitíligo, y en segundo lugar, el grado de subjetividad a la hora de determinar el grado de despigmentación en cada área.

2.7.3. *Vitiligo European Task Force evaluation system (VETF es)*

El VETF ha consensuado un sistema de estadiaje del vitíligo (52) que combina la extensión de la enfermedad, medida según el porcentaje de superficie corporal afectada siguiendo la “regla de los 9”, así como el grado de despigmentación (estadio) y progresión de la enfermedad.

La “regla de los 9” asume que la región de cabeza-cuello, cada brazo, cada pierna y cada uno de los cuatro cuadrantes que conforman el tronco, suponen un 9% de superficie corporal (SC), dejando un 1% para el área genital. Según este método, cada superficie palmar supone un 1% de SC.

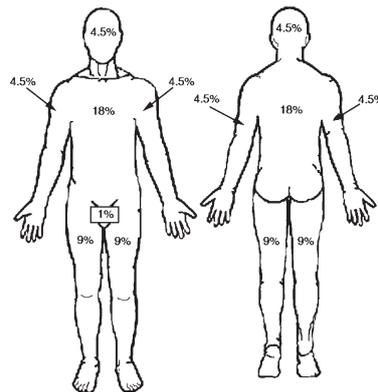


Fig.10. Porcentajes de superficie corporal según la regla de los 9

El estadiaje se determina según el grado de despigmentación de la piel o el pelo (de 0-4) evaluado en la mancha más grande de cada región, a excepción de manos y pies que se evalúan de forma separada y globalmente como un área única.

El grado de progresión se determina evaluando la lesión de mayor tamaño en cada una de las áreas, bajo luz de Wood.

- *Recomendaciones generales:* Las manos y los pies están incluidos en brazos y piernas a la hora de determinar la extensión de la enfermedad, pero se evalúan por separado y globalmente para determinar el estadio (grado de despigmentación) y la progresión.

- *Recomendaciones para determinar el estadio:*
 - Stage 0: pigmentación normal
 - Stage 1: incompleta pigmentación, incluyendo despigmentación moteada, tricrómica u homogénea, con o sin aislados pelos blancos.
 - Stage 2: Completa despigmentación, con o sin escasos pelos blancos
 - Stage 3: <30% de pelo blancos
 - Stage 4: blanqueamiento completo del pelo

- *Recomendaciones para determinar la progresión:*
 - Score 0: límites similares
 - Score 1: vitiligo en progresión
 - Score -1: vitiligo en regresión

El uso de luz Wood es útil para determinar tanto estadio como progresión

Area	% Area	Staging* (0-4)	Spreading* (-1 +1)
Head and neck(0-9%)			
Trunk (0-36%)			
Arms (0-18%)			
Legs (0-36%)			
Hands and feet			
Totals (0-100%)		0-20	(-5 +5)

*largest patch in each area

Tabla.2. Recomendaciones para la puntuación de la extensión, estadio y progresión del vitiligo (52).

2.7.4. Vitiligo Disease Activity (VIDA)

El índice VIDA es una escala de 6 puntos que evalúa la estabilidad o progresión del vitiligo a lo largo del tiempo, y va a depender de la información facilitada por el propio paciente. La actividad de la enfermedad va estar determinada tanto por una expansión de las lesiones preexistentes como por la aparición de nuevas lesiones. Un menor índice VIDA indica una menor actividad del vitiligo (53).

Disease activity	VIDA score
Active in past 6 weeks	+ 4
Active in past 3 months	+ 3
Active in past 6 months	+ 2
Active in past 1 year	+ 1
Stable for at least 1 year	0
Stable for at least 1 year and spontaneous repigmentation	- 1

Fig.11 . Puntuación índice VIDA (142).

2.7.5. Vitiligo Potential Repigmentation Index (VPRI)

Este índice se basa en la observación de que la repigmentación del vitiligo depende de la existencia de melanocitos viables en la epidermis y especialmente en los folículos pilosos (34,52). Ninguno de los índices expuestos anteriormente proporciona información acerca de las melanocitos remanentes en cada lesión ni permite evaluar la capacidad potencial de repigmentación del paciente. El VPRI (54) se correlaciona con una mayor probabilidad de repigmentación. Para calcularlo se clasifican las lesiones según los melanocitos remanentes en epidermis y folículo piloso, dividiéndolas en 4 grupos.

EL VPRI (54) se calcula como el ratio entre el número de lesiones con capacidad de repigmentación frente al número de lesiones probablemente refractarias $(A+B)/(C+D)$. A mayor VPRI, mejor pronóstico, y por tanto una probable mejor respuesta a tratamientos tópicos o fototerapia.

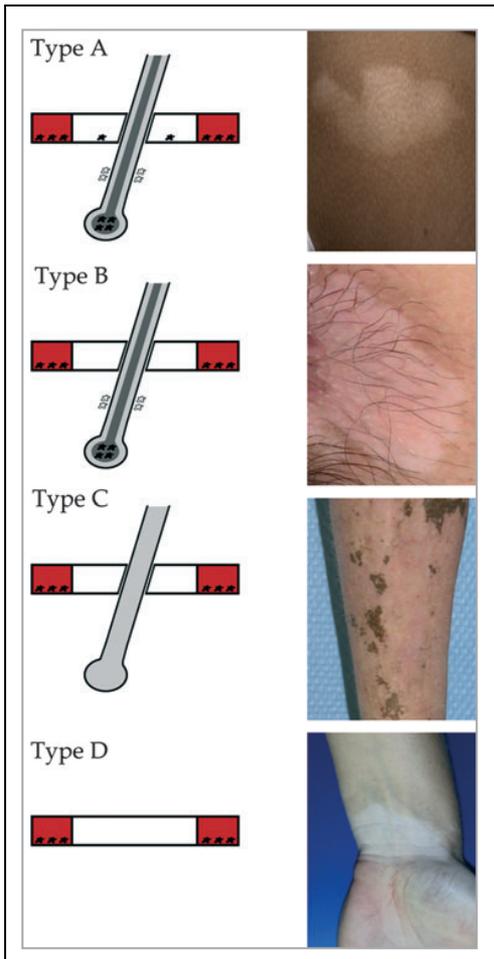


Fig.12. Relación entre el tipo clínico de vitiligo y los melanocitos remanentes (54):

- Tipo A: Pelo pigmentado y mancha hipopigmentada.
- Tipo B: Pelo pigmentado y mancha acrómica.
- Tipo C: Pelo hipopigmentado y mancha acrómica
- Tipo D: Área con ausencia de vello

2.8. Vitiligo segmentario y no segmentario

VITÍLIGO SEGMENTARIO	VITÍLIGO NO SEGMENTARIO
Aparición en la infancia	Suele aparecer más tardío (< 20 a)
Rápida aparición y estabilización	Progresivo, con exacerbaciones
Afecta al pelo tempranamente	Afecta al pelo en estadios tardíos
No se acompaña de otras enfermedades autoinmunes	Historia familiar o personal de autoinmunidad
Afecta con frecuencia la cara	Áreas de presión, fricción o traumatismo
Buena respuesta tras injertos autólogos	Recaída tras injertos autólogos

Tabla.3. Diferencias entre vitiligo segmentario y no segmentario (43)

Las diferencias en la forma de presentación, evolución y enfermedades asociadas entre el VNS y VS, determinaron inicialmente su clasificación como entidades completamente separadas. Sin embargo, hoy día se consideran distintos polos del mismo espectro de enfermedad, existiendo un solapamiento entre ambas formas clínicas (55). Las diferentes teorías etiopatogénicas del VS no son excluyentes entre sí, y en ellas subyace una causa autoinmune, según la cual, posiblemente una reacción transitoria autoinflamatoria podría iniciar el daño en el melanocito, y la predisposición genética individual a desarrollar enfermedades autoinmunes, determinaría el grado de afectación entre VS y VNS (55–57). Así pues, el VS actuaría como desencadenante de una respuesta inmune antimelanocito, permitiendo en algunos casos el desarrollo de un vitiligo generalizado posterior (55). Los principales factores que se asocian a un mayor riesgo de progresión del VS a formas mixtas son la presencia de halo nevus, fenómeno de Koebner y leucotriquia (lo que podría representar una afectación más difusa de los melanocitos dañados), así como la localización inicial del segmento afectado en el tronco (56,58). Es importante recordar que en los casos de vitiligo clásico suelen estar respetados los melanocitos de los folículos pilosos, a partir de los cuales es posible una repigmentación, en contraposición con los melanocitos epidérmicos. Este hecho sugiere un posible perfil antigénico distinto entre cada uno de ellos y pone de manifiesto que la unidad funcional de la melanina folicular se encuentra situada en un lugar inmunoprivilegiado en la región proximal del bulbo piloso en anagen, a diferencia de la naturaleza inmunocompetente de la unidad epidérmica. Este hecho es apoyado además por una distinta morfología de los melanocitos de la unidad folicular, de mayor tamaño y con prolongaciones dendríticas más largas (58).

2.9. Vitiligo y halo nevus

Mientras que algunos autores consideran que la presencia de halo nevus podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de vitiligo, incluso podría tratarse de un signo clínico de vitiligo, otros consideran un mecanismo de producción inicial diferente. Así pues, aunque el suceso final en ambos casos es la destrucción de melanocitos, el desencadenante inicial puede ser diferente (melanocitos del propio nevus o nevocitos y melanocitos del folículo piloso, frente a melanocitos epidérmicos), y sólo en un subgrupo de pacientes, la aparición de halo nevus podría ser un factor iniciador en la patogénesis del vitiligo, aquellos con mayor susceptibilidad genética para el desarrollo

de enfermedades autoinmunes, incluyendo el propio vitíligo (7,59–61). Así, Geel et al (61), en analogía con la leucodermia asociada a melanoma, describen el concepto de la *leucodermia asociada a halo nevus*, que consiste en una despigmentación limitada y a distancia del halo nevus, como resultado de un epifenómeno autoinmune frente a los melanocitos epidérmicos. Diferencian por tanto este fenómeno, de los halo nevus presentes en pacientes con vitíligo clásico, en base a su diferente forma de manifestación: moderada demarcación, tamaño limitado con ausencia de progresión, y distribución asimétrica y variable, frecuentemente no acral. El análisis genético puede ayudar a aclarar posibles diferencias entre ambas entidades clínicas. En este sentido y con anterioridad, ya habían sido descritas diferencias en la asociación de determinadas moléculas HLA en pacientes con vitíligo vulgar comparados con pacientes con halo nevus y vitíligo (60).

2.10. Vitíligo y melanoma

La revisión de la literatura permite suponer la noción de que el desarrollo de melanoma en pacientes con vitíligo no es un hecho común. En la mayoría de los casos con melanoma y vitíligo, los cambios hipopigmentarios fueron secundarios al diagnóstico de melanoma, frecuentemente en relación con el desarrollo de metástasis. En algunos casos, no ha sido posible encontrar el tumor primario, probablemente por regresión concomitante del mismo, y en otros casos, el paciente no ha sido consciente de la presencia del melanoma hasta el desarrollo de los cambios pigmentarios que motivaron la consulta (8).

Resulta interesante señalar que las características de la respuesta inmune inductora y efectora presente en las lesiones de leucodermia asociada a melanoma, así como la destrucción selectiva de los melanocitos ocurrida en el vitíligo, son los puntos en los que se enfoca la investigación en melanoma. Los pacientes con melanoma y vitíligo desarrollan anticuerpos similares frente antígenos melanocitarios y antígenos específicos de melanoma (1). Sería posible hipotetizar que el suero de pacientes con vitíligo generalizado o universal podría tener un efecto antimelanoma (1,2).

Asimismo, parece existir una relación inversa entre la susceptibilidad genética a desarrollar vitíligo y la susceptibilidad genética a presentar un melanoma, sugiriendo

que el vitíligo puede constituir un mecanismo de vigilancia inmune frente a este último (62,63). Este hecho podría explicar en parte la aparición de vitíligo generalizado en pacientes con melanoma, de forma espontánea o tras tratamiento (9,63), en un intento de controlar la enfermedad. Igualmente, determinados haplotipos HLA de clase I asociados al desarrollo de vitíligo se han relacionado a su vez con una relativa mejor respuesta a la inmunoterapia en melanoma (64,65).

La tirosinasa (TYR) es uno de los principales autoantígenos involucrados en el desarrollo de vitíligo generalizado, y es presentada al sistema inmune en la superficie del melanocito a través de moléculas de histocompatibilidad de clase I, principalmente HLA-A*02. La asociación de TYR con vitíligo está en relación con el alelo mayor (R; Arg) del polimorfismo R402Q del gen de la tirosinasa. En contraposición, el alelo menor (Q; Gln) está asociado a una mayor susceptibilidad de desarrollar un melanoma. Uno de los principales epítomos presentados por HLA-A*02 en pacientes con vitíligo es un nanopéptido de tirosinasa modificado. Sin embargo, la variante 402Q está hipoglicosilada, hecho que impide esta modificación de la tirosinasa necesaria para su presentación antigénica por HLA-A*02 (62).

El polimorfismo TYR R402Q es frecuente en pacientes caucásicos y curiosamente se ha asociado con una actividad enzimática termosensible de la tirosinasa, en otros trastornos pigmentarios como el albinismo oculocutáneo IB (66).

Finalmente, estudios comparativos retrospectivos han objetivado un riesgo más bajo de desarrollar melanoma en pacientes con vitíligo, y está igualmente disminuido para otros tipos de cáncer de piel no melanoma (67,68).

3. SISTEMA INMUNE Y VITÍLIGO

En relación con el proceso autoinmune, se especula que tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa tienen una participación directa. Varios probables desencadenantes locales, entre ellos un traumatismo, pueden alertar el sistema inmune innato, que precede a la respuesta adaptativa específica frente a los melanocitos (29). La rama humoral de la respuesta adaptativa se caracterizaría por la presencia de

anticuerpos contra múltiples antígenos expresados en los melanocitos, mientras que la rama celular se debe a la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ autorreactivos (69). Una disfunción en los linfocitos T reguladores, ya observada en otras enfermedades autoinmunes, facilitaría el desarrollo de estos clones de linfocitos T y anticuerpos dirigidos frente a los melanocitos (69,70). La respuesta innata aumenta a su vez el reclutamiento de linfocitos T CD8 (citotóxicos) y macrófagos. Posiblemente, la destrucción inicial de los melanocitos sería consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos que ocurriría de forma secundaria a cualquiera de los desencadenantes previamente descritos, hecho que alertaría al sistema inmune innato, y conduciría finalmente a una posterior amplificación autoinmune del daño sobre éstos (26,29).

3.1. Hematopoyesis: interleuquinas y factores de crecimiento

En el siguiente esquema se muestran las principales interleuquinas y factores de crecimiento involucrados en la diferenciación de las células de estirpe linfoide y mieloide del sistema inmune, a partir de un progenitor común o *célula stem* hematopoyética.

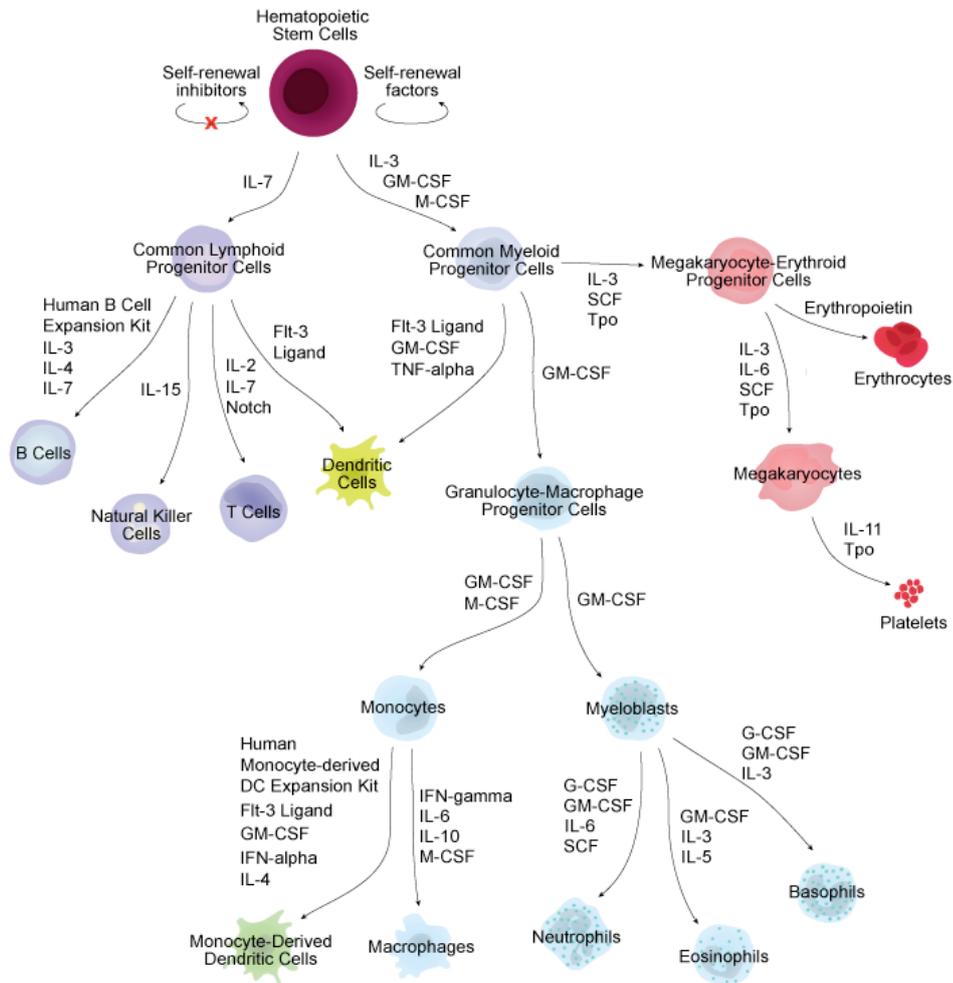


Fig.13. Participación de interleuquinas y factores de crecimiento en la hematopoyesis

3.2. Inmunidad innata y autoinmunidad

Existe una interrelación entre la inmunidad innata y adaptativa. Tradicionalmente se ha considerado que la inmunidad innata produce una defensa antimicrobiana rápida e incompleta en el huésped hasta que se genera una respuesta inmune adquirida más lenta y definitiva. Sin embargo, también tiene un papel adicional para determinar frente a qué antígenos debe responder el sistema inmune adquirido y la naturaleza de esta respuesta, pudiendo distinguir entre diferentes clases de bacterias patógenas, virus y hongos. Los diferentes componentes de la respuesta inmune innata, además de sus funciones de defensa e inmunorregulación de las respuestas adaptativas, juegan un papel en el

desarrollo de procesos autoinmunes. El conocimiento de estas vías e interrelaciones puede conllevar el desarrollo de nuevos tratamientos para las infecciones y enfermedades autoinmunes.

La inmunidad innata está constituida por los primeros mecanismos de respuesta del organismo frente a agresiones externas, habitualmente microorganismos. Está formada por barreras epiteliales (piel y mucosas), células y proteínas efectoras.

Las células que forman parte de la respuesta innata son *a) Leucocitos polimorfonucleares* (fundamentalmente neutrófilos), que pueden actuar como fagocitos, ya que identifican, ingieren y destruyen material extraño como elementos de desecho o microorganismos, tanto en sangre periférica como en los tejidos; *b) Monocitos-macrófagos* cuya fagocitosis es más lenta que la de los PMN pero son capaces de fagocitar la mayoría de los agentes extraños y presentan otras funciones como producción de sustancias antimicrobianas y citocinas y pueden actuar como células presentadoras de antígenos; *c) Células NK (Natural Killer)*, que constituyen un subgrupo de células que presentan un precursor común con los linfocitos T (LT), y activadas por distintos estímulos, destruyen las células infectadas por microorganismos, mediante distintos mecanismos enzimáticos (perforina-granzima y activación de la vía de las caspasas); *d) Células dendríticas*, que actúan como presentadoras de antígenos; y *e) Linfocitos intraepiteliales*, que son LT que se encuentran en el epitelio de piel y mucosas, y se considera que han evolucionado para reconocer los antígenos que se encuentran habitualmente en la luz de las mucosas. La mayoría de ellos son CD8+ y expresan el receptor de célula T (TCR) α/β .

Entre las proteínas efectoras que forman parte del sistema inmune innato, se encuentran péptidos antimicrobianos, factores del complemento y determinadas citoquinas propias de la respuesta inmune innata (IL-1, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN α/β)(71), entre otras. Estas citoquinas promueven a su vez la expresión de receptores de quimiocinas CCR y CXCR y otros receptores de membrana endoteliales, que van a regular la migración de los leucocitos desde la sangre a los tejidos inflamados.

Estos mediadores inflamatorios (citoquinas innatas) tienen potencial para activar respuestas mediadas por células NK, con actividad citotóxica directa, y participan en la

interrelación de las células T y B. Esta interrelación es necesaria para que el LT CD4+ naive evolucione a un fenotipo potencialmente autorreactivo (Th1 o Th17). Una activación inapropiada o descontrolada de las células efectoras inmunes innatas puede ocurrir durante infecciones u otros procesos inflamatorios. Las células del sistema inmune innato pueden provocar la destrucción directa de las células infectadas y no infectadas del huésped, hecho que podría generar directamente autoinmunidad, debido a la destrucción excesiva de células del huésped (71).

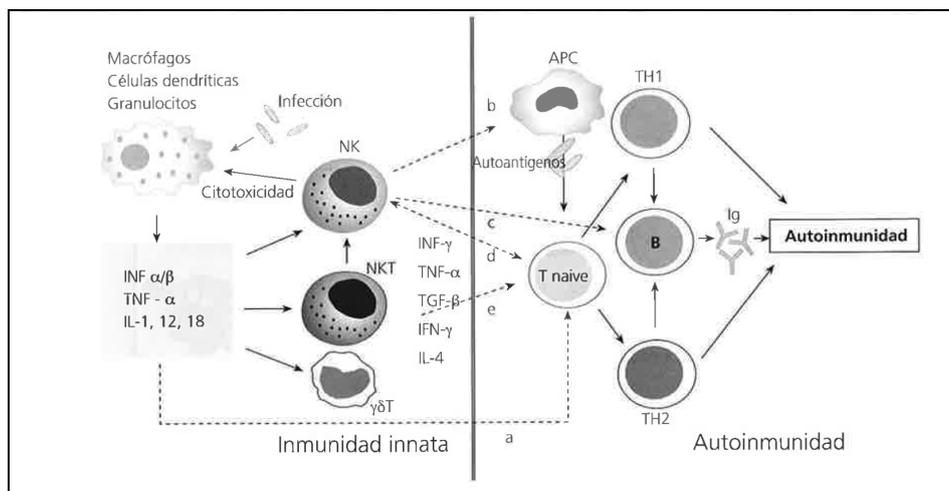


Fig.14. Relación entre inmunidad innata y autoinmunidad. Citoquinas implicadas (71).

Este papel del sistema inmune innato permite explicar las relaciones entre los factores desencadenantes ambientales y la exacerbación del vitíligo. Así, la respuesta del sistema inmune innato, a diferencia de la inmunidad adaptativa, es una respuesta rápida y no específica de antígeno, que se realiza a través de la activación de receptores de reconocimiento de peligro (PRR), incluidos entre ellos los *Toll-Like receptors* (TLR) en la superficie celular. Estos receptores pueden ser estimulados por diferentes patrones moleculares asociados a daño celular (damage-associated molecular patterns o DAMPs) y relacionados con estrés celular. Los melanocitos de pacientes con vitíligo son más susceptibles al daño por estrés oxidativo, ya sea derivado del propio proceso de melanogénesis o bien desencadenantes ambientales, y de esta manera son capaces de generar y secretar DAMPs mediante exosomas, estimulando así el sistema inmune innato (72).

Bertolotti et al (73) han objetivado además la presencia de células dendríticas plasmacitoides (pDC) infiltrando lesiones de vitíligo en progresión, con una evidente producción local de interferón alfa (IFN- α), que conduce a la activación y reclutamiento de células T. Las pDC serían por tanto un nuevo factor clave en los mecanismos patogénicos de vitíligo con potenciales consecuencias terapéuticas.

Finalmente, Yu et al (74), han realizado un estudio de análisis transcriptómico sobre muestras de piel con vitíligo comparado con piel normal. En dicho estudio y en las muestras de pacientes con vitíligo, han objetivado la expresión disminuida o ausente de 17 genes, la mayoría relacionados con la melanogénesis, mientras que la expresión de otros 13 genes relacionados con defectos del sistema inmune innato y especialmente relacionados con células NK, estaba aumentada. En este sentido, algunos autores han descrito aumento de células NK en sangre de pacientes con vitíligo (75,76).

3.3. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa es una respuesta inmunitaria estimulada por el encuentro con un determinado antígeno, habitualmente infeccioso, que aumenta en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva. Está construida por células, (linfocitos B (LB), linfocitos T (LT) y células presentadoras de antígenos) y proteínas efectoras como inmunoglobulinas, citoquinas y otros componentes citotóxicos (sistema perforina-granzima).

Se caracteriza por una *a) especificidad* muy amplia, debido a receptores que reconocen gran número de antígenos, microbianos o no; *b) clonalidad*, cada linfocito y su clon es capaz de reconocer un solo antígeno; *c) memoria*, la exposición a un antígeno extraño optimiza la capacidad de respuesta, mayor y más rápida frente a contactos posteriores con el mismo; *d) autolimitación*, debida al proceso llamado homeostasis, provocado por la eliminación del antígeno que inicia la respuesta así como la presencia de mecanismos reguladores, y *e) tolerancia a lo propio*, respeta los antígenos propios mediante diversos mecanismos que controlan los linfocitos T y B autorreactivos en órganos linfoides centrales y tejidos periféricos.

La inmunidad adaptativa puede dividirse genéricamente en humoral y celular. Para que se inicie la respuesta inmune adaptativa, el antígeno debe llegar y concentrarse en el tejido linfóide, en la mayoría de casos en el ganglio linfático regional, donde se encuentran los diferentes tipos celulares que participan en estas respuestas (células presentadoras de antígeno, LB y LT).

Las células presentadoras de antígenos (CPA) son el nexo de unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Son capaces de captar los antígenos, procesarlos adecuadamente y presentarlos a los LT, mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Existen tres tipos principales de CPA profesionales: células dendríticas, macrófagos y LB, que actúan como CPA de antígenos solubles en la respuesta inmune humoral, presentándolos posteriormente a los LT cooperadores.

La tarea de presentar los antígenos en la superficie de las células para que sean reconocidos por los LT corre a cargo de un complejo proteico conocido como HLA (Human Leucocyte Antigen) codificado por segmentos génicos denominados en conjunto MHC, que en humanos se encuentra codificado en el cromosoma 6. Existen dos tipos principales de moléculas HLA o MHC, clase I y clase II, que se heredan de forma codominante:

- MHC-I (o HLA-I): es un heterodímero formado por dos cadenas proteicas diferentes, β 2-microglobulina y cadena α , en la que reside el polimorfismo de HLA-I, con tres dominios diferentes. Se unen a fragmentos péptidicos de origen *intracelular (lipofílicos)*, y los presentan preferentemente a *LTCD8+*. Se encuentran presentes en todas las células nucleadas del organismo. Existen tres tipos principales: HLA-A, HLA-B y HLA-C.

- MHC-II (o HLA-II): formado por dos cadenas proteicas diferentes, cadena α y cadena β , con dos dominios cada una. El polimorfismo de HLA-II reside fundamentalmente en la cadena β . Se unen a fragmentos peptídicos de origen *extracelular (hidrofílicos)*, y los presentan preferentemente a *LTCD4+*. Se encuentran presentes de forma constitutiva en todas las células del sistema inmune y se puede inducir su expresión en otros tipos celulares en determinadas situaciones. Se distinguen tres tipos principales: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

La interacción entre la CPA y el linfocito T es esencial para la activación del mismo, y esta interacción célula-célula se conoce como sinapsis inmunológica. Tanto el MHC-I como el II se unen a la superficie del Linfocito T gracias a su interacción con el complejo CD3-TCR (Receptor de célula T). En la sinapsis inmunológica participan tanto la interacción MHC-TCR (primera señal), como otros pares de moléculas de superficie (segunda señal), que actúan como moléculas coestimulatorias del LT (CD28-CD80/CD86, CD40L-CD40, CD2-LFA3, LFA1-ICAMs...). La inhibición de esta última interacción presenta recientes implicaciones terapéuticas en el vitíligo y otras enfermedades autoinmunes (77).

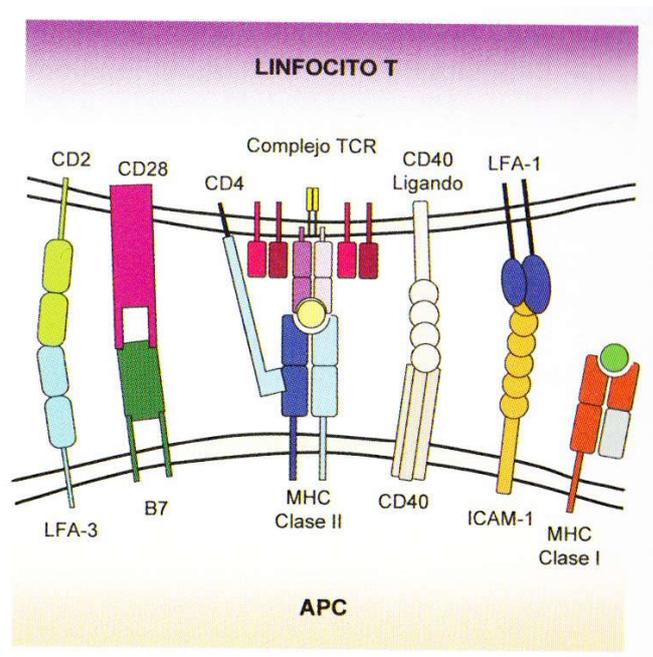


Fig.15. Interacción CPA-LT: primera y segunda señal(205).

Una vez que los linfocitos T tienen contacto con el antígeno, pasan de ser linfocitos T inmaduros o “vírgenes” (naive) a células de memoria inmunológica. La molécula CD45, o antígeno leucocitario común, es un glucoproteína de membrana presente en todas las células hematopoyéticas, y por tanto también en los linfocitos T. Sus isoformas más conocidas son CD45RA, que se expresa mayoritariamente en los linfocitos T inmaduros o “vírgenes” (naive), y CD45RO, que se expresa en células de memoria. Existen

distintos tipos de linfocitos T de memoria, como los LT de memoria central, que se alojan preferentemente en tejidos linfoides secundarios y tienen capacidad para una respuesta proliferativa muy rápida y potente, o los linfocitos T de memoria efectora, que se alojan preferentemente en tejidos periféricos, especialmente en piel y mucosas, recirculando por sangre y linfa, y tienen capacidades efectoras muy rápidas pero menos potentes (78).

Es posible identificar diferentes subpoblaciones tanto en linfocitos T CD4 como CD8 analizando la expresión de CD45RA, CD45RO y otras moléculas como el receptor de quimiocinas CCR7, el CD62L, o el CD28. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas como el CD27, que se expresa mayoritariamente en células linfoides de memoria, tanto de origen T como de origen B.

Analizando la expresión de CD45RA y CD27 es posible identificar diferentes subpoblaciones tanto en linfocitos T CD4 como CD8. Así, se pueden clasificar en LT naive (CD45RA+ CD27+), LT de memoria central (CD45RA- CD27+), LT de memoria efectora (CD45RA- CD27-), y LT efectores (CD45RA+ CD27-), en los que se vuelve a expresar el antígeno CD45RA, más característico de células naive, que tendrían capacidades efectoras muy potentes, y aparecen especialmente en la población de linfocitos CD8 (79,80).

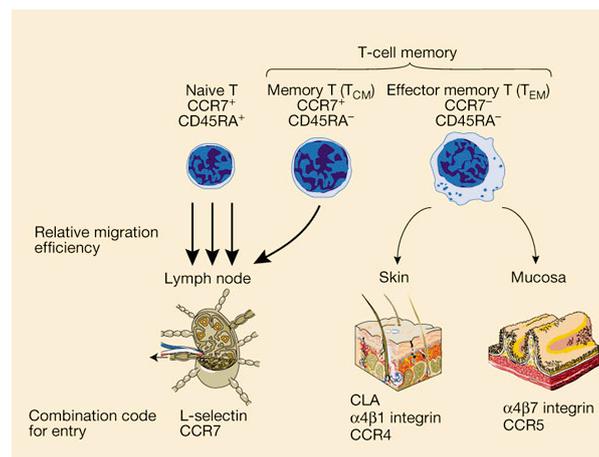


Fig.16. Tipos de LT: naive, memoria central y memoria efectora y sus distintos patrones de migración (77).

3.3.1 Inmunidad celular

3.3.1.1. Linfocitos T CD8+ (supresores o citotóxicos)

Los LTCD8+, tras el reconocimiento de péptidos antigénicos presentados por MHC-I, activan la destrucción de las células induciendo apoptosis mediante dos mecanismos principalmente: a través del sistema perforina-granzima o bien a través de la interacción de Fas ligando con Fas (CD95), además de liberar de determinadas citosinas como IFN-gamma o TNF que pueden dañar directamente la célula diana.

Diferentes trabajos han demostrado que los LTCD8+ tienen un importante papel en la patogénesis del vitíligo, ya que se ha comunicado la presencia de un número elevado de LTCD8+ reactivos frente a MART1 en sangre periférica de los pacientes con vitíligo (81), más del 15% de las células T se muestran reactivas frente al epítipo 209-217 de la gp100. Cabe recordar que MART1 y gp100 son consideradas las proteínas más inmunogénicas presentes en los melanocitos (23).

Además, en las biopsias de piel y en sangre de pacientes con vitíligo se han encontrado LTCD8+ citotóxicos específicos frente a antígenos de los melanocitos, y se ha demostrado que inducen apoptosis mediante la secreción de IL-6 e IL-13, y muerte celular de los melanocitos *in vitro* (18,82).

Otros autores han encontrado un incremento de LTCD8+CD45RO+ en la piel de los pacientes con vitíligo que responden mal al tratamiento (83), mientras que en la sangre esta población puede estar activada aunque numéricamente disminuida (84), y los LTCD8+CLA+, que tienen afinidad por la piel, también se han comunicado disminuidos en sangre periférica (85).

Antigen	Antibody	T cell
Tyrosinase	+	-
TRP-1	+	-
TRP-2	+	-
Pmel17	+	+
MART1	-	+

Tabla.4. Antígenos melanocitarios y su reconocimiento por parte de linfocitos T y anticuerpos en pacientes con vitiligo (1). Nótese la negatividad de anticuerpos frente a MART, uno de los principales antígenos frente al cual se dirigen los LT citotóxicos.

3.3.1.2. Linfocitos CD4+

Los LTCD4+ reconocen péptidos antigénicos presentados por MHC-II, y son funcionalmente más heterogéneos que los linfocitos LTCD8+. Existen distintos tipos de LTCD4+, como los LTCD4+ cooperadores (“helper”) de tipo Th1 y Th2, los LTCD4+ reguladores (Treg), o los Th17, y también otros menos frecuentes como los tipos Th9, los LT cooperadores foliculares (Tfh), o los Th0, correspondiendo estos últimos a tipos celulares más inmaduros, con capacidad de diferenciarse a distintos tipos de células efectoras. Estos tipos celulares se pueden distinguir gracias a las citocinas que producen, y en menos medida a la expresión de algunos antígenos.

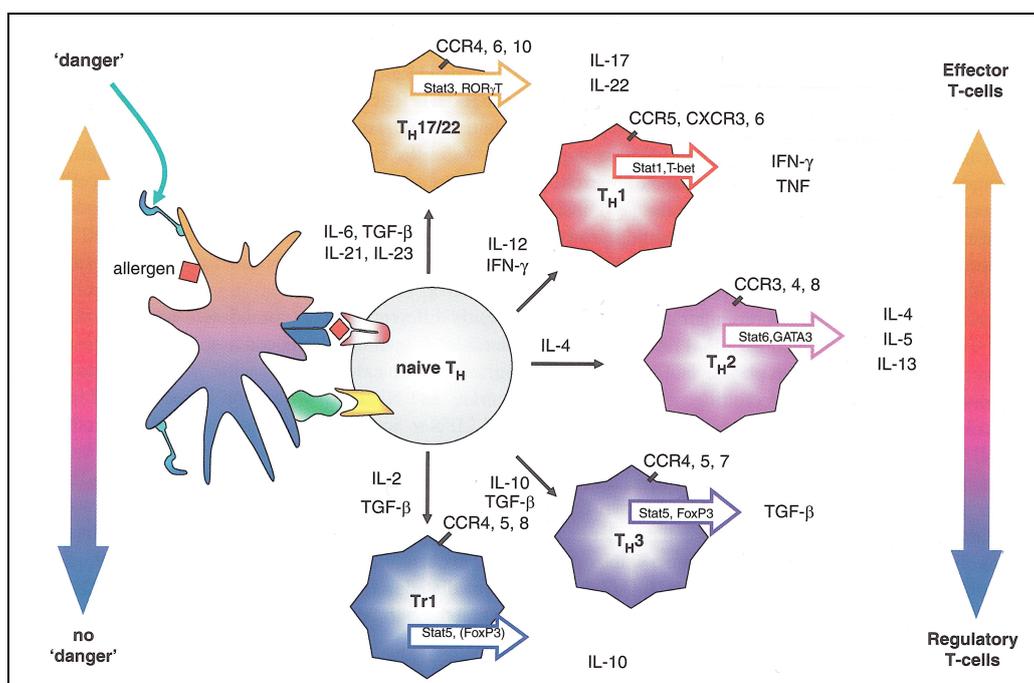


Fig.17. Espectro de diferenciación de los LTCD4+ (206).

3.3.1.2.1. Linfocitos Th1 y Th2

La respuesta inmune innata favorece la liberación de IFN- γ por las células NK, que estimula la secreción de IL-12 por parte de los macrófagos, y este ambiente favorece la diferenciación de LTCD4⁺ naive a LTCD4⁺ con características Th1. Los LTCD4 Th1 se caracterizan fundamentalmente por secretar IFN- γ .

Sin embargo, la respuesta inmune que tiene nula o escasa participación del sistema innato (células NK y macrófagos) y que produce directamente activación linfocitaria, favorece la presencia de IL-4, que va a promover el desarrollo de LTh2. Estos LTCD4 TH2 secretan principalmente IL-4, IL-5 e IL-13.

En pacientes con vitíligo se ha objetivado un aumento de IL-2 en suero, lo que podría sugerir una desviación de la respuesta hacia Th1 (17).

3.3.1.2.2. Linfocitos Th17

La presencia de IL-6, TGF- β , IL-21 e IL-23 estimula el desarrollo de LTh17, que se caracterizan por secretar IL-17 e IL-22.

El estudio inmunohistoquímico de muestras de piel con vitíligo ha demostrado que además de los LTCD8⁺, se detectan LTh17. En este sentido, el perfil de citoquinas relacionado con la respuesta Th17 (IL-17, IL-1 β , IL-6 y TNF- α) afecta a la actividad y función de los melanocitos, provocando una disminución de la producción de melanina y una reducción en el número de melanocitos (86).

Se ha comunicado que los LTh17 tienen una importante participación en enfermedades autoinmunes como la psoriasis(87) o la alopecia areata (88), y también en el vitíligo (89,90). Así, se ha comunicado que La IL-22, producida por los LTh17, puede inhibir la expresión de MIFT (*microphthalmia-associated transcription factor*) y moléculas relacionadas con la melanogénesis, dando lugar a lesiones hipopigmentadas en pacientes con vitíligo (89). Además, otros autores (91) han encontrado un aumento de los niveles de de IL-17 e IL-22, junto a disminución de los niveles de FoxP3, en muestras de piel de pacientes con vitíligo, respecto a controles sanos.

En el mismo sentido, Zhou et al (92) han comunicado aumento de LTh17 y de citoquinas relacionadas (IL-17A, TGF- β 1 e IL-21) en el suero de pacientes con vitíligo no segmentario, y una correlación entre los niveles de algunas de estas citocinas y la superficie corporal afectada en estos pacientes. También sugieren que existe correlación

positiva entre los niveles de LTh17 y LTh1, lo que podría indicar una colaboración de dichos tipos celulares en el desarrollo del vitiligo. Estos resultados son concordantes con los publicados por Khan et al (17), que también sugieren una desviación de la respuesta inmune hacia Th1 y Th17 en la patogenia del vitiligo.

3.3.1.2.3. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación que no tiene funciones efectoras, sino que ejercen funciones de control de la reacción inmune y son claves en la inmunotolerancia. La tolerancia, entendida como la ausencia de respuesta inmune adaptativa frente a antígenos propios, es una característica fundamental del sistema inmune en condiciones fisiológicas. Cuando los LTCD4⁺ tienen contacto con un antígeno en ausencia de coestimulación y de respuesta innata se puede producir tolerancia y los linfocitos no responden frente a ese antígeno.

Existen diferentes mecanismos que impiden la maduración y activación de los linfocitos autorreactivos, que se pueden clasificar en mecanismos de Tolerancia central (en el timo y la médula ósea), y de Tolerancia periférica (en los tejidos periféricos). La tolerancia central tiene como objetivo principal la eliminación de LT autorreactivos. La tolerancia periférica tiene como objetivo principal el control de los LT maduros (CD4⁺ y CD8⁺) autorreactivos que hayan escapado del proceso de selección negativa del timo. Es aquí donde los LT reg provocan una señal inhibitoria de la respuesta inmune (93), e indirectamente también sobre los LB autorreactivos (94).

Los LT reg se caracterizan (18) por la expresión de altos niveles de CD25⁺ (receptor de IL-2) junto con el factor de transcripción FoxP3. Suponen el 5-10% de los LTCD4⁺ y su principal mecanismo de acción es mediante interacción directa por contacto célula-célula, aportando señales inhibitorias a los LT preinmunes.

Se ha comunicado que los pacientes con vitiligo presentan defectos en el número y función de los LTreg, lo que favorecería un aumento de los LTCD4⁺ autorreactivos y LTCD8⁺ citotóxicos con actividad antimelanocito (18,70). Sin embargo, se han comunicado resultados discordantes y aún no se ha demostrado claramente la posible interrelación del LTreg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ y los LTCD8⁺ en la patogenia del vitiligo. Algunos autores no han encontrado alteraciones de los LTreg en sangre y/o piel (95,96)

mientras que otros han publicado que los LTreg están ligeramente aumentados en pacientes con vitiligo respecto a controles sanos (97–99), aunque cuando se consideran los pacientes con vitiligo en situaciones de progresión de la enfermedad los LTreg están disminuidos respecto a casos con enfermedad estable (99). Otros autores han observado que número de *LTreg*, analizados mediante citometría de flujo (CD4+CD25+FoxP3+) está disminuido en sangre y/o piel de pacientes con vitiligo comparado con controles, en pacientes con vitiligo de aparición temprana, y en pacientes con lesiones activas (18,100,101). También se ha observado una llamativa reducción del número de *LTreg* en piel lesional y marginal de pacientes con vitiligo (18), y una reducción en la función de los *LTreg* circulantes en pacientes con vitiligo progresivo (18,102). Todos estos hallazgos pueden indicar que los LTreg tienen una importante participación en la patogénesis del vitiligo, aunque quedan aún cuestiones por aclarar.

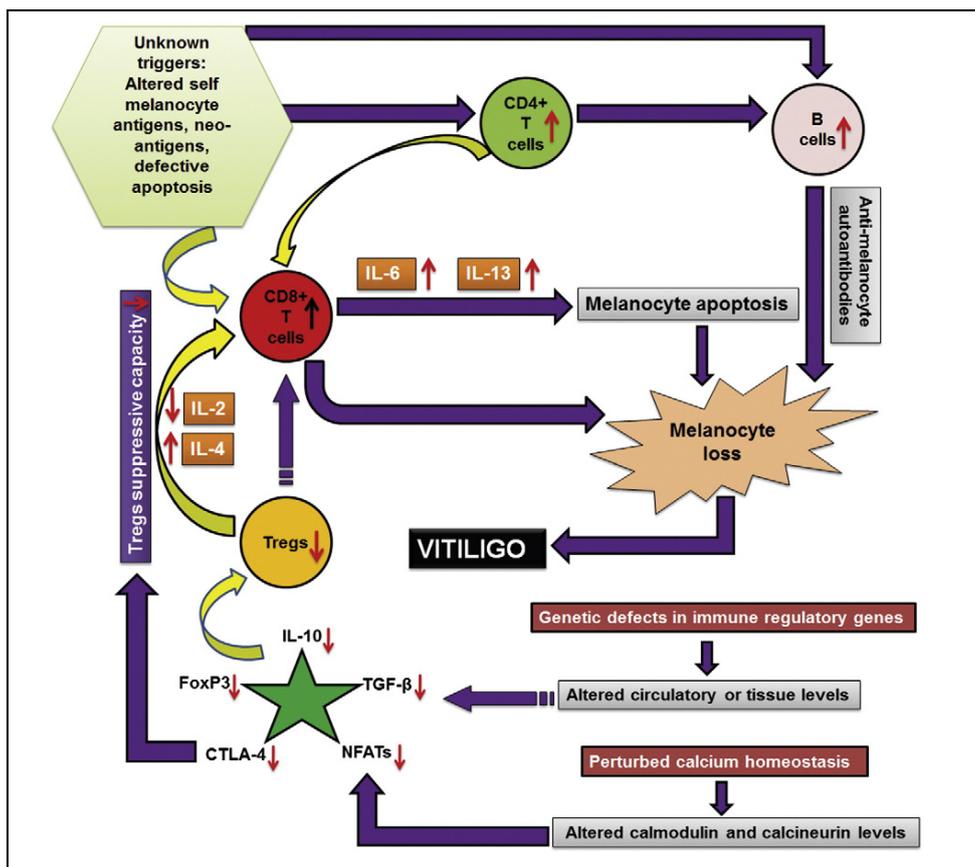


Fig.18. Participación del sistema inmune en el desarrollo de vitiligo (18).

FoxP3 (Forkhead box P3) es un marcador específico de LTreg que regula a la baja la activación de los LT y facilita la expresión de moléculas inmunosupresoras en la superficie celular como CD25 y CTLA-4 (18). FoxP3 suprime las funciones efectoras de los LT helper (LT colaboradores o CD4+) inhibiendo 2 factores de transcripción: NAFT (nuclear factor of activated T cells) y NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), que son esenciales para la transcripción de determinados genes de citoquinas, inhibiendo la producción de IL-2, IL-4 y IFN- γ por parte de los LT CD4+ (103). La expresión de FoxP3 se encuentra disminuida en piel lesional y suero de pacientes con vitíligo, así como los niveles de FoxP3 mRNA en piel lesional y perilesional (104). En este sentido, mutaciones en FoxP3 se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y polimorfismos de FoxP3 se han relacionado también con una mayor predisposición al desarrollo de vitíligo (105).

CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 o CD152) es una molécula de superficie de los LTCD4+ y CD8+ activados, involucrada en la regulación negativa de su función y mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios. Alteraciones en esta molécula se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y niveles bajos de CTLA-4mRNA han sido objetivados en pacientes con vitíligo, correlacionados con determinadas variaciones alélicas de CTLA-4 (19).

TGF- β es capaz de inducir la expresión de CD25+ y Fox P3 en los LTreg inducibles (Th3), e inhibe la diferenciación de LTCD4+ y CD8+ autorreactivos, así como LB (94). Niveles bajos de TGF- β se han determinado en piel y suero de pacientes con vitíligo, con una correlación inversa con la actividad y superficie corporal afectada (17). Polimorfismos en TGFBR2 (receptor 2 de TGF- β) se han asociado con una mayor susceptibilidad para el desarrollo de vitíligo en población coreana (106), aunque se desconoce su influencia en la expresión de TGF- β .

Los LTreg (LTh3) son inducidos mediante la presencia de IL-10. Se han objetivado niveles bajos de IL-10 en pacientes con vitíligo activo, así como niveles bajos de IL-10 mRNA(18). Determinados polimorfismos en el gen IL-10 son más frecuentes en pacientes con vitíligo, y otros parecen tener un efecto protector (107).

Aunque todos estos resultados sugieren que los LTreg tienen un importante papel en la patogénesis del vitíligo, no están aún esclarecidos los mecanismos por los que se produciría la pérdida de tolerancia en estos pacientes.

3.3.2. Inmunidad humoral

La función efectora de la inmunidad humoral está mediada por anticuerpos producidos y secretados por células plasmáticas derivadas de LB activados en los órganos linfoides secundarios. Los LB preinmunes o naive pueden reconocer directamente antígenos solubles e iniciar la respuesta inmune humoral, o activarse a través de los LTCD4⁺ (69), mediante una respuesta Th2, mediada principalmente por las IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

En las reacciones por citotoxicidad dependiente de anticuerpos las células son finalmente destruidas mediante fagocitosis o activación del complemento, y se ha demostrado que el suero de pacientes con vitíligo es capaz de dañar los melanocitos *in vitro* mediante activación del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (108). El suero de los pacientes con vitíligo puede tener anticuerpos frente a antígenos específicos de los melanocitos presentes en su superficie o en su citoplasma, y también frente a otros antígenos no específicos de los melanocitos, comunes en otros tipos celulares (26) (109). Los melanocitos son más sensibles al daño tóxico o inmune que los queratinocitos o fibroblastos circundantes (26), de modo que un mínimo daño derivado de anticuerpos inespecíficos, puede ser letal para los melanocitos y no para otros tipos celulares.

Un porcentaje elevado de pacientes con vitíligo presenta anticuerpos frente a antígenos de diferenciación de los melanocitos (TYR, TYRP-1, TYRP-2 y pmell 17) así como *melanin-concentrating hormone receptor 1* (MCHR1) (1) (25), y parece existir una correlación entre los niveles de anticuerpos y la actividad de la enfermedad (110). Sin embargo, no se han podido determinar anticuerpos frente a MART1, uno de los principales antígenos de diferenciación melanocitaria, frente al cual suelen reaccionar los LT CD8⁺ autorreactivos (111).

3.4. Principales marcadores inmunofenotípicos

En el siguiente esquema se muestran los principales marcadores inmunofenotípicos de cada una de las células de estirpe mieloide o linfoide que componen el sistema inmune.

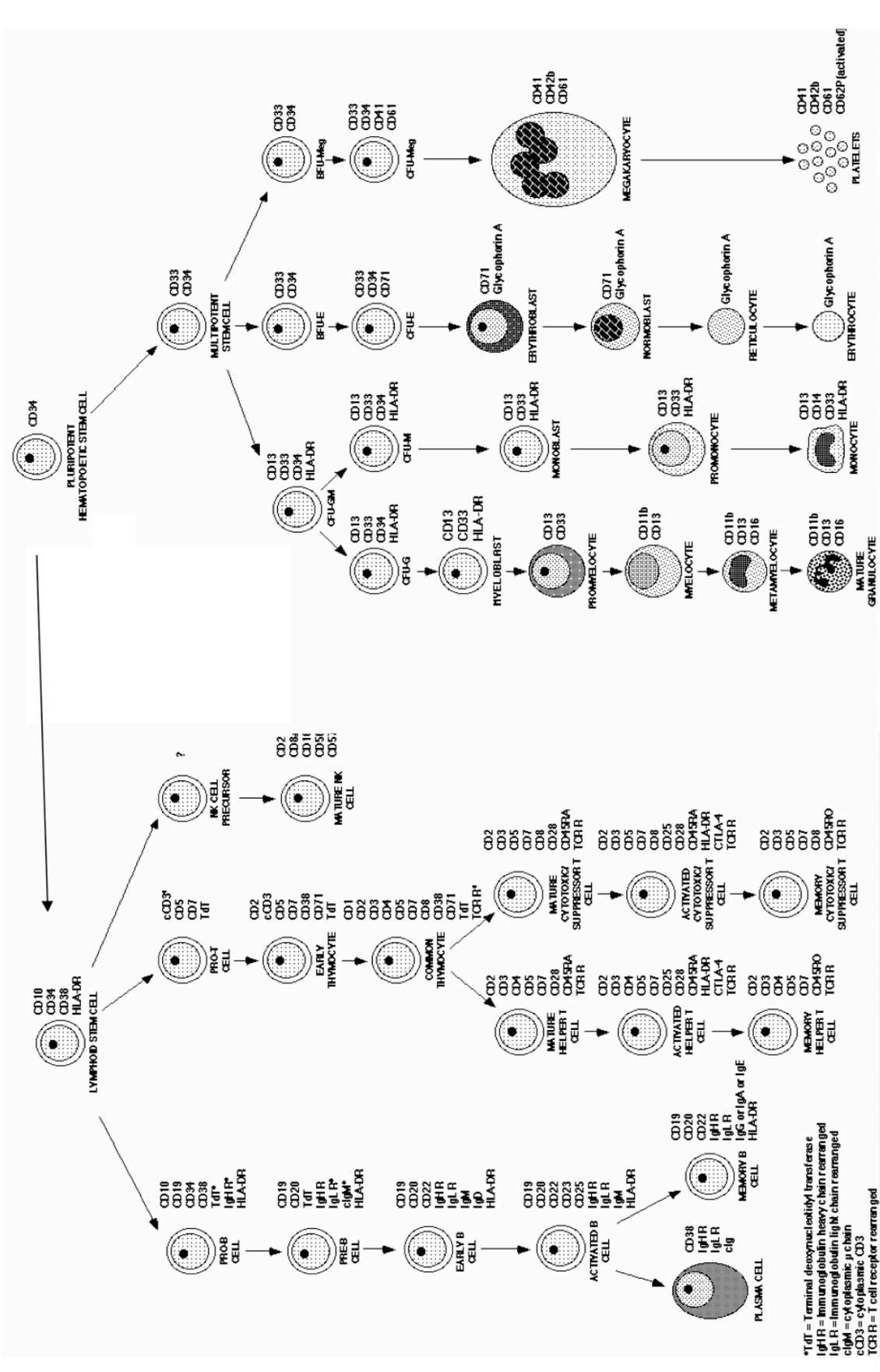


Fig.19. Principales marcadores inmunofenotípicos

4. ESTUDIOS GENÓMICOS

Uno de los primeros esfuerzos por entender la biología de la enfermedad fue considerar su posible base genética, apoyada por su relación con otras enfermedades de origen autoinmune, y con su presencia también en muchos casos en familiares de primer grado. Así, se ha observado que la enfermedad se transmite con frecuencia como “rasgo dominante”, si bien no sigue un patrón de herencia Mendeliana asociado a un solo locus, sino más bien se trata de una herencia poligénica y multifactorial, con penetrancia incompleta, involucrando múltiples genes y otros factores ambientales desconocidos, como se pone de manifiesto por una limitada concordancia, del 23%, en gemelos monocigotos (65).

4.1. Estudios de asociación de genes candidatos

Los estudios de asociación de genes candidatos se basan en el estudio de una selección de genes que intervienen en la patogenia de la enfermedad. Consisten en la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre grupos de controles y pacientes sin relación de parentesco, que permitirían detectar polimorfismos que confieran un riesgo moderado a la enfermedad. Sin embargo, los resultados de este tipo de estudios pueden estar condicionados por la posible estratificación de las poblaciones, que podría resultar en diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles que no se debieran a la enfermedad (112).

Los primeros estudios en vitíligo generalizado pretendían demostrar la implicación de genes específicos, generalmente relacionados con moléculas HLA y AB0, aunque los resultados mostraron discordancias (113), a excepción de **HLA** y **PTPN22** (*lymphoid-specific protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22*) (105) y quizá **CTL4** (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) (113), cada uno de los cuales codifica una proteína reguladora del sistema inmune. En muchos casos, la falta de concordancia en los resultados se debía a diferencias étnicas entre casos y controles que no habían sido bien estratificadas (65,114).

4.2. Estudios del genoma completo

Más recientemente, los avances a gran escala de la genómica han hecho que se desarrollen nuevas estrategias para abordar el estudio de las enfermedades complejas, y es posible analizar miles de polimorfismos para identificar variantes que se asocian a la susceptibilidad de padecer una determinada enfermedad compleja o alguno de sus síntomas, como los estudios de SNPs o la secuenciación masiva (112).

4.2.1. Estudios de ligamiento (*Genome-Wide Linkage Studies*)

Ligamiento puede definirse como la tendencia de los alelos de loci que están cercanos entre sí a heredarse juntos, como un bloque. Los estudios de ligamiento permiten analizar familias con individuos enfermos, intentando identificar marcadores genéticos que sean más frecuentes en los individuos afectados, aunque son técnicas que también tienen limitaciones, como su baja reproductibilidad o su restringida capacidad para poner de manifiesto loci que confieran un riesgo exclusivo en la patología objeto de estudio (112).

El primer estudio de ligamiento en vitíligo generalizado se determinó en una única familia caucásica, que presentaba una aparente herencia dominante con penetrancia incompleta. En este estudio se detectó un ligamiento en el cromosoma 1p31.3-p32.2, cuya secuenciación posterior identificó una variante reguladora de la transcripción de **FOXD3**, que codifica la proteína FOXD3 (Forkhead box D3), clave en la regulación de la diferenciación y desarrollo del melanoblasto (115). Estudios posteriores en múltiples familias caucásicas han identificado nuevas señales de ligamiento en los cromosomas 7, 8, 9, 11, 13, 17, 19 y 22 (65). Se han descrito alteraciones en el cromosoma 17p13, coincidiendo con **SLEVI1**, una señal de ligamiento para lupus eritematoso sistémico en familias con al menos un pariente con vitíligo generalizado u otra enfermedad autoinmune (116), y con el gen NALP1 (**NLRP1**), que codifica una proteína reguladora del sistema inmune innato, que se cree que funciona como un centinela para la infección bacteriana en la piel (65,113), y se ha asociado con vitíligo y otras enfermedades autoinmunes (117).

Estudios similares en población china determinaron señales de ligamiento en los cromosomas 1, 4, 6, 14 y 22, diferentes de las señales de pacientes caucásicos, lo que sugeriría que diferentes genes podrían estar involucrados en diferentes poblaciones (65).

Estudiando el cromosoma 22, se identificó el gen **XBP1**, que codifica la proteína *factor X-box binding protein 1*, capaz de activar la expresión de genes HLA de clase II, regular la diferenciación de células plasmáticas y mediar en respuestas inflamatorias (65), y que se ha descrito asociada a vitíligo generalizado (105) y enfermedad de Crohn (118).

4.2.2. Estudios de asociación (Genome-Wide Association Studies)

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) son los más adecuados para detectar alelos de susceptibilidad de enfermedades relativamente comunes con efectos moderados, y actualmente son considerados como gold-standard en la identificación de genes de susceptibilidad de rasgos complejos. Sin embargo, también tienen limitaciones. Es muy importante seleccionar muy bien la población, y realizar los estudios en muestras de gran tamaño, a pesar de lo cual los resultados en ocasiones son poco reproducibles. Aunque el desarrollo de estas herramientas ha supuesto una revolución en el estudio de las enfermedades complejas, los resultados obtenidos hasta ahora no han sido tan relevantes como se esperaba, y en la mayoría de los casos se encuentran asociaciones que ya se conocían (112).

En este sentido, se han publicado recientemente dos estudios de secuenciación genómica masiva realizados en dos cohortes de pacientes con vitíligo generalizado de diferente origen: caucásicos (119) y orientales (120), donde se ha demostrado la existencia de al menos 16 mutaciones que podrían estar asociadas a una mayor susceptibilidad de desarrollar vitíligo. Cabe destacar que 15 de esas 16 mutaciones se encuentran en genes relacionados con la regulación del sistema inmune o autoinmunidad.

En ambos estudios se ha detectado asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (**MHC**) en el cromosoma 6p21.3. En pacientes caucásicos, las señales de asociación fueron tanto para moléculas de clase I como de clase II. En el caso de las moléculas de clase I, la mayor asociación fue en la vecindad de HLA-A, con una fuerte vinculación con **HLA-A*02**. En las de clase II, la señal se localizaba entre HLA-DRB1 y HLA-DQA1, con una moderada vinculación a **HLA-DRB1*4**. Ambos resultados concordantes con estudios previos (121,122).

También en ambos estudios se ha detectado asociación con multitud de genes no relacionados con MHC, la mayoría de ellos que codifican proteínas inmunoreguladoras.

En los pacientes caucásicos (119) se han determinado 10 nuevos loci: **TYR** (tyrosinase), **PTPN22** (lymphoid-specific protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22), **RERE** (arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats protein; atrophin-like protein 1), **FOXP1** (forkhead box P1), **LPP** (LIM domain-containing preferred translocation partner in lipoma), **IL2RA** (IL-2 receptor alpha chain), **GZMB** (granzyme B), **UBASH3A** (ubiquitin-associated and SH3 domain-containing A), **C1QTNF6** (C1q and tumor necrosis factor-related protein 6), y **CCR6** (C-C chemokine receptor type 6); y se han confirmado otros tres previamente descritos: **XBPI1** (factor X-box binding protein 1), **FOXP3** (forkhead box P3), **TSLP** (thymic stromal lymphoprotein), y **CTLA4** (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) (105).

Otros estudios en población caucásica y población india han confirmado la implicación algunos de estos genes, y descrito otros nuevos, que están asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar vitíligo (Tabla 5) (108,109). Recientemente se ha descrito la asociación de vitíligo con determinados polimorfismos en el gen **CDH1**, que codifica la proteína **E-cadherina**, que está involucrada en la adhesión de los queratinocitos (37), aunque estos polimorfismos también pueden asociarse a otras enfermedades o comorbilidades autoinmunes (37).

Según estos resultados, el vitíligo generalizado se considera un trastorno poligénico y multifactorial, que implica numerosos genes, que en su mayoría codifican proteínas que regulan el reconocimiento o destrucción de los melanocitos por parte del sistema inmune. Algunos de estos genes determinarían una mayor susceptibilidad general para el desarrollo de enfermedades autoinmunes, mientras que otros determinarían una autoinmunidad específica frente a los melanocitos (113). Sin embargo, los loci identificados representan sólo el 10% del riesgo genético para desarrollar un vitíligo generalizado, lo que pone de manifiesto que otros loci adicionales están probablemente por descubrir (63).

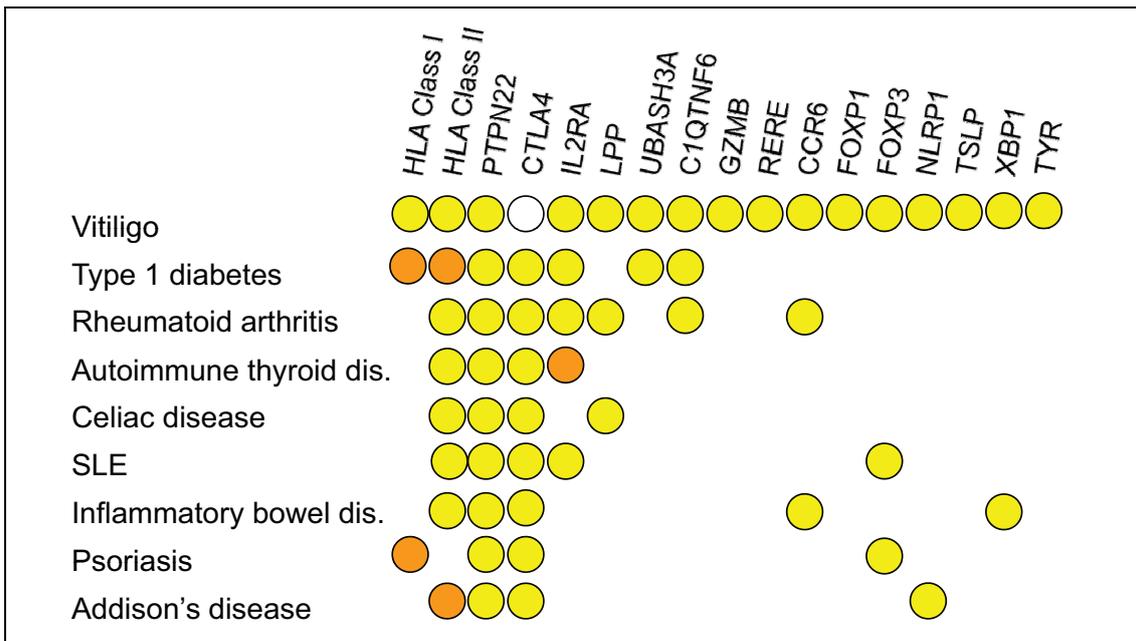


Fig.20. Genes de susceptibilidad en vitiligo generalizado y su relación con otras enfermedades autoinmunes. Los círculos indican loci asociados con la susceptibilidad a una determinada enfermedad autoinmune: amarillo, alelos de riesgo compartido; naranja, alelos de riesgo opuestos a la misma SNP; blanco, asociación secundaria. SLE, lupus eritematoso sistémico (63).

4.3. Principales loci relacionados con vitiligo generalizado

Confirmed and suggestive vitiligo susceptibility loci identified by genome-wide association or linkage studies

Chromosome	Candidate gene	Populations	Protein	Function
1p13.2	<i>PTPN22</i>	C	LYP protein tyrosine phosphatase	Regulates T-cell signaling
1p31.3	<i>FOXD3</i> [†]	C	Forkhead box D3	Transcriptional regulator of neural crest; melanoblast differentiation
1p36.23	<i>RELER</i>	C	Atrophin-1-like protein isoform b	Lymphoid transcriptional co-repressor; apoptotic regulator
2q24.2	<i>IFIH1</i>	C	Interferon-induced RNA helicase	Regulates innate antiviral immune responses
2q33.2	<i>CTLA4</i> [‡]	C	Cytotoxic T-lymphocyte-associated-4	Inhibits T cells via interaction with CD80 and CD86
3p13	<i>FOXP1</i>	C	Forkhead box P1	Transcriptional regulator of B-cell, T-cell, monocyte development
3q13.33	<i>CD80</i>	C	B-cell activation antigen B7-1	T-cell priming by B cells, T cells, dendritic cells; interacts with CTLA-4
3q28	<i>LPP</i>	A,C	LIM domain containing preferred translocation	Transcriptional co-activator?
4p16.1	<i>CLNK</i>	C	Mast cell immunoreceptor signal transducer	Positive regulator of immunoreceptor signaling
5q22.1	<i>TSLP</i> [§]	C	Thymic stromal lymphopoietin protein	Cytokine regulator of skin dendritic (Langerhans) cell maturation
6p22.1	<i>HLA-A</i>	C	Leucocyte antigen A α chain	Presents peptide antigens
6p22.1	<i>HLA-B-C</i>	A	Leucocyte antigen B or C α chain	Presents peptide antigens
6p21.32	<i>HLA-DRB1-DQA1</i>	C,I	Major histocompatibility complex class II region	Presents peptide antigens
6q15	<i>BACH2</i>	C	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper	B-cell transcriptional repressor
6q27	<i>CCR6</i>	A,C	Chemokine (C-C motif) receptor 6	Regulates differentiation and function of B cells, T cells, dendritic cells
6q27	<i>SMOC2</i> [¶]	C	SPARC-related modular calcium-binding protein	Regulate cell-extracellular matrix interactions
8q24.22	<i>TG/S�A</i>	C	Thyroglobulin, Src-like adaptor isoform c	Regulates antigen receptor signaling in T cells, B cells, dendritic cells
10p15.1	<i>IL2RA</i>	A,C	Interleukin 2 receptor α chain	Regulates interleukin 2-mediated activation of T-cells, regulatory T-cells
10q22.1	Gene desert	A		
10q25.3	<i>CASP7</i>	A	Caspase 7	Apoptotic executioner protein
11p13	<i>CD44</i>	C	CD44 antigen	T-cell regulator
11q14.3	<i>TYR</i>	C	Tyrosinase	Melanin biosynthetic enzyme
11q21	Gene desert	C	None	<i>TYR</i> regulation?
11q23.3	Gene desert	A		
12q13.2	<i>IKZF4</i>	A,C	Ikaros zinc finger protein, subfamily 1A, 4	T-cell transcriptional regulator
12q24.12	<i>SH2B3</i>	C	LNK adaptor	B-cell, T-cell developmental regulator
14q12	<i>GZMB</i>	C	Granzyme B	Mediates CTL-induced target cell apoptosis, helper T-cell apoptosis
15q12-13.1	<i>OCA2</i>	C	Oculocutaneous albinism II	Melanosomal membrane transporter/pump
16q24.3	<i>MC1R</i>	C	Melanocortin-1 receptor	Regulates melanogenesis
17p13.2	<i>NLRP1</i>	C	NLR family, pyrin domain containing 1	Regulates IL-1 β innate immune response via NLRP1 inflammasome

Chromosome	Candidate gene	Populations	Protein	Function
19p13.3	<i>TICAMI</i> ^{††}	C	Toll-like receptor adaptor molecule 1	Mediates innate antiviral immune responses
21q22.3	<i>UBASH3A</i>	C	Ubiquitin associated and SH3 domain containing	Regulates T-cell signaling, apoptosis
22q12.1	<i>XBPI</i> [§]	A,C	X-box binding protein 1	Transcriptional regulator of MHC class II expression, plasma cells
22q12.3	<i>CIQTNF6</i>	A,C	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	Innate immune response to light-induced apoptosis?
22q13.2	<i>TOB2</i>	C	Transducer of ERBB2, 2	Inhibitor of cell cycle progression; involved in T-cell tolerance
Xp11.23	<i>FOXP3</i> [§]	C	Forkhead box P3	Transcriptional regulator of regulatory T-cell function and development

[†] Found only in a single family with autosomal dominant vitiligo.^{66,67}

[‡] *CTLA4* is only associated with vitiligo in patients with other concomitant autoimmune diseases.^{74–76} Association of *CTLA4* with vitiligo may thus be secondary, driven by primary association with these other diseases.

[§] *XBPI*, *FOXP3* and *TSLP* are the only vitiligo candidate genes that achieve suggestive association in analysis of genome-wide association study data in Caucasians.⁷⁵ *XBPI* was identified as a positional candidate based on linkage in Chinese.⁷⁰

[¶] *SMOC2* is located very close to *CCR6* and may represent the same association signal.

^{††} *TICAMI* achieves highly suggestive association in analysis of GWAS data in Caucasians.¹⁰¹

Tabla.5. Principales loci asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar de vitiligo, identificados mediante estudios de asociación y ligamiento sobre el genoma completo (207).

5. ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS

Aunque tradicionalmente se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para estudio de la expresión génica, en la actualidad el método más utilizado para el análisis del transcriptoma son los microarrays de DNA, que permiten el estudio de los perfiles de expresión un miles de genes de forma simultánea. Los microarrays de DNA constan de miles de conjuntos ordenados de moléculas de DNA de secuencia conocida depositados en un soporte sólido de 2cm² y cada muestra se localiza de forma inequívoca en un punto del microarray. Permiten así la medida simultánea de expresión de miles de genes (sondas o secuencias conocidas) en un solo acto de hibridación con una muestra problema de DNA o RNA marcada, cuya abundancia será determinada por hibridación. La medida del nivel de mRNA permite determinar qué genes se están expresando en cada célula.

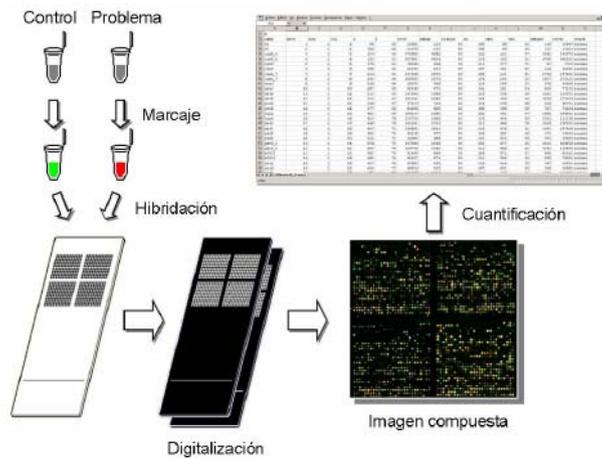


Fig.21. Metodología de estudio con microarrays de DNA

En pacientes con vitiligo, Yu et al (74) analizaron los cambios transcriptómicos presentes en piel lesional y no lesional, comparándolos con voluntarios sanos, usando microarrays de DNA y validando posteriormente mediante qRT-PCR.

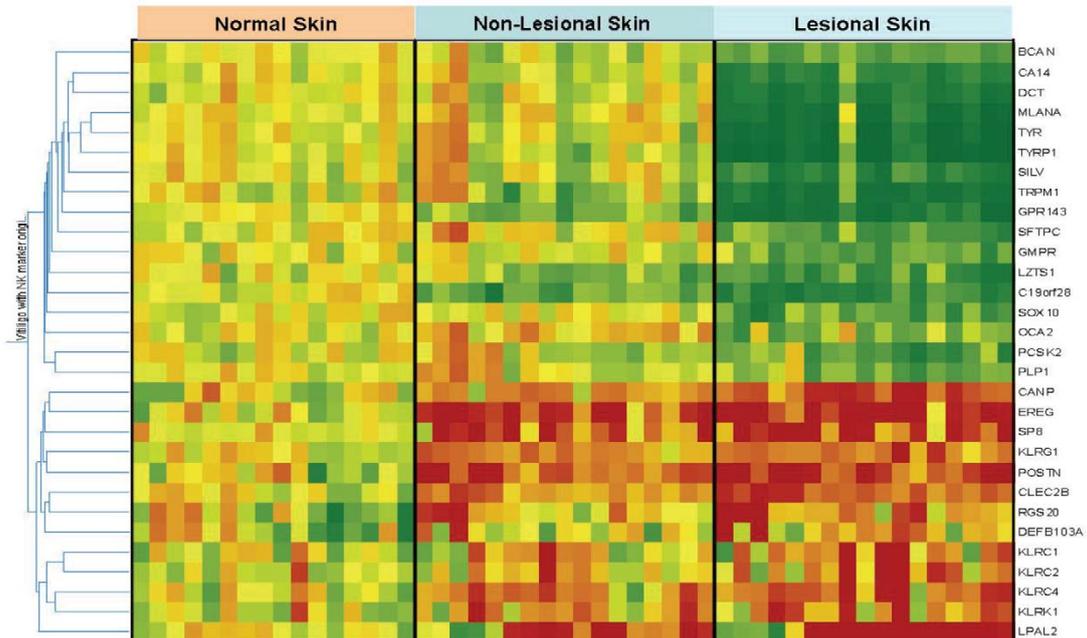


Fig. 22. Análisis transcriptómico de biopsias de vitiligo y piel normal. Se representan los niveles de expresión relativos a los 30 genes alterados significativamente en la piel con vitiligo de muestras individuales en relación con sus niveles de referencia, correspondientes con los promedios de expresión de las 16 biopsias de piel normal. En rojo, los genes con regulación aumentada en esa muestra específica en comparación con la piel normal de voluntarios sanos. En verde, los genes con regulación baja en esa muestra en comparación con la piel normal de voluntarios sanos. En amarillo, los genes con ningún cambio significativo entre la muestra y la piel normal de voluntarios sanos.

Estos autores identificaron expresión disminuida o ausente de 17 genes (la mayoría de ellos relacionados con los melanocitos) en la piel lesional respecto piel normal. También identificaron otros 13 genes que se sobreexpresaban en la piel lesional, y que eran genes que se relacionaban con el sistema inmune innato, especialmente con las células NK. Curiosamente, esos marcadores también estaba sobreexpresaban en la piel no lesional de pacientes con vitiligo, por lo que estos autores san sugerido que el tratamiento sería más eficaz realizado sobre toda la superficie corporal y no solo sobre piel lesional.

Gene	Chrom	¹ Microarray			² qRT-PCR			Function
		osome	LS/NS	NLS/NS	LS/NLS	LS/NS	NLS/NS	
TYRP1	9	0.06 *	0.97	0.06 *	0.02 *	1.34	0.01 *	Melanogenesis
TYR	11	0.08 *	1.09	0.07 *	0.02 *	1.25	0.02 *	Melanogenesis
MLANA	9	0.13 *	1.08	0.12 *	0.04 *	1.44 *	0.02 *	Melanogenesis
TRPM1	15	0.11 *	0.89	0.12 *	0.07 *	1.82 *	0.04 *	Melanogenesis and signal transduction
DCT	13	0.13 *	0.90	0.14 *	0.01 *	0.51 *	0.02 *	Melanogenesis
PMEL	12	0.21 *	1.02	0.21 *	0.22 *	2.16 *	0.10 *	Melanogenesis
CA14	1	0.21 *	0.89	0.24 *	0.33 *	1.98 *	0.17 *	Physiological processes
SFTPC	8	0.35 *	1.21	0.29 *	0.14 *	2.53 *	0.06 *	Surfactant
SOX10	22	0.31 *	0.80	0.39 *	0.02 *	0.20 *	0.08 *	Stem cell development
OCA2	15	0.58 *	1.44	0.40 *	0.46 *	1.06	0.43 *	Melanogenesis
PCSK2	20	0.36 *	0.89	0.40 *	0.18 *	1.05	0.17 *	Hormone synthesis
PLP1	X	0.50 *	1.14	0.44 *	0.23 *	0.57 *	0.41 *	Myelin sheath protein
GMPR	6	0.40 *	0.84	0.48 *	0.25 *	0.69 *	0.37 *	Nucleoside reductase
BCAN	1	0.37 *	0.78	0.47 *	0.15 *	0.87	0.17 *	Cell motility
LZTS1	8	0.31 *	0.63 *	0.49 *	0.10 *	0.44 *	0.23 *	Tumor suppressor
GPR143	X	0.10 *	0.51 *	0.20 *	0.09 *	0.76 *	0.12 *	Melanogenesis and signal transduction
C19orf28	19	0.22 *	0.44 *	0.50 *	0.21 *	0.87	0.25 *	Unknown

¹Ratios (LS/NS, NLS/NS, LS/NLS) are calculated based on the mean expression levels in 17 vitiligo skin and the mean expression levels in 16 normal skin. * p<0.05 after Bonferroni correction (Whitney U tests).

²Ratios (LS/NS, NLS/NS, LS/NLS) are calculated based on the mean expression levels in 23 vitiligo skin and the mean expression levels in 16 normal skin. * p<0.05 (Whitney U tests).

doi:10.1371/journal.pone.0051040.t003

Tabla.6. Genes con expresión disminuida en piel de pacientes con vitiligo.

Gene	Chrom	¹ Microarray		² qRT-PCR			Function	
		osome	LS/NS	NLS/NS	LS/NLS	LS/NS		NLS/NS
KLRC1	12	6.27 *	1.71	3.67 *	7.39 *	4.71 *	1.57 *	Natural killer cell receptor
KLRC2	12	5.88 *	1.44	4.08 *	8.55 *	9.26 *	0.92	Natural killer cell activating receptor
NKG2D (KLRK1)	12	2.48 *	2.02 *	1.23	6.07 *	5.98 *	1.01	Natural killer cell activating receptor
KLRG1	12	2.46 *	2.05 *	1.20	3.92 *	2.86 *	1.37	Natural killer cell receptor
KLRC4	12	3.91 *	2.27 *	1.72	7.91 *	5.37 *	1.47 *	Natural killer cell receptor
LPAL2	6	6.37 *	3.28 *	1.94 *	7.65 *	5.14 *	1.49 *	Pseudogene
CANP	11	3.56 *	1.92 *	1.85 *	1.62 *	1.69 *	0.96	Oxidative stress
DEFB103A	8	2.27 *	1.38	1.64	11.62 *	9.27 *	1.25	Innate immunity
CLEC2B	12	3.18 *	2.01 *	1.58	9.81 *	11.13 *	0.88	Ligand for natural killer cell receptor
SP8	7	6.48 *	4.15 *	1.56	5.53 *	8.15 *	0.68 *	Transcription factor
POSTN	13	5.70 *	3.68 *	1.55	4.23 *	2.76 *	1.53 *	Tissue injury and repair
RGS20	8	3.10 *	2.02 *	1.53	10.31 *	6.11 *	1.69 *	Signal transduction
EREG	4	7.46 *	5.37 *	1.39	7.09 *	6.74 *	1.05	Epidermal growth factor

¹Ratios (LS/NS, NLS/NS, LS/NLS) are calculated based on the mean expression levels in 17 vitiligo skin and the mean expression levels in 16 normal skin. * p<0.05 after Bonferroni correction (Whitney U tests).
²Ratios (LS/NS, NLS/NS, LS/NLS) are calculated based on the mean expression levels in 23 vitiligo skin and the mean expression levels in 16 normal skin. * p<0.05 (Whitney U tests).
doi:10.1371/journal.pone.0051040.t004

Tabla.7. Genes sobreexpresados en piel de pacientes con vitiligo

6. TRATAMIENTO DEL VITÍLIGO

La mayoría de los tratamientos, clásicos o emergentes, ponen de manifiesto el carácter autoinmune de la enfermedad, siendo el mecanismo de acción en la mayoría de ellos de carácter inmunomodulador o inmunosupresor.

6.1. Tratamientos clásicos

Los tratamientos clásicos incluyen tratamientos tópicos como corticoides, derivados de la vitamina D3, e inhibidores de la calcineurina, asociados o no a fototerapia, generalmente UVB de banda estrecha. Esta última se puede combinar igualmente con fotosensibilizantes tópicos como Khellina, o bien con tratamientos orales como fenilalanina (aminoácido esencial en la melanogénesis), polipodium leucotomus y otros antioxidantes, así como corticoides orales. Otras alternativas son el uso de láser excimer de 308nm y trasplante autólogo de melanocitos, siempre y cuando la enfermedad sea estable, dado el riesgo de koebnerización.

El siguiente esquema muestra una aproximación al tratamiento del vitiligo (30,114).

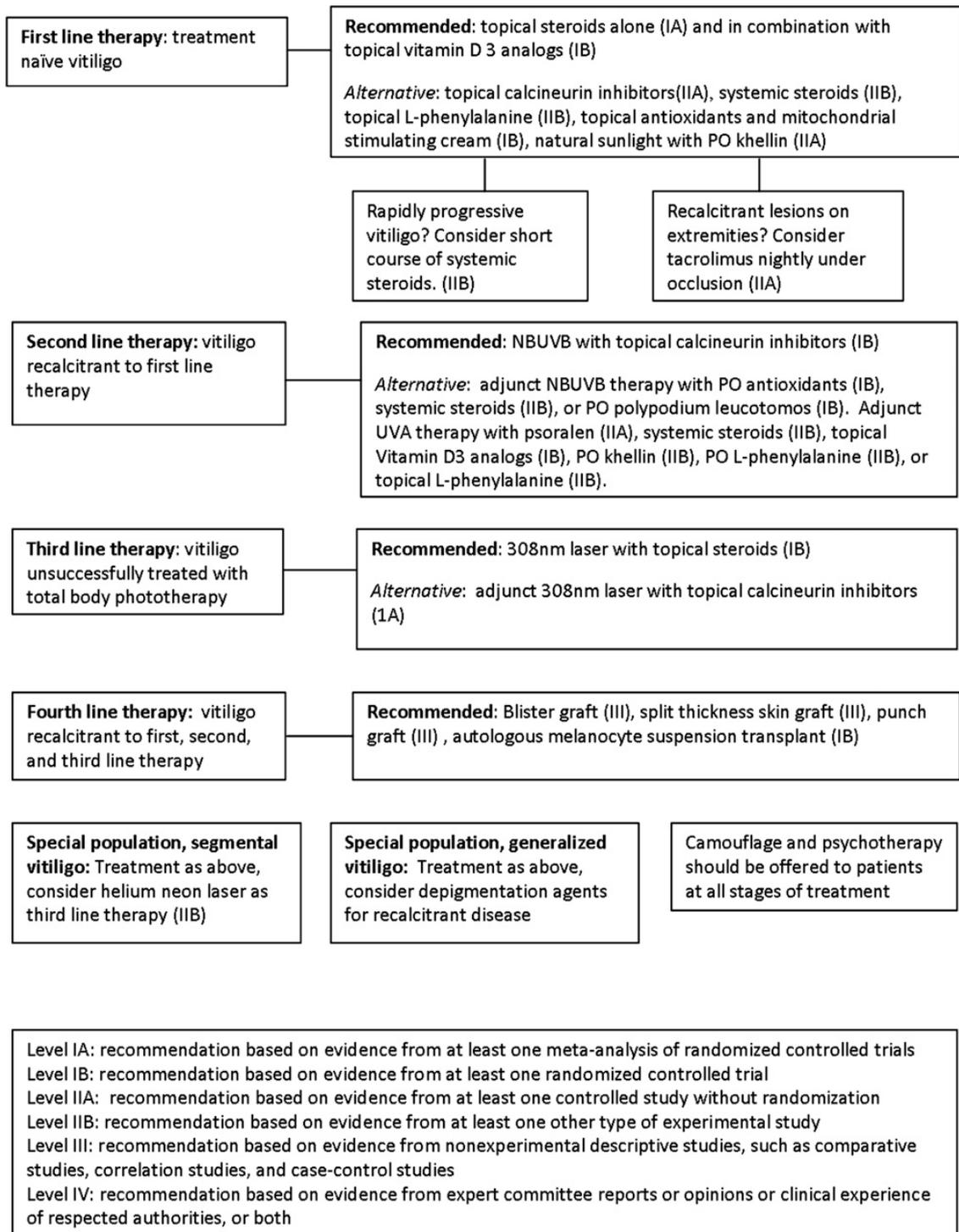


Fig.23. Algoritmo terapéutico en vitíligo (30).

6.2. Nuevas perspectivas

6.2.1. *LT reguladores como diana terapéutica*

La inducción de LT reguladores podría tener un papel importante en el tratamiento del vitíligo y otras enfermedades autoinmunes. Así, estos linfocitos podrían ser estimulados mediante la administración de probióticos y polisacáridos ácidos de *Panax Ginseng*, que pueden promover la expresión de FoxP3 (18,123). La modulación de los LTreg también podría estimularse mediante el uso de péptidos derivados de autoantígenos, capaces de suprimir LTCD4+ autorreactivos y la producción de autoanticuerpos, generando tolerancia, de forma similar al uso de vacunas en enfermedades alérgicas (124).

El balance de LTreg/LTh17 y LTreg/LTh1 también puede ser controlado mediante la modulación de los factores de transcripción STAT5, STAT3 y STAT1, que regulan la diferenciación de LTreg, LTh17 y LTh1 respectivamente, como veremos a continuación.

6.2.2 *Estatinas e inhibición de STAT*

Los inhibidores de la HMG-coA (3-hydroxy-3metitylglutaryl coenzyme A reductasa) o estatinas reducen la aterogénesis y factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, tienen además múltiples funciones inmunomoduladoras (77):

- Regulan a la baja la expresión de moléculas de adhesión, entre ellas ICAM-1, MAC-1 (CD11b/CD18) y LFA-1 (CD11a/CD18), interfiriendo así la unión de ICAM-1 y LFA-1, crucial para la activación de los linfocitos por parte de las células presentadoras de antígenos, y su migración hacia los lugares de inflamación.

- Inhiben la expresión inducible de MHC-II en numerosos tipos celulares, siendo la atorvastatina la más potente.

- Reducen la expresión de receptores de citoquinas (CCR5 y CXCR3) en LTh1, inhibiendo la activación y migración de los mismos en los lugares de inflamación.

- Lovastatina bloquea la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa y la expresión de numerosas citoquinas proinflamatorias como TNF- α interferon- γ , IL-8, IL-1 β e IL-6 en macrófagos, e induce la expresión de citoquinas Th2, modificando el

ratio CD4/CD8. Simvastatina también posee estos efectos, aumentando la producción de citoquinas reguladoras como IL-10 y TGF- β , y disminuyendo TNF- α , IL-6 e IL-2(125). Asimismo, posee efectos antioxidantes e inhibe la peroxidación lipídica contribuyendo a la estabilidad de la placa de ateroma.

- Inhiben la proliferación de células mononucleares del sistema inmune, siendo la simvastatina (la menos hidrofílica), la más potente y con efectos dosis dependientes.

- Inhiben la activación de células NK *in vitro*.

Por todo ello, su uso puede ser efectivo para el tratamiento de múltiples enfermedades dermatológicas de carácter inmunológico, como vitíligo, alopecia areata, liquen plano, lupus eritematoso, psoriasis, penfigoide ampolloso, esclerosis sistémica, micosis fungoide, enfermedad de Bechet, eritema multiforme y necrolisis epidérmica tóxica (77).

Así, la combinación de simvastatina/ezetimiba (40/10mg al día) ha sido utilizada con éxito en pacientes con alopecia areata total y universal (126). Ezetimiba posee igualmente efectos inmunomoduladores propios y posiblemente sinérgicos con la simvastatina (127).

Se desconocen cuáles son los mecanismos exactos que expliquen estos efectos antiinflamatorios. El mejor conocido es la inhibición de HMG-CoA reductasa durante la biosíntesis de colesterol endógeno. Adicionalmente, pueden actuar sobre el sistema inmune mediante dos vías, bloqueando la función de LFA-1, ya comentada, o bien a través de señales de transcripción (STAT) mediadas o no por fosfatidilinositol 3, un segundo mensajero involucrado en múltiples funciones de las células T (77,128). Estos efectos inmunomoduladores también quedan patentes sobre células tumorales. La simvastatina es capaz de inducir la apoptosis en células cancerosas. La vía JAK/STAT parece tener un papel importante en la proliferación y apoptosis en muchos tejidos, de manera que una disregulación en esta vía parece estar implicada en la tumorigénesis. Así, la simvastatina se ha asociado a la disminución en la proliferación, migración e invasión tumoral, mediante la inhibición de la fosforilación del factor transcripcional STAT5 (129) y STAT3 (130), que regulan la diferenciación de LTreg y LTh17 respectivamente. La simvastatina es capaz de inhibir la presentación antigénica por

parte de la CPA, suprimiendo la expresión de MHC-I y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD40, así como disminución de sus prolongaciones dendríticas, mediante la inhibición de STAT1 y STAT3, factores reguladores de la diferenciación hacia LTh1 y LTh17 respectivamente. Consecuentemente, inhibirá por tanto la proliferación de LTh1 y LTh17 así como la secreción de citoquinas relacionadas con cada respuesta (131).

Desde el punto de vista terapéutico en el vitíligo, el uso de simvastatina en modelos animales en ratones despigmentados, previene y revierte las lesiones de vitíligo estable. (128) Este hecho parece estar en relación con la inhibición de INF- γ , mediada a su vez por la inhibición de STAT1 (128). Para ser efectivo en humanos, se requerirían altas dosis que alcanzaran niveles en la piel. La simvastatina es la más lipofílica y por ello puede acumularse en otros tejidos además del hígado, incluyendo la piel (132). Esto hace que pueda ser más efectiva en el tratamiento del vitíligo, pero también explica la mayor incidencia de efectos secundarios como miopatía y rabiomiólisis, contraindicándose su uso a partir de 80mg/día (133). Noel et al (134) objetivaron de manera incidental la regresión del vitíligo en un paciente tratado con 80mg/día de simvastatina por motivos cardiovasculares, apoyando su uso como inmunomodulador. No existen datos actualmente que determinen la eficacia de su uso tópico.

6.2.3. Conversión de fibroblastos en melanocitos funcionales

Recientemente se ha objetivado la transformación directa de fibroblastos de ratón y humanos, en melanocitos funcionales, sin necesidad de partir de una célula stem, mediante la combinación de tres factores de transcripción: **SOX10/MITF/PAX3**. Estos tres factores son suficientes para reprogramar los fibroblatos en melanocitos inducidos, que posean las mismas características fenotípicas y funcionales que un melanocito normal, integrándose en la unión dermoepidérmica, y produciendo y transfiriendo melanina a los queratinocitos circundantes, en modelos de piel sintética en 3D. Igualmente, son capaces de generar epidermis y folículos pigmentados en modelos humanos *in vivo*. Los autores demostraron un aumento del porcentaje de células TYRP1+ tras ser estimuladas con la combinación SOX10/MITF/PAX3 (135).

Tanto SOX10, como MITF y PAX3, son factores relacionados con la migración y desarrollo de los melanocitos desde la cresta neural. SOX10 tiene un papel dominante en la diferenciación de las células derivadas de la cresta neural y se han descrito anticuerpos frente a SOX 10 en pacientes con vitiligo (109). Igualmente MITF es clave en la diferenciación de dichas células hacia melanocitos (136), y su expresión se ve disminuida por la presencia de IL-6 e IL-22, propias de una respuesta Th17, y regulada de forma indirecta con la activación de STAT3, en pacientes con vitiligo (89). PAX3 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los *paired box* y se ha determinado su presencia en oído, ojo, y huesos de la cara, entre otras localizaciones (137).

Curiosamente, el *síndrome de Waanderburg* (SW) se ha asociado a mutaciones en SOX10 (SW4), MITF (SW2) y PAX3 (SW1 y 3), que pueden explicar sus características fenotípicas. Está caracterizado por manchas acrómicas en piel, piebaldismo (mechón de pelo blanco), canicie prematura, isohipocromía de iris y sordera neurosensorial, debido a la ausencia de melanocitos en piel, folículos pilosos, coroides y oído interno, respectivamente, así como dismorfia facial por distopia cantorum (138).

6.2.4. Terapias biológicas

Finalmente, el desarrollo de terapias biológicas sistémicas dirigidas específicamente frente a determinadas citoquinas, como ocurre en el tratamiento de la psoriasis, podrían ser utilizadas con éxito en pacientes con vitiligo.

En este sentido, es comprensible una especial relevancia para los nuevos fármacos dirigidos frente a la IL17, todavía en desarrollo, así como inhibidores de la IL-12/IL-23, utilizados con éxito en psoriasis y no existiendo datos actualmente al respecto en el caso de vitiligo.

Resultados preliminares parecían indicar una alteración en la progresión del vitiligo en pacientes tratados con inhibidores de TNF- α (30). Sin embargo, a pesar de la relación directa entre los niveles de TNF- α y vitiligo (139), los resultados son contradictorios,

describiéndose una falta de eficacia (140) o incluso empeoramiento (141) de las lesiones, así como el desarrollo de novo de vitíligo y halo nevus en pacientes tratados con estos agentes por presentar psoriasis (142). Este hecho parece estar en relación con el descenso en la producción y activación de los linfocitos T reguladores, que normalmente son estimulados por TNF- α (143). Recientemente, otros autores describen, sin embargo, una estabilización de las lesiones de vitíligo, e incluso repigmentación inicial de las mismas, en pacientes tratados con estos agentes (144).

7. CITOMETRÍA DE FLUJO

7.1 Fundamentos básicos de la CMF

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular altamente precisa capaz de identificar, y caracterizar células (y otras partículas) que se encuentran suspendidas en un fluido. Los citómetros de flujo emplean uno o varios haces de luz láser, con longitudes de onda bien definidas, que inciden sobre las células cuando pasan de forma alineada y de una en una por delante de la luz del láser, de tal forma que es posible medir, de forma individualizada para cada célula o partícula, sus características de dispersión de luz, que permiten evaluar su tamaño (midiendo la dispersión frontal de la luz del láser) y su complejidad interna (midiendo la dispersión lateral de la luz del láser). Además, las células se pueden marcar con anticuerpos monoclonales que llevan unidas moléculas fluorescentes, que se excitan con la luz del láser del citómetro y emiten en una longitud de onda diferente, lo que permite recoger esta información de forma separada. Así, es posible evaluar la presencia de determinados antígenos frente a los que van dirigidos los anticuerpos monoclonales con los que se han marcado las células. La citometría de flujo permite recoger información estadísticamente robusta de mediciones realizadas sobre un gran número de células, y es posible tanto identificar distintas poblaciones que coexisten en la muestra analizada, como cuantificarlas en números absolutos o relativos, además de caracterizarlas en base a expresión o ausencia de expresión de los antígenos estudiados.

Algunos citómetros de flujo disponen de sistemas que actúan también como separadores o "sorters", con la finalidad de purificar poblaciones celulares de determinadas características, lo que permite realizar otros estudios (genéticos, moleculares..) en poblaciones con elevadísimo grado de pureza.

La citometría de flujo ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, gracias fundamentalmente a los avances ocurridos en distintas áreas, incluida la tecnología láser, la producción de anticuerpos monoclonales, la química de los fluorocromos, la mecánica de fluidos, la óptica, la electrónica y la informática(145). Ello ha permitido que en la actualidad la mayoría de los laboratorios clínicos empleen citómetros de 8 colores, que permiten analizar simultáneamente hasta 10 parámetros (tamaño, complejidad interna y presencia o ausencia de 8 antígenos marcados con anticuerpos monoclonales fluorescentes) en cada una de las células o partículas que se analizan. Además, estos citómetros son muy rápidos en la adquisición de muestras (hasta 15.000 partículas por segundo), lo que permite analizar un elevadísimo número de células o partículas en un periodo de tiempo muy corto.

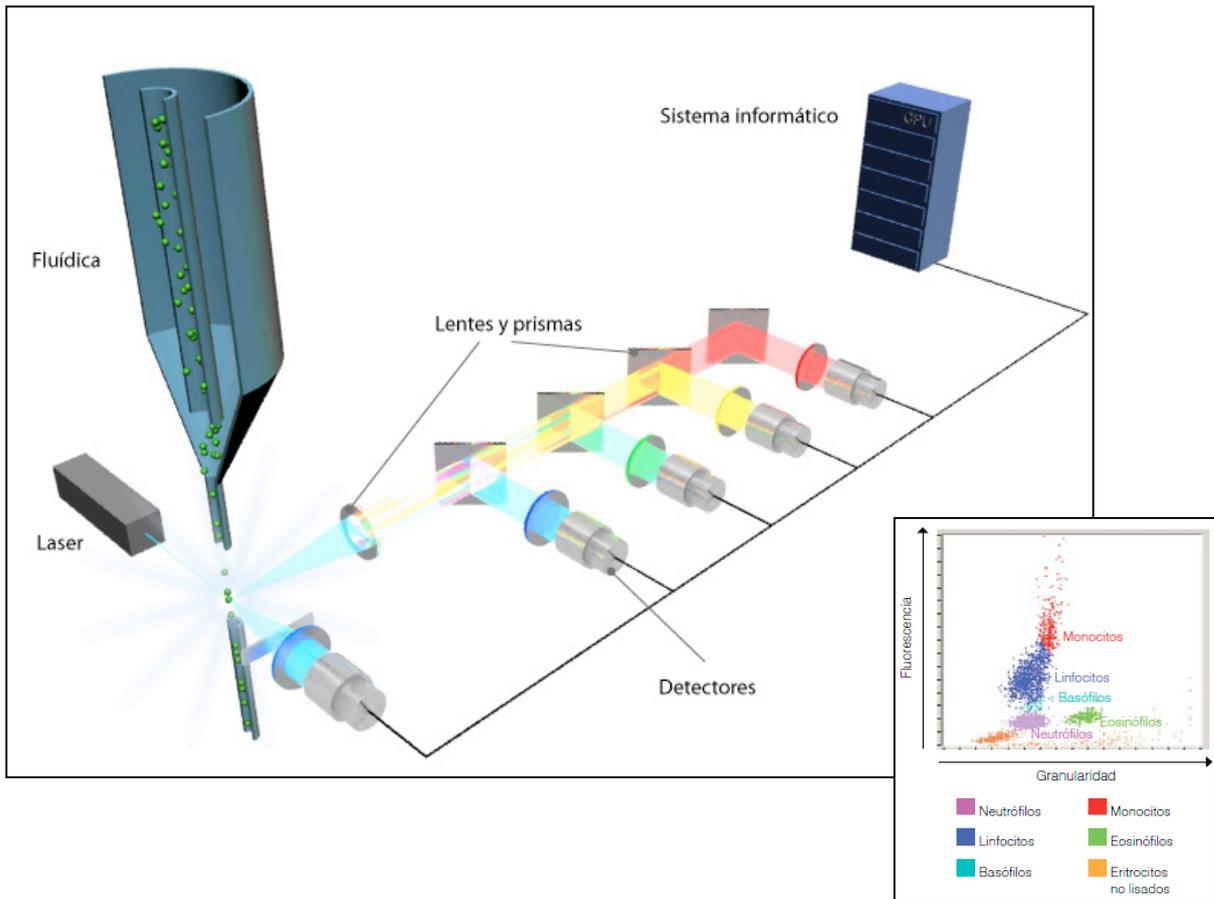


Fig. 24. Fundamento de la citometría de flujo de fluorescencia. Las células u otras partículas en suspensión circulan alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida deriva de la dispersión de la luz, que se correlaciona con el tamaño y granularidad, así como de la emisión de luz por los fluorocromos (naturales o unidos a ella artificialmente) presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un sistema informático. El gráfico de la izquierda muestra el funcionamiento de un citómetro de 3 colores y el de la derecha, la imagen resultante en el caso de uno de 6 colores.

7.2. Aplicaciones clínicas de la CMF

La citometría de flujo, gracias a su capacidad para analizar células o partículas de forma multiparamétrica, rápida, sensible y específica, es ampliamente utilizada en ciencias como la inmunología, hematología, oncología, anatomía patológica y biología celular. Mediante esta técnica es posible analizar marcadores de membrana e intracelulares, lo que permite identificar y caracterizar las células en base a su inmunofenotipo, su capacidad funcional, su patrón de secreción de citocinas o su contenido en ácidos nucleicos, entre otros.

En la actualidad, la citometría de flujo es una herramienta básica y una de las tecnologías más potentes que se usa rutinariamente tanto en el ámbito de la inmunología como en el diagnóstico y clasificación de las hemopatías.

A continuación listan las aplicaciones clínicas más frecuentemente usadas en la actualidad (145,146):

- Estudio de subpoblaciones linfocitarias:
 - Monitorización de linfocitos T CD4+ en pacientes VIH positivos
 - Inmunodeficiencias
 - Reconstitución inmune tras trasplante
- Diagnóstico y clasificación de enfermedades hematológicas:
 - Leucemias agudas y crónicas
 - Linfomas y mielomas
- Detección de enfermedad mínima residual
- Hemoglobinuria paroxística nocturna
- Cuantificación de precursores hematopoyéticos CD34+
- Detección y cuantificación de leucocitos residuales en hemoderivados
- Análisis de células raras:
 - Mastocitosis
 - Detección de células tumorales circulantes
 - Detección de células fetales en sangre materna
 - Detección de células activadas o antígeno-específicas circulantes
- Diagnóstico de enfermedades congénitas plaquetarias:
 - Tromboastenia de Glanzmann
 - Síndrome de Bernard-Soulier
- Otros estudios:
 - Mecanismos de resistencia a drogas
 - Ploidía de DNA e índice de proliferación en tumores sólidos
 - Estudios de apoptosis
 - Estudios de función y activación de plaquetas
 - Cinética celular
 - Citoquinas intracelulares
 - Estudios de histocompatibilidad

7.3. CMF y caracterización del sistema inmune

El uso de la citometría de flujo ha revelado la presencia de cientos de tipos de células fenotípicamente distintas en sangre periférica, y la capacidad de esta técnica para discriminar tipos de células es crucial para la comprensión de la inmunidad celular y la patogénesis de distintas enfermedades.

En inmunología, la mayoría de los estudios se centran en el análisis de las poblaciones linfocitarias, que pueden identificarse gracias a la expresión de distintos marcadores (CD3 en linfocitos T, con las subpoblaciones CD4 y CD8 de LT cooperadores y supresores, CD19 en linfocitos B, o CD56 en ausencia de CD3 en células NK). Dentro de estas poblaciones mayoritarias es posible identificar distintas subpoblaciones. Así, por ejemplo, se pueden distinguir poblaciones de células T en base a si han tenido o no contacto con el antígeno (naive, memoria y efectores), y se han propuesto diversos marcadores (como CD45RA, CD45RO o CD27) para identificarlos. También es posible identificar LTreguladores gracias entre otros a la expresión de CD25, FoxP3 o CD127 (147–150). Otros marcadores se pueden emplear para identificar activación (como CD25, HLADR, CD38), inhibición (como PD1) o citotoxicidad (como CD16 y CD56). Dentro del compartimento de células B se pueden identificar distintos estadios madurativos gracias al estudio de marcadores como CD10, CD20, CD27 o CD38 (147,148).

Otros tipos celulares han sido menos estudiados en el ámbito de la inmunología, aunque se dispone de marcadores para identificar numerosas poblaciones, tal como se muestra en la Figura 20.

7.4. Estudios inmunofenotípicos mediante CMF en vitíligo

Los estudios en sangre periférica de subpoblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune podría contribuir a profundizar en el conocimiento de los mecanismos que participan en los fenómenos de autoinmunidad, como del vitíligo. Sin embargo, hasta la fecha existen muy pocos trabajos que hayan estudiado en profundidad las distintas poblaciones celulares en sangre periférica en este contexto. Los datos reportados hasta

ahora se resumen en el apartado 3 de la Introducción (Sistema inmune y vitíligo), se refieren en su gran mayoría a pacientes con vitíligo no segmentario (22,70,99,151,152). En el caso de en pacientes con vitíligo no segmentario existe aún menos información, y no existen publicaciones relevantes en los que se realice un análisis comparativo en pacientes con halo nevus y/u otras formas de vitíligo. Además, es importante señalar que no se ha publicado hasta la fecha ningún trabajo en el que se analice la sangre periférica de estos pacientes mediante análisis multiparamétrico por citometría de flujo de alta sensibilidad (8 colores), ni en el que se estudien de forma tan exhaustiva todas las poblaciones celulares de sangre periférica que se han analizado en el presente trabajo.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

La trascendencia socio-económica del vitíligo asociada a su alta prevalencia (1% de la población mundial), y a su etiopatogenia aún desconocida pero probablemente multifactorial, justifican el presente estudio. El hecho de un probable origen autoinmune unido a determinadas características genéticas, hace que las nuevas herramientas inmunofenotípicas, genómicas y transcriptómicas resulten muy atractivas para el estudio de la enfermedad.

En nuestro conocimiento no existe ninguna publicación en la que se haya aplicado esta novedosa tecnología (citometría de flujo de 8 colores) en el estudio de las poblaciones celulares de sangre periférica que participan en la respuesta inmune en pacientes con vitíligo. Además, los estudios genéticos son aún escasos y la gran mayoría no se han realizado sobre subpoblaciones celulares purificadas.

Asimismo, un mayor conocimiento sobre la patogenia de esta enfermedad, abre un área de oportunidad para la investigación en el campo de la inmunooncología en melanoma.

2. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis se basa en la posibilidad de que la caracterización de las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune que están presentes en la sangre periférica de los pacientes con vitíligo en sus distintas variantes clínicas (vitíligo no segmentario, halo nevus y vitíligo no segmentario asociado a halo nevus), permita profundizar en el conocimiento de su patogenia y potencialmente contribuir en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, que podrían tener un alto impacto socio-económico y emocional en los pacientes con esta enfermedad.

Para ello, en el presente estudio, hemos aplicado los recientes avances tecnológicos desarrollados para el análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo en el campo de la Hematología (utilizados en diagnóstico diferencial y monitorización de enfermedad mínima residual de leucemias y linfomas) al campo de la Inmunología, estudiando en detalle la frecuencia y el perfil fenotípico de las poblaciones celulares

más relevantes del sistema inmune (células T, B, dendríticas, NK, y mieloides). Además, en base a las características antigénicas, se ha realizado una separación celular mediante citometría de flujo (“sorting”) de las subpoblaciones celulares potencialmente involucradas en la patogénesis del vitíligo y/o halo nevus, que están congeladas en el Biobanco del Hospital Universitario de Salamanca. En el futuro, y cuando se disponga de los fondos necesarios, se realizarán estudios genómicos y de perfil de expresión de RNAm sobre estas poblaciones.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

El presente estudio tiene como objetivo principal la caracterización detallada a nivel inmunofenotípico (mediante citometría de flujo de alta densidad) de distintas poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune en la sangre periférica de pacientes con vitíligo y/o halo nevus, con la finalidad de identificar posibles mecanismos asociados a la patogénesis de la enfermedad, así como potenciales dianas terapéuticas.

3.2. Objetivos específicos

Nos planteamos alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar, mediante citometría de flujo de alta densidad, las poblaciones celulares implicadas en el sistema inmune (células B, T, NK, dendríticas y mieloides) presentes en la sangre en pacientes con vitíligo y/o halo nevus y comparar su perfil de expresión inmunofenotípico con el de individuos normales.

- 2.- Aislar, mediante citometría de flujo multidimensional (“sorting”), las poblaciones celulares mayoritarias del sistema inmune (células B, T, NK, dendríticas, y mieloides), para su congelación por separado, de cara a realizar estudios moleculares cuando se disponga de los fondos necesarios, que potencialmente puedan identificar vías de señalización o genes con potencial interés terapéutico en el contexto del vitíligo.

Además, congelar suero de los pacientes y de los controles, para realizar estudios de citocinas cuando se disponga de los fondos necesarios.

3. Analizar si existen diferencias en los patrones inmunofenotípicos de la sangre periférica en relación con las distintas variantes clínicas de la enfermedad (vitíligo no segmentario, halo nevus asociado o no a otras formas de vitíligo)

4. Analizar la relación de la caracterización inmunofenotípica en sangre periférica con el grado de despigmentación (grado según *Vitiligo European Task Force: VETF*) y extensión de la enfermedad (superficie corporal afectada según VETF) , así como con su capacidad de progresión (progresión según VETF) o repigmentación (según *Vitiligo Potential Repigmentation Index: VPRI*), en pacientes con vitíligo no segmentario.

5. Analizar posibles diferencias clínicas e inmunofenotípicas en sangre periférica entre las formas de halo nevus asociado a vitíligo segmentario y halo nevus asociado o no a otras formas de vitíligo.

6. Analizar posibles diferencias inmunofenotípicas en sangre periférica según la presencia o no de la comorbilidad asociada en pacientes con VNS.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño

Diseño observacional, descriptivo y transversal, realizado en muestras de sangre periférica de pacientes con vitíligo y/o halo nevus, en el que se incluye un grupo control de sujetos sanos.

2. Pacientes y Muestras

2.1. Selección de casos y controles

Se han incluido de forma prospectiva 43 pacientes con vitíligo, halo nevus o ambos, diagnosticados de acuerdo con los criterios clínicos en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Salamanca, durante los años 2013 y 2014. En todos los casos, y antes de la toma de muestra, se obtuvo un consentimiento informado por escrito específico para el presente estudio, que había sido previamente aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca.

Los criterios de inclusión fueron: edad superior a 16 años, diagnóstico clínico de vitíligo no segmentario, vitíligo mixto y/o halo nevus.

Se emplearon además los siguientes criterios de exclusión: presencia aislada de vitíligo segmentario como única manifestación, presencia de vitíligo focal o indeterminado (no clasificable) como única manifestación, y antecedentes de melanoma. La presencia aislada de vitíligo segmentario o indeterminado se considera igualmente un criterio de exclusión.

Como control, se emplearon muestras de sangre periférica de 10 voluntarios sanos, que otorgaron su consentimiento informado y cumplían los siguientes criterios: edad superior a 16 años, ausencia de signos y antecedentes personales y familiares de vitíligo y/o halo nevus, y ausencia de antecedentes personales y familiares de enfermedades autoinmunes.

Con el objetivo de ajustar en lo posible las edades de los controles a las edades de los pacientes incluidos en el estudio, la selección de los controles se realizó tras la inclusión de los pacientes. Dada la distribución por décadas de edad de los pacientes (Tabla), se seleccionaron 4 controles de menos de 40 años y 6 de más de 40 años.

Décadas	Porcentaje
10-20	5,1
21-30	17,9
31-40	28,2
41-50	17,9
51-60	12,8
61-70	2,6
71-80	7,7
81-90	7,7

Tabla. 8 . Distribución por décadas de la edad de los pacientes reclutados.

2.2. Variables clínicas

La historia clínica fue realizada usando un cuaderno de recogida de datos estandarizado, seguido de un examen clínico completo y evaluación de fotografías clínicas seriadas.

Cuaderno de recogida de datos clínicos (CRD clínico)

El CRD clínico (*Fig.25.*) incluía datos relativos a los antecedentes personales y familiares, características y evolución de la enfermedad, comorbilidades, examen físico completo, y fotografías seriadas.

ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES CON VITILIGO

1. DATOS DE FILIACIÓN

Nombre: _____ Edad: _____
 Apellidos: _____ Sexo: V M
 Dirección: _____ Fecha ingreso en estudio: _____
 Teléfono: _____ Nº de identificación del paciente: _____
 NHC: _____

2. ANTECEDENTES PERSONALES: AUTOINMUNIDAD Y OTROS FACTORES

a) Alergias medicamentosas: _____
 b) Antecedentes de Atopia: Rinitis Conjuntivitis Asma Dermatitis
 Contacto, Especificar: _____
 c) Enfermedades Autoinmunes Cutáneas: _____
 Alopecia Areata Lupus Eritematoso Urticaria cr. Otra: _____
 d) Enfermedades Autoinmunes Sistémicas: _____
 Hipotiroidismo Hipertiroidismo Diabetes Mellitus-I Lupus Eritematoso
 Anemia Perniciosa Otras: _____
 f) Tratamiento concomitante: Propranolol Cloroquina Flútenazina Fisostigmina
 Imatinib Otro: _____
 g) Factor desencadenante: Sí No
 Sí Sí; Especificar: _____
 Químicos: _____
 Área de contacto inicial: _____
 Tiempo desde la exposición y la despigmentación: _____ meses
 Tiempo desde la despigmentación y generalización del vitiligo: _____ meses
 Estrés
 Fenómeno de Koebner
 Tipo 1: Historia. ¿Despigmentación tras traumatismo en el último año?
 Presión crónica (burlas, corse, escarificación) _____
 Quemaduras (quemaduras) _____
 Químicos/fenólicos (domadural) _____
 Dermatitis de contacto (alergica, irritativa, tatuaje, vacuna) _____
 Tratamientos (radioterapia, fototerapia) _____
 Tipo 2: Clínico.
 Área de presión/fricción (codos, rodillas...) o relacionado con ropa o accesorios
 Despigmentación claramente inducida por trauma (lineal, puntiforme)
 Tipo 3: Inducido experimentalmente
 Presión/fricción Traumatismo epidérmico Traumatismo dermoepidérmico
 Otros: infección, fármacos, alteración neurológica.... _____

4. ANTECEDENTES FAMILIARES

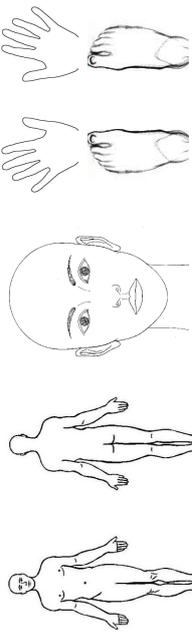
a) Enfermedades Autoinmunes Cutáneas
 Vitiligo Halo Nevus Alopecia Areata Urticaria crónica Lupus Otra: _____
 Grado de parentesco: 1º 2º 3º

b) Enfermedades Autoinmunes Sistémicas
 Hipotiroidismo Hipertiroidismo Diabetes Mellitus-I Lupus Eritematoso
 Anemia Perniciosa Otras: _____
 Grado de parentesco: 1º 2º 3º

* Possible sources of phenolic-quinolone derivatives⁹ include adhesives, de-emulsifiers used in oil fields, deodorants, disinfectants, duplicat: ing paper, formaldehyde resin, germicidal detergents, insecticides, latex gloves, motor oil additives, paints, photographic chemicals, plaster, criers, printing ink, rubber antioxidants, soap antioxidants, synthetic oils, varnishes, and lacquer resins.

5. VISITA BASAL. VITILIGO. Semana 0

a) Tiempo de evolución del vitiligo: _____ meses. Edad de inicio: _____
 b) Analítica: Sí No
 Hormonas tiroideas: TSH: _____ T4: _____ Valores normales: Sí No
 Ac Antitiroideos: a-Tioglobulina: _____ a-Peroxidasa: _____ VN: Sí No
 ANA. Título: _____ VCM: _____
 Hemoglobina: _____
 a- Células Parietales: _____
 a- Factor Intrínseco: _____ VN: Sí No
 c) Histología: Sí No
 d) Iconografía: I II III IV V VI Color pelo: _____ Color ojos: _____
 e) Fototipo: I II III IV V VI
 f) Forma clínica:
 Vitiligo/ Vitiligo no segmentario
 Acrofacial Generalizado Universal (>80% SCA) Mucoso (>1): _____
 Formas especiales:
 Vitiligo punctata Follicular Inflamatorio Azul
 Minor (despigmentación parcial) tricrómico cuatricrómico
 Mixto (asociado a vitiligo segmentario)
 Vitiligo segmentario
 Uni-: _____ Bi-: _____ Pluri-: _____
 Vitiligo indeterminado
 Focal Mucoso (sólo una mucosa). Cual: _____
 Halo nevus. Nº: _____ Localización: _____



g) Severidad: Índice VASI (Vitiligo Area Scoring Index) VASI-score (0-100): _____

VASI: Σ body sites (hand units) x (residual depigmentation)
 Body sites: manos, EESS, tronco, EEI, pies. Hand Unit, 1%
 Residual depigmentation: 100% 90% 75% 50% 25% 10%

Manos: HU: _____	RD: _____	Producto: _____
EESS: HU: _____	RD: _____	Producto: _____
Tronco: HU: _____	RD: _____	Producto: _____
EEI: HU: _____	RD: _____	Producto: _____
Pies: HU: _____	RD: _____	Producto: _____
Total: _____		

Cabeza y cuello: HU: _____ RD: _____ Producto: _____

Examen con lámpara de Wood: Sí No
 Superficie corporal afectada: _____ %
 Grado: I. Leve 1-25% II. Moderado 26-50%
 III. Extenso 51-75% IV. Severo 76-100%

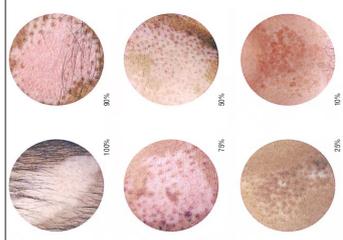


Fig.25. CRD clínico páginas 1 y 2.

6. VISITA SEGUIMIENTO VITILIGO. meses

a) Cumplimiento terapéutico: Sí No
 Cambio de posología / dosis: Sí. Especificar: Intensificación Reducción No
 Nueva pauta: Sí. Especificar: No
 Cambio de tratamiento: Sí. Especificar: No
 Por efectos secundarios: No

b) Extensión: Índice VASI (*Vitiligo area scoring index*) VASI-score (0-100): _____
 VASI: Σ body sites (hand units) x (residual depigmentation)

Body sites: manos, EESS, tronco, EELI, pies. Hand Unit: 1%
 Residual depigmentation: 100% 90% 75% 50% 25% 10%

Manos: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 EESS: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 Tronco: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 EELI: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 Pies: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 Total: _____

Cabeza y cuello: HU: _____ RD: _____ Producto: _____
 VASI total modificado: _____

c) Examen con lámpara de Wood: Sí No
 Superficie corporal afectada: _____ %
 Grado: I. 1-25% II. 26-50% III. 51-75% IV. 76-100%

Lesión diana. Loc.: _____ Tamaño: _____ cm Bordes: _____ Aspecto*: _____ puntos
 Vida score (*vitiligo disease activity*). Vida - score: _____ puntos
 Aumento de tamaño Aparición de nuevas lesiones
 Activo en las 6 últimas semanas o menos: +4 puntos
 Activo 6 semanas - 3 meses: +3 puntos
 Activo 3 - 6 meses: +2 puntos
 Activo 6 - 12 meses: +1 punto
 Estable 1 año o más: 0 puntos
 Estable con repigmentación espontánea 1 año o más: -1 punto

Aspecto clínico*: No. Abstracción terapéutica
 Bordes difusos Tricrómico Cuatricrómico Inflamatorio Bordes netos
 VETF score (*Vitiligo European Task Force*): _____

Area	% Area	Staging* Spreading* (0-4) (-1 +1)
Head and neck (0-9%)		
Trunk (0-36%)		
Arms (0-18%)		
Legs (0-36%)		
Hands and feet		
Totals (0-100%)		0-20 (-5 +5)

*largest patch in each area

h) Actividad: Episodios previos de repigmentación: Sí Espontánea Post tto: _____ No
 Lesión diana. Loc.: _____ Tamaño: _____ cm Bordes: _____
 Aspecto*: _____ Vida - score: _____ puntos
 Aumento de tamaño Aparición de nuevas lesiones
 Activo en las 6 últimas semanas o menos: +4 puntos
 Activo 6 semanas - 3 meses: +3 puntos
 Activo 3 - 6 meses: +2 puntos
 Activo 6 - 12 meses: +1 punto
 Estable 1 año o más: 0 puntos
 Estable con repigmentación espontánea 1 año o más: -1 punto

Aspecto clínico*: No. Abstracción terapéutica
 Bordes difusos Tricrómico Cuatricrómico Inflamatorio Bordes netos
 VETF score (*Vitiligo European Task Force*): _____

General recommendations: In evaluation of extent in arms and legs, but excluded separately and globally for staging and spreading (i.e. hands and feet must be staged separately globally as one area). Staging and Spreading can be assessed simultaneously using a Wood's lamp. Use largest patch in each territory.

The patient's arm including digits averages 1% of BSA (body surface area). Please draw the patches and mark the legs 10-5 % each for 20% front and back; no change in other parts.

Recommendation to assess spreading: Stage 0: normal pigmentation (no depigmentation in area graded)
 Stage 1: incomplete depigmentation (red, spotty depigmentation, inhomogeneous pigmentation. A few white hairs at this stage do not change stage grading)
 Stage 2: complete depigmentation; a few white hairs at this stage do not change stage grading
 Stage 3: partial hair whitening >50%
 Stage 4: total hair whitening >50%

Recommendation to assess spreading: First, look at patch limits using natural light. Second compare with Wood's lamp limits. Score: 1 means progressive vitiligo (ongoing subclinical depigmentation) Score: -1 means regressive vitiligo (ongoing subclinical repigmentation)

Area	% Area	Staging* Spreading* (0-4) (-1 +1)
Head and neck (0-9%)		
Trunk (0-36%)		
Arms (0-18%)		
Legs (0-36%)		
Hands and feet		
Totals (0-100%)		0-20 (-5 +5)

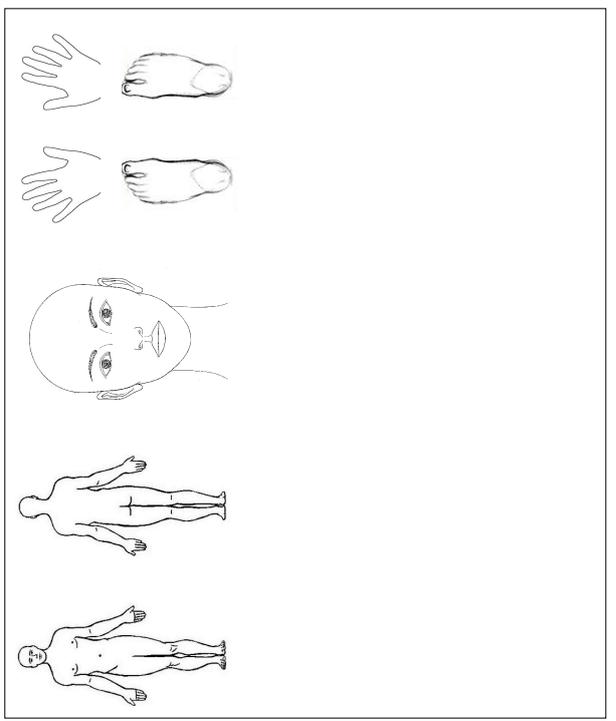
*largest patch in each area

i) Tratamiento Sí. Especificar: _____ No
 Respuesta: _____
 Tratamiento actual propuesto: Inhibidores de la calcineurina
 Sí. Especificar: Corticoides tópicos Khellina + sol
 Derivados vitamina D UVB-BE
 PUVA Corticoides orales
 Otro: _____
 No. Abstracción terapéutica

j) Pautas de tratamiento: _____
 Calidad de Vida, DLQI: _____
 k) Observaciones del investigador/incidencias: _____

Fig.26. CRD clínico páginas 3 y 4.

- d) Repigmentación
 Sí. Grado: leve (1-25%) moderada (26-50%) buena (51-75%) excelente (76-100%)
 Lesión difusa. Loc.: _____ Tamaño: _____ cm Bordes: _____ Aspecto: _____
 Superficie corporal afectada: _____ % Grado: I II III IV
 Perifolicular Marginal Difusa
 Color: Igual piel circundante Más claro Más oscuro Eritema
 No (Ninguna (0%))
 Mantenimiento de la repigmentación: Sí. Meses: _____ No
- f) Iconografía: Sí No
- g) Valoración clínica global
 Sin cambios Leve repigmentación Moderada repigmentación
 Extensa repigmentación Completa repigmentación
- h) Valoración global por el paciente:
 Sin mejoría 0 _____ 10 Resolución
- i) Satisfacción con el tratamiento /Aceptabilidad cosmética de los resultados:
 Satisfecho Insatisfecho
- j) Efectos secundarios:
 Atrofia Folliculitis Irritación Quemadura Otro: _____
- k) Calidad de Vida. DLQI: _____
- l) Observaciones del investigador/ incidencias: _____



ANEXO II. ÍNDICE DE CALIDAD DE VIDA EN DERMATOLOGÍA. DLQI

VISITA: _____ FECHA: _____

El propósito de este cuestionario es medir cuánto su problema de la piel ha afectado su vida DURANTE LA ÚLTIMA SEMANA. Marque una casilla para cada pregunta.

1. Durante la última semana, ¿cuánto le pica o qué tan sensible, adormida o con escozor ha estado su piel?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2. Durante la última semana, ¿cuán avergonzado/a o cohibido/a ha estado usted debido a su piel?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
3. Durante la última semana, ¿cuánto ha interferido su piel con que usted vaya de compras o cuide de su hogar o jardín?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
4. Durante la última semana, ¿cuánto ha influido su piel en la ropa que se pone?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
5. Durante la última semana, ¿cuánto ha afectado su piel cualquier actividad social o de esparcimiento?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
6. Durante la última semana, ¿cuánto le ha dificultado su piel hacer cualquier deporte?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
7. Durante la última semana, ¿le ha impedido su piel trabajar o estudiar?	Sí No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
Si la respuesta es "No", durante la última semana ¿cuánto problema ha significado su piel en el trabajo o para estudiar?	Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
8. Durante la última semana, ¿cuánto problema ha creado su piel con su pareja o con cualquiera de sus amigos cercanos o parientes?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
9. Durante la última semana, ¿en qué medida su problema de la piel le ha ocasionado dificultades sexuales?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>
10. Durante la última semana, ¿qué tanto problema ha significado el tratamiento de su piel, por ejemplo causando desorden en su casa o quitándole tiempo?	Muchísimo Mucho Un poco Nada en absoluto	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin importancia <input type="checkbox"/>

Revise que ha respondido a CADA pregunta. Gracias.

Fig.27. CRD páginas 5 y 6.

Para la valoración de las formas clínicas se realizó un examen clínico completo de toda la superficie corporal bajo luz natural y bajo luz de Wood adicional, especialmente en aquellos pacientes con fototipos claros, comprobando la localización de las lesiones y criterios de actividad o regresión.



Fig. 28. Utilidad de la luz de Wood en la valoración de lesiones de vitíligo.

De acuerdo con las últimas recomendaciones, los pacientes fueron inicialmente clasificados en los siguientes grupos:

1. Vitíligo no segmentario (VNS)
2. Vitíligo mixto (vitíligo no segmentario + vitíligo segmentario: VNS+VS)
3. VNS asociado a halo nevus (VNS + HN)
4. Halo nevus (HN)
5. Halo nevus asociado a vitíligo segmentario (HN+VS)
6. Halo nevus asociado a vitíligo indeterminado (HN + Vi)

Conforme con su posible etiopatogenia, los pacientes se reclasificaron en los tres grupos que se detallan a continuación:

- I. Vitíligo no segmentario, asociado o no a vitíligo segmentario y/o halo nevus, que incluye las formas clínicas 1, 2 y 3.
- II. Halo nevus, asociado o no a otras formas diferentes de vitíligo, que incluye las formas clínicas 4, 5, y 6.

III. Vitíligo no segmentario y halo nevus, constituido por la forma clínica 3.

En todos los pacientes, se utilizaron fotografías para evaluar la distribución de las lesiones, estimar la magnitud y actividad de las mismas así como clasificar el subtipo de vitíligo y comprobar la localización de los halo nevus, en su caso.

Las variables clínicas incluidas en el CRD se especifican a continuación:

1. Edad
2. Edad de inicio del vitíligo y/o halo nevus
3. Meses de evolución
4. Sexo
5. Forma clínica. Se consideraron 6 categorías, de acuerdo con las últimas recomendaciones de clasificación [Vitíligo no segmentario (VNS), Vitíligo mixto (VNS+VS), VNS asociado a halo nevus (VNS + HN), Halo nevus (HN), Halo nevus asociado a vitíligo segmentario (HN+VS), y Halo nevus asociado a vitíligo indeterminado (HN + Vi)]. Posteriormente se agruparon en dos grupos de análisis [VNS con/sin VS y HN –formas clínicas 1,2,3-; HN con/sin otras formas diferentes de vitíligo –formas clínicas 4,5, y 6-], y por resultar de especial interés, se consideró por separado el subgrupo de pacientes con VNS y HN [–forma clínica 3-].



Fig. 29. Vitíligo segmentario

6. Tipo de vitíligo no segmentario. De acuerdo con las últimas recomendaciones, los pacientes con VNS fueron clasificados en 4 tipos se-

gún su expresividad clínica: “acrofacial”, “generalizado”, “universal” y “mucoso”.



Fig. 30. Vitiligo acrofacial



Fig. 31. Vitiligo generalizado



Fig. 32. Vitiligo universal



Fig. 33. Vitiligo mucoso y periorificial/periareolar

7. Presencia de halo nevus. Se consideraron las siguientes posibilidades:
 - a. Número: “Uno” o “más de uno”.
 - b. Localización: “tronco”, “extremidades” o “cabeza y cuello”.
 - c. Presencia o no de leucotriquia.

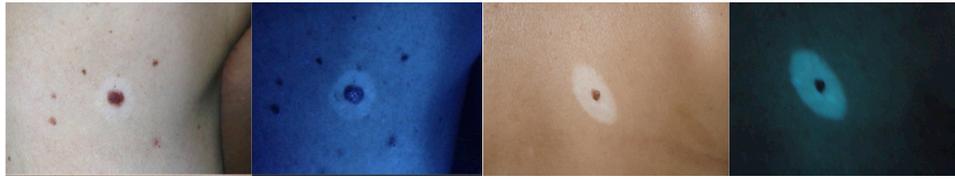


Fig. 34. HN incipiente y establecido



Fig. 35. HN regresados

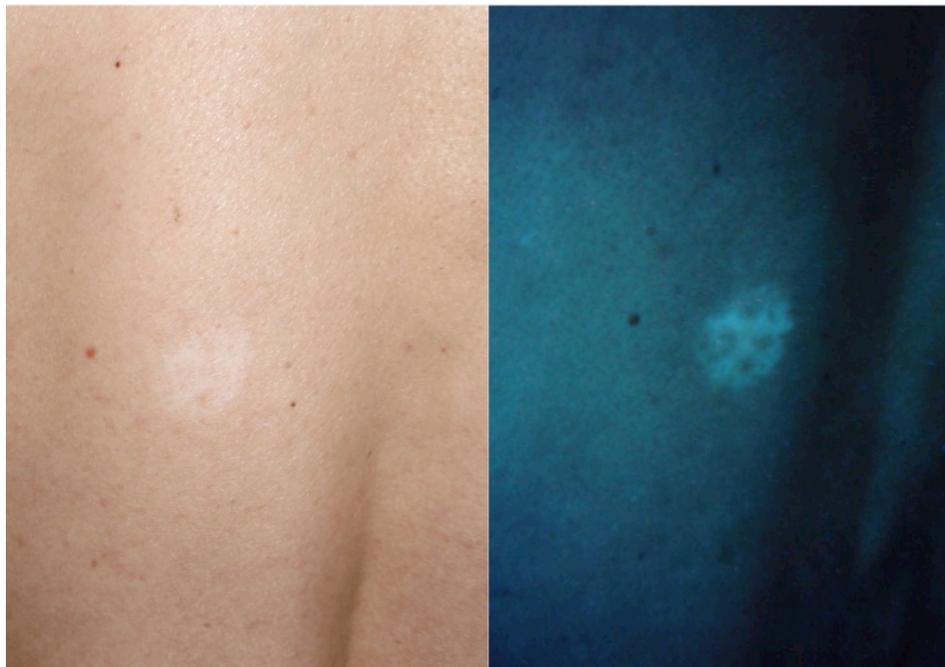


Fig. 36. HN en repigmentación



Fig. 37. Leucotriquia asociada a HN

8. Antecedentes personales: comorbilidades
 - a. Rasgos de atopia (presencia o no de rinitis, conjuntivitis, rinoconjuntivitis, asma, dermatitis o alergia de contacto.)
 - b. Enfermedades dermatológicas presumiblemente autoinmunes (presencia o no ausencia de alopecia areata, urticaria, psoriasis, lupus u “otra”).
 - c. Enfermedades autoinmunes sistémicas (presencia o ausencia de alteraciones tiroideas, Diabetes Mellitus tipo I u “otra”).
9. Antecedentes familiares de vitiligo y/o halo nevus. Se consideraron 4 categorías: “no tener antecedentes familiares”, “antecedentes familiares de primer grado”, “antecedentes familiares de segundo grado” y “antecedentes familiares lejanos”.
10. Antecedentes familiares de otras enfermedades autoinmunes cutáneas. Se consideraron 4 categorías: “no tener antecedentes familiares”, “antecedentes familiares de primer grado”, “antecedentes familiares de segundo grado” y “antecedentes familiares lejanos”.
11. Antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes sistémicas. Se consideraron 4 categorías: “no tener antecedentes familiares”, “antecedentes familiares de primer grado”, “antecedentes familiares de segundo grado” y “antecedentes familiares lejanos”.
12. Factor desencadenante. Se consideró la presencia o ausencia de “factores químicos”, “estrés” u “otro”. Por resultar de especial relevancia, se consideró de forma individualizada el Fenómeno de Koebner, clasificado en 4 grupos según su tipo clínico:
 - 0 = ausencia
 - 1 = tipo I

- 2 = tipo 2A
- 3 = tipo 2B
- 4 = Tipo 1 + 2B



Fig. 38. Fenómeno de Koebner 1



Fig. 39. Fenómeno de Koebner 2A

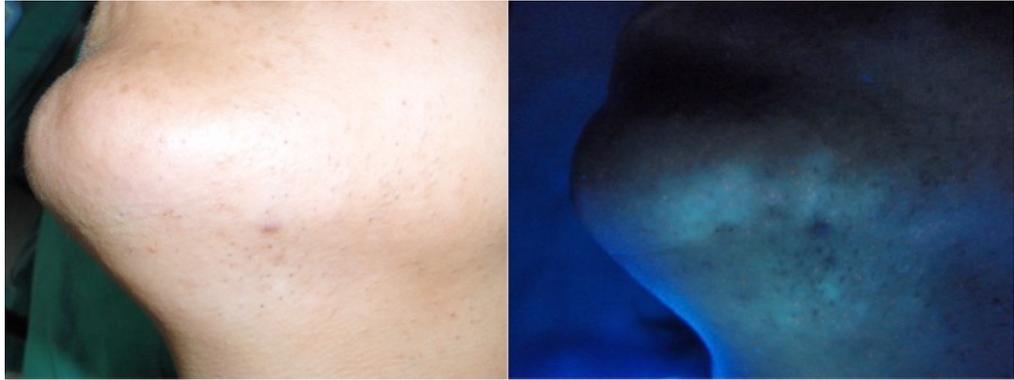


Fig. 40. Fenómeno de Koebner 2B, inducido por depilación con pinzas

13. Superficie corporal afectada. Estimada en porcentaje y estratificada en grados de severidad: leve (1-25%), moderado (26-50%), extenso (51-75%) y grave (76-100%).

14. Actividad. Se consideraron 2 índices de actividad:

VIDA: valorado por el propio paciente, con puntuaciones de -1 a 4

VETF: valorado por el clínico, considerando 2 aspectos:

Grado: de 0 a 20

Progresión: de -5 a 5

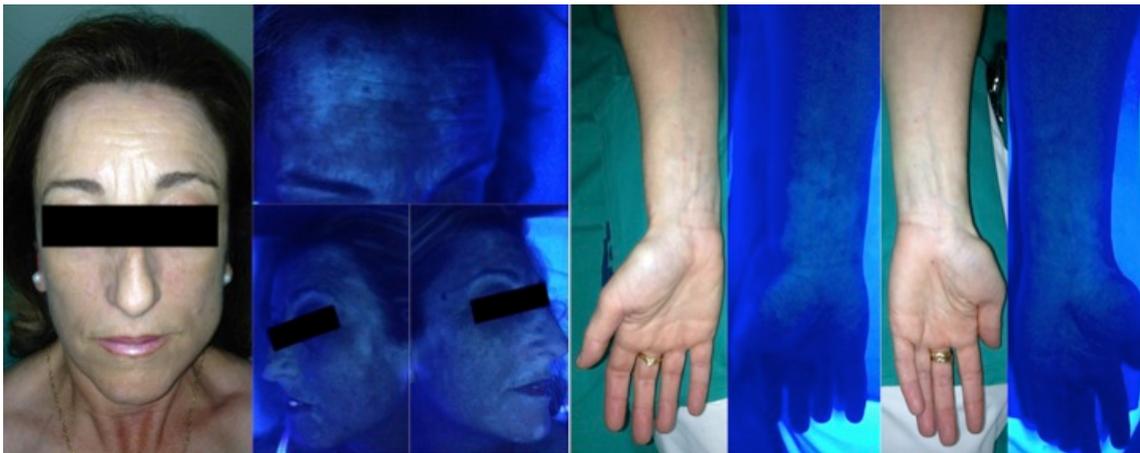


Fig. 41. Vitiligo en progresión con despigmentación parcial



Fig. 42. Vitiligo estable con despigmentación total



Fig. 43. Vitiligo en repigmentación

14. Capacidad de repigmentación. Medido según el índice VPRI (Cociente lesiones con capacidad de repigmentación / lesiones con incapacidad de repigmentación), recodificado en tres categorías:

0. Escasa capacidad de repigmentación $VPRI < 1$
1. $VPRI = 1$
2. Altas probabilidades de repigmentación $VPRI > 1$



Fig. 44. Leucotriquia y ausencia de vello: escaso potencial de repigmentación

15. Calidad de vida. Medido según índice DLQI, con puntuaciones de 0 a 30, considerándose grave afectación de la calidad de vida por encima de 10.

3. Metodología de estudio

3.1 Estudios inmunofenotípicos de sangre periférica por citometría de flujo multiparamétrica:

Los estudios inmunofenotípicos se llevaron a cabo en muestras de sangre periférica durante las primeras 24 horas tras su extracción. Se emplearon técnicas de inmunofluorescencia directa de alta resolución (8-colores) y alta sensibilidad (más de 1 millón de células analizadas), mediante marcajes óctuples (PacB / PacO / FITC / PE / PerCP-Cy5.5 / PECy7 / APC / APCH7), con las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales:

- CLA / CD27 / CD45RA / CD127 / CD8 / CD25 / CD4 / CD3
- CLA / CD27 / DR / PD1 / CD8 / TCRgd / CD4 / CD3
- CD20 / CD45 / sIgM / sIgG / CD19 / CD10 / CD27 / CD38
- CD20 / CD45 / sIgM / sIgA / CD19 / CD10 / CD27 / CD38
- HLA-DR / CD45 / CD16 / CD33 / CD3 / CD56 / CD123 / CD14

El panel de anticuerpos monoclonales permite la identificación de células T (CD3), colaboradoras (CD4) y citotóxicas (CD8), además de otros compartimentos minoritarios como células T reguladoras CD4 y CD8 (CD25⁺⁺ / CD127^{dim}), y con potencial de circulación por piel (CLA⁺: Cutaneous Lymphocyte associated antigen), células T gamma-delta (TCRgd⁺). Además, permite estudiar en detalle la maduración periférica de células T CD4 y CD8 con la identificación de los compartimentos naive (CD45RA⁺ / CD27⁺), memoria central (CD45RA⁻ / CD27⁺), memoria efectora (CD45RA⁻ / CD27⁻), y efector (CD45RA⁺ / CD27⁻). También permite evaluar la expresión en células T de marcadores de activación (CD25 o HLA-DR), inhibición (PD1: (Programmed cell death 1)), o asociados a citotoxicidad (CD16⁺ y/o CD56⁺).

El panel permite además estudiar en detalle las células B (CD19) en sangre periférica, identificando los compartimentos de células B inmaduras (CD10⁺ / CD38⁺), naive (sIgM⁺ / CD27⁻), de memoria (CD27⁺), y plasmablastos (CD27⁺⁺ / CD38⁺⁺), y la distribución de células B de memoria y plasmablastos para las inmuglobulinas IgM, IgG, e IgA.

También es posible cuantificar las células dendríticas plasmocitoides (CD123⁺ HLA-DR⁺), y mieloides (HLA-DR⁺ / CD33⁺ / CD14⁻), las células natural-killer (CD56 / CD3⁻), con sus subpoblaciones (CD56⁺⁺ y CD56⁺) y células natural killer activadas (HLA-DR⁺), basófilos (CD123⁺ / HLA-DR⁻), monocitos (CD33⁺⁺ / HLA-DR⁺), con sus tres poblaciones: “clásicos” (CD14⁺⁺CD16⁻), “intermedios” (CD14⁺⁺ CD16⁺) y “no clásicos” (CD14⁻/dim CD16⁺), y granulocitos (CD16⁺ / CD14⁻ / SSChi).

La adquisición se realizó en un citómetro FACS Canto II [BD Biosciences (BDB), San José, CA], adquiriendo en todas las muestras al menos 1 millón de células mediante el software BD FACSDiva 6.0 (BDB). El análisis de los datos se realizó mediante el programa informático Infinicyt (Cytognos, España).



Fig. 45. Citómetro FACSCanto II BD Biosciencias

Se recogió información sobre el porcentaje de cada población sobre la celularidad global de sangre periférica, y el porcentaje parcial de subpoblaciones dentro de un determinado grupo celular. Posteriormente se calcularon los números absolutos de cada población analizada mediante doble plataforma empleando para ello los datos de número de leucocitos del hemograma, que se realizó en un contador automático Sysmex Roche XE-2100.

Las poblaciones analizadas se especifican a continuación:

	% Parcial (sobre subpoblaciones)	% Total (sobre leucocitos totales)
COMBINACIÓN CLA / CD27 / CD45RA / CD127 / CD8 / CD25 / CD4 / CD3 <i>(Caracterización de LT y su maduración periférica)</i>		
LINFOCITOS T CD3+ <i>(sobre total de células)</i>		
LINFOCITOS T CD4 <i>(sobre LT CD3+)</i>		
CD3+ CD4+ <i>(sobre LT CD4)</i>		
REG CD4: CD25++ CD127+ <i>(sobre REG LT CD4)</i>		
REG CD4 CLA+		
REG CD4 CLA-		

CD4 CD127+ CD25-		
<i>(sobre CD4 CD127+ CD25-)</i>		
CD4 CD127+ CD25- CLA+		
CD4 CD127+ CD25- CLA-		
CD4 CD127-		
<u>CD3+ CD4+ (sobre LT CD4)</u>		
CD4 NAIVE: CD45RA+ CD27+		
CD4 MC: CD45RA- CD27+		
CD4 ME: CD45RA- CD27-		
CD4 ETD: CD45RA+ CD27-		
LINFOCITOS T CD8 (sobre LT)		
<u>CD3+ CD8+ (sobre LT CD8)</u>		
REG CD8: CD25++ CD127+dim		
CD8 CD127+ CD25-		
CD8 CD127+ CD25- CLA+		
CD8 CD127+ CD25- CLA+		
CD8 CD127-		
CD8 CD127- CLA+		
CD8 CD127- CLA+		
<u>CD3+ CD8+ (sobre LT CD8)</u>		
CD8 NAIVE: CD45RA+ CD27+		
CD8 MC: CD45RA- CD27+		
CD8 ME: CD45RA- CD27-		
CD8 ETD: CD45RA+ CD27-		
CD3+ CD4+ / CD8+ (sobre LT CD3+)		
CD3+ CD4- / CD8- (sobre LT CD3+)		
COMBINACIÓN CLA / CD27/ DR / PD1 / CD8 / TCRgd / CD4 / CD3 <i>(Marcadores de activación e inhibición de LT y LTgd)</i>		
LINFOCITOS T CD3+ (sobre total de células)		
CD3+ TCR gd+ (sobre LT CD3+)		
LINFOCITOS T CD4 (sobre LT CD3+)		
<u>CD3+ CD4+ CLA+ (sobre LT CD4+)</u>		
CD3+ CD4+ CLA+ DR+		
CD3+ CD4+ CLA+ DR-		
CD3+ CD4+ CLA+ PD1+		
<u>CD3+ CD4+ CLA- (sobre LT CD4+)</u>		
CD3+ CD4+ CLA- DR+		
CD3+ CD4+ CLA- DR-		
CD3+ CD4+ CLA- PD1+		

LINFOCITOS T CD8 (<i>sobre LT CD3+</i>)		
CD3+ CD8+ CLA+ (<i>sobre LT CD8+</i>)		
CD3+ CD8+ CLA+ DR+		
CD3+ CD8+ CLA+ DR-		
CD3+ CD8+ CLA+ PD1+		
CD3+ CD8+ CLA- (<i>sobre LT CD8+</i>)		
CD3+ CD8+ CLA- DR+		
CD3+ CD8+ CLA- DR-		
CD3+ CD8+ CLA- PD1+		
COMBINACIONES		
CD20 / CD45 / sIgM / sIgG / CD19 / CD10 / CD27 / CD38		
CD20 / CD45 / sIgM / sIgA / CD19 / CD10 / CD27 / CD38		
<i>(Caracterización de LB)</i>		
LINFOCITOS B (<i>sobre total de células</i>)		
<i>sobre Linfocitos B:</i>		
INMADUROS CD10+ CD38+		
NAIVE CD27- sIgM+		
MEMORIA CD27+		
<i>Sobre LB de memoria:</i>		
sIgM		
sIgG		
sIgA		
PLASMOCITOS CD27++ CD38++		
<i>Sobre plasmocitos:</i>		
sIgM		
sIgG		
sIgA		
COMBINACIÓN		
HLA-DR /CD45/CD16 /CD33 /CD3 /CD56 /CD123 /CD14		
<i>(Caracterización del resto de poblaciones mieloides, células dendríticas y NK)</i>		
<i>Sobre células totales:</i>		
GRANULO (SSC, 33+ DR- 16+ 14-)		
BASOFILOS (CD123+ DR-)		
Eosinófilos (SSC y AF)		
Linfocitos T CD3+		
<i>Sobre Linfocitos T CD3+:</i>		
CD3+ CD16+		
CD3+ CD16-		
NK (CD56+ CD3-)		
<i>Sobre células NK:</i>		
NK precurs (CD56++ CD16-)		
NK mad (CD56+ CD16+)		

(sobre células NK) NK HLADR+		
CD PLM (CD123++ DR++)		
CD MIEL (DR+ / CD33+ / CD14-)		
MONOCITOS (HLA-DR+ CD33++)		
(sobre monocitos)		
CLASICOS (CD14++ CD16-)		
INTERMEDIOS (CD14++ CD16+)		
NO CLASICOS (CD14-/ + CD16++)		

Tabla.9. Plantilla de recogida de datos analíticos

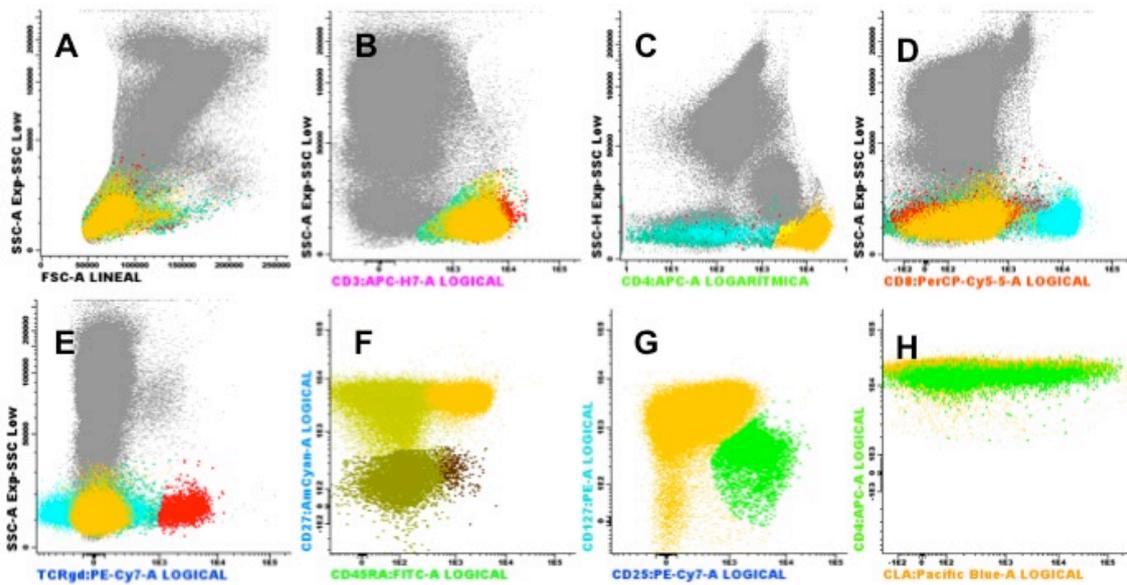


Figura 46: Plots representivos de algunas de las poblaciones analizadas en sangre periférica. Paneles A, B, C, D y E: Celularidad total, con LTCD3 en amarillo (paneles A y B) y LT TCR GD en rojo (paneles A, B y E). LT CD4+ en amarillo y LTCD8+ en azul (paneles C y D). Panel F: Poblaciones según grado de maduración periférica sobre LT CD4+ (naive: amarillas; memoria central: verde claro; memoria efectora: verde oscuro; y efectoras: marrón). Panel G: LT reguladores (verde). Panel H: Expresión de CLA en los LTCD4 representados en el panel G.

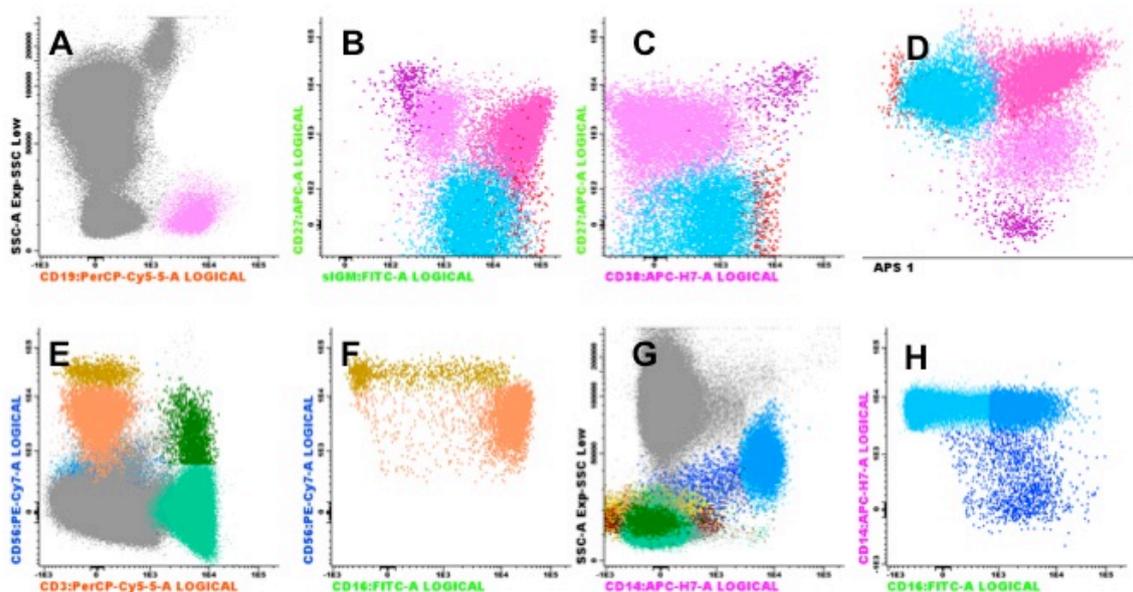


Figura Y: Plots representativos de algunas de las poblaciones analizadas en sangre periférica. Paneles A, B, C, D y E: Compartimento B de sangre periférica: LB inmaduros (rojo), LB naive (azul); LB de memoria (rosa claro y oscuro) y Linfoplasmablastos (morado). Panel E: Células NK (naranja y ocre) y LT CD3 y T-NK (verde claro y oscuro). Panel F: Células NK inmaduras (ocre) y maduras (naranja). Paneles G y H: Monocitos clásicos (azul claro), intermedios (azul medio) y no clásicos (azul oscuro).

3.2. Aislamiento de poblaciones celulares y almacenamiento de sueros

Una vez realizado el estudio inmunofenotípico, la muestra restante se procesó para separar diferentes subpoblaciones mediante un separador celular. Se aislaron las poblaciones de Linfocitos CD4, Linfocitos CD8, Linfocitos T gd, Linfocitos T reguladores, y neutrófilos. Para la realización del “sorting”, las muestras se separaron inicialmente por gradiente de densidad (Ficoll), obteniéndose por separado células mononucleares y neutrófilos. La capa mononuclear se marcó inmediatamente con técnicas de inmunofluorescencia mediante marcajes cuádruples (TCR-GD-FITC / CD4-PE / CD8-PerCP-Cy5.5 / CD3-APC), y las muestras se adquirieron en un citómetro separador celular FACS Aria III (Becton Dickinson Biosciences), empleando para el programa informático FACSDiva. Antes de la separación, se adquirieron 3000 células para definir las ventanas (“gates”) y la estrategia de adquisición. Se confirmó la pureza de cada población mediante la adquisición posterior de una pequeña muestra de cada población separada. Las distintas poblaciones celulares se congelaron en RTL plus y están almacenadas para realizar estudios genómicos cuando se disponga de los fondos necesarios.

Los sueros de los pacientes y de los controles se almacenaron congelados a -80°C , para realizar estudios posteriores de cuantificación de citocinas, cuando se disponga de los fondos necesarios.

4. Estudio estadístico:

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo utilizando el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 20.0 (IBM, Chicago, Illinois, EEUU). En todos los casos se ha comprobado la normalidad de las variables con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas fueron expresadas con medidas de tendencia central como la media y la mediana y rango intercuartil, según las características de la variable (al ser una muestra pequeña y la mayoría de las variables con una distribución asimétrica) y medidas de dispersión como la desviación estándar. Por su parte, las variables cualitativas fueron expresadas como número y porcentaje en los diferentes grupos.

Para analizar la asociación entre las variables cualitativas se utilizó el Test Chi cuadrado y test exacto de Fischer. La comparación de medias entre dos grupos se estudió con la prueba t de Student o U de Mann Whitney y en el caso de que el número de grupos fuera mayor, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post hoc Least significant difference (LSD) o test de Kruskal-Wallis. Para analizar la relación entre dos variables cuantitativas se utilizó la Correlación de Spearman.

En todos los casos, para los contrastes de hipótesis se fijó un riesgo alfa de 0,05 como límite de significación estadística.

IV. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

1.1 Variables demográficas (edad y sexo)

La media de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de 44 años \pm 18 DE (intervalo: 16-84 años), no existiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. Tampoco existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución por sexos entre ambos grupos, aunque en la muestra de pacientes hay una mayor proporción de hombres que en el grupo control.

TABLA 10. Edad y sexo de la muestra global

	Vitiligo n=43	Control n=10	p-valor
Edad*	44 \pm 18 43 (29-55)	40 \pm 17 40 (27-46)	0.56
Sexo			
Hombre	24 (56%)	4(40%)	0.48
Mujer	19 (44%)	6 (60%)	

* Valores expresados en Media \pm Desviación estándar, Mediana, y Rango intercuartil

1.2. Variables clínicas

1.2.1. Formas clínicas

De acuerdo con las últimas recomendaciones internacionales, se clasificaron los pacientes en 6 grupos (Tabla 11) y, a efectos estadísticos, se fusionaron en dos grupos de análisis, de acuerdo con su posible diferente etiopatogenia.

TABLA 11. Formas clínicas de los pacientes con Vitíligo y/o halo nevus

Vitíligo y/o Halo Nevus n=43		N (%)
Forma clínica		
	VNS	24 (57)
	Vitíligo Mixto (VNS+VS)	1 (2)
	VNS+HN	5 (12)
	HN	9 (21)
	VS+HN	2 (4)
	Vitíligo indeterminado+HN	2 (4)
Formas clínicas dicotómicas		
	Vitíligo No Segmentario	30 (69,8)
	Otros vitíligos y Halo nevus	13 (30,2)

VNS: Vitíligo No Segmentario. VS: Vitíligo Segmentario. HN: Halo Nevus.

Respecto a la edad (Tabla 12), en el momento de la realización del presente estudio, los pacientes con vitíligo no segmentario tenían una edad significativamente inferior que los pacientes con halo nevus y otros vitíligos (media \pm DE de 49 ± 19 y 32 ± 9 años, respectivamente; $p=0.01$). Como cabía esperar, también la edad de inicio fue significativamente mayor en los pacientes con vitíligo no segmentario que en los casos de halo nevus asociados o no a otras formas de vitíligo (media \pm DE de 32 ± 21 vs 17 ± 11 años, respectivamente; $p=0.02$). Aunque la distribución por sexos era diferente en ambos grupos (Tabla 12), con predominio del sexo masculino en los caso de vitíligo no segmentario y de sexo femenino en el grupo de halo nevus y/u otros vitíligos, las diferencias no alcanzaban la significación estadística, posiblemente debido el tamaño de la serie. Cabe señalar, que el tiempo de seguimiento hasta el presente estudio (variable: “Meses de evolución”) era similar en ambos grupos.

TABLA 12. Datos demográficos y tiempo de evolución de las formas clínicas

	Vitílago No Segmentario n=30	Otros Vitílagos y HN n=13	p-valor
Edad*	49±19 47 (35-61)	32±9 30 (25-40)	0.001
Edad de inicio*	32±21 30 (15-45)	17±11 19 (7-24)	0.02
Meses de evolución*	205±218 132 (8-378)	136±127 48 (24-276)	0.61
Sexo			0.18
Hombre	19 (63%)	5 (38%)	
Mujer	11 (37%)	8 (62%)	

* Valores expresados en Media ± Desviación estándar, Mediana, y Rango intercuartil

1.2.2. Tipos clínicos de vitílago no segmentario y afectación mucosa

La mayoría de los pacientes con vitílago no segmentario presentan una distribución acrofacial y afectación mucosa, preferentemente orogenital (Tabla 13).

TABLA 13. Características de los pacientes con Vitílago no segmentario (n=30)

	N (%)
Vitílago no segmentario	
Acrofacial	16 (53)
Generalizado	12 (40)
Universal	2 (7)
Afectación mucosa (VNS)	
No	14 (47)
Genital-perianal	4 (13)
Orogenital-perianal	12 (40)

1.2.3. Fototipo y desencadenantes según formas clínicas

La mayoría de los pacientes con VNS pertenecían al fototipo III (60%) de Fitzpatrick, mientras que en el caso de los pacientes con HN y/u otras formas de vitíligo era más frecuente el fototipo II (62%), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. (Tabla 14).

No se objetivó ningún desencadenante en la mayoría de los pacientes, a excepción del estrés en 2 pacientes con VNS (Tabla 14). Respecto al fenómeno de Koebner, todos los pacientes con VNS presentaban algún grado de afectación, siendo lo más frecuente (83%) del tipo 2A, propio de la localización de las lesiones en áreas de presión/fricción o relacionado con ropa u accesorios (ver fig. . en pag.). Ninguno de los pacientes con HN presentaba fenómeno de Koebner, y sólo se detectó en dos pacientes con vitíligo indeterminado asociado, y que correspondían en ambos casos con áreas hipopigmentadas focales sobre espinas vertebrales lumbares, sometidas a presión (Tabla 14).

TABLA 14. Características de las formas clínicas

	Vitíligo No Segmentario n=30	Otros Vitíligos y HN n=13	p-valor
Fototipo			0,18
II	10 (33%)	8 (62%)	
III	18 (60%)	5(38%)	
IV	2 (7%)	0 (-)	
Desencadenante			1
No	28 (93%)	13 (100%)	
Estrés	2 (7%)	0 (-)	
Fenomeno de Koebner			<0,01
No	0 (-)	11 (85%)	
I	0 (-)	1 (8%)	
II(2A)	25 (83%)	1 (8%)	
III(2B)	4 (13%)	0 (-)	
IV(1+2B)	1 (3%)	0 (-)	

1.2.4. Grados de afectación según formas clínicas

Los grados de afectación se analizaron en el grupo de VNS (n=30) y en el grupo de “otros vitíligos” (n=4), dado que no eran aplicables a los casos con HN aislados. En la Tabla 15 se muestran los grados de afectación, de acuerdo con diferentes escalas, en ambos grupos de pacientes. Acorde con lo esperado, las variables referidas a la superficie corporal afectada eran mayores en el grupo de VNS (Tabla 15).

Respecto a la estabilidad de la enfermedad, también según lo esperado, la mayoría de los pacientes presentaban estabilidad clínica, evaluada según VETF (Tabla 15), juntamente con una elevada capacidad de repigmentación medida según el índice VPRI.

TABLA 15. Grados de afectación según grupos clínicos

	Vitiligo No Segmentario n=30	Otros vitíligos (n=4)
Superficie corporal afectada (%)*	15 ± 23 5 (2-26)	2 ± 1 2 (1-3)
Superficie corporal afectada por grados		
<i>Leve 1-25%</i>	22 (73%)	4 (100%)
<i>Moderado 26-50%</i>	6 (20%)	0 (-)
<i>Grave 76-100%</i>	2 (7%)	0 (-)
Grado de despigmentación según VETF*	6 ± 4 5 (3,0-0,25)	1,5 ± 1 1 (1,00-0,50)
Progresión según VETF		
0		
1	20 (66%)	4 (100%)
2	5 (7%)	0 (-)
	5 (7%)	0 (-)
Vitiligo Potential Repigmentation Index		
<i>Menor de 1</i>	8 (27%)	1 (25%)
<i>Igual a 1</i>	3 (10%)	1 (25%)
<i>Mayor de 1</i>	19 (63%)	2 (50%)

* Valores expresados en Media±Desviación estándar, Mediana, y Rango intercuartil

Sin embargo, el índice VIDA, que estima la actividad de la enfermedad de forma subjetiva, muestra que la mayoría (66%) de los pacientes con VNS refieren algún grado de actividad, al contrario que en el grupo de HN, en el que la mayoría (77%) refiere estabilidad (Tabla 16).

Respecto a la calidad de vida medida según el índice DLQI, la mayoría de pacientes (70% de VNS y 100% de HN y/u otras formas de vitíligo) mostraban puntuaciones mínimas (nula o mínima afectación de la calidad de vida), variando de un mínimo de 0 a un máximo de 9 en los pacientes con VNS (Tabla 16).

TABLA 16. Índices VIDA y DLQI según grupos clínicos

	Vitíligo No Segmentario (n=30)	Otros vitíligos y HN (n=13)	p-valor
Vitiligo Disease Activity			0.010
<i>Repigment. espontánea</i>	4 (14%)	0 (-)	
<i>Estable por 1 año</i>	6 (20%)	10 (77%)	
<i>Activo en el último año</i>	6 (20%)	3 (23%)	
<i>Activo por 6 meses</i>	7 (23%)	0 (-)	
<i>Activo por 3 meses</i>	4 (14%)	0 (-)	
<i>Activo por 6 semanas</i>	2 (7%)	0 (-)	
Dermatology Life Quality Index			0.027
0	13 (50%)	12 (92%)	
1	8 (3%)	1 (8%)	
3	1 (4%)		
4	2 (8%)		
6	1 (4%)		
9	1 (4%)		

1.2.5. Caracterización de Halo Nevus

El grado de afectación en halo nevus se evaluó de acuerdo con el número de halo nevus encontrados, su localización y la presencia o no de leucotriquia, que supone un daño más difuso de los melanocitos. Se detectó presencia de HN en un total de 18 pacientes, sin datos de vitíligo (n=9), asociado a vitíligo no segmentario (n=5), o a otras formas de vitíligo (n=4). La mayoría de los pacientes presentaban 3 o más lesiones, con localización preferente en el tronco y sólo 2 de ellos mostraban leucotriquia, ambos del grupo de halo nevus asociado o no a otras formas de vitíligo no segmentario.

TABLA 17 . Caracterización de los halo nevus

Vitiligo y/o Halo Nevus n=18		n (%)
Número (HN)	1	4 (22)
	2	3 (16,7)
	3	5 (28)
	4	3 (16,7)
	>=5	3 (16,7)
Localización (HN)	Tronco	14 (78)
	Cabeza-cuello y tronco	3 (16)
	Tronco y extremidades	1 (6)
Leucotriquia (HN)	No	16 (89)
	Si	2 (11)

1.2.6. Antecedentes personales y familiares

No se encontraron diferencias en los antecedentes personales entre los grupos de VNS y HN, asociados o no a otros tipos de vitiligo (Tabla 18), ni en lo que se refiere a atopía u otras enfermedades cutáneas, ni en lo que se refiere a enfermedades sistémicas de origen inmune (Tabla18).

Respecto a los antecedentes familiares, la mitad (53%) de los pacientes con VNS tenían antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes cutáneas, que ocurrían con menos frecuencia (23%) en los pacientes con HN asociados o no a otras formas de vitiligo, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Los antecedentes más frecuentes fueron vitiligo (47%, de los cuales 12% (n=4) eran familiares de primer grado), vitiligo y psoriasis (3%) y vitiligo y halo nevus (3%). En cuanto a los antecedentes familiares de enfermedades sistémicas autoinmunes, ambos grupos de pacientes tenían antecedentes aproximadamente en un tercio de los casos, aunque tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 18).

TABLA 18. Antecedentes personales y familiares

	Vitílago No Segmentario	Otros Vitílagos y HN	p-valor
	n=30	n=13	
	n(%)	n(%)	
Atopia			0.98
No	23 (77%)	10 (77%)	
Si	7 (23%)	3 (23%)	
<i>Tipos</i>			
<i>Ninguno</i>	23 (77%)	10 (77%)	
<i>Rinitis</i>	4 (14%)	2 (15%)	
<i>Conjuntivitis</i>	1 (3%)	0	
<i>Rinoconjuntivitis</i>	1 (3%)	0	
<i>Asma</i>	1 (3%)	0	
<i>Contacto</i>	0	1 (8%)	
Otras enf. cutáneas			0.81
No	27 (90%)	12 (92%)	
Si	3 (10%)	1 (8%)	
<i>Tipos de enf. cutáneas</i>			
<i>Ninguna</i>	27 (90%)	12 (92%)	
<i>Alopecia areata</i>	0	1 (8%)	
<i>Urticaria</i>	1 (3,3%)	0	
<i>Urticaria y psoriasis</i>	1 (3,3%)	0	
<i>Otra</i>	1 (3,3%)	0	
Enf. sistémicas			0.69
No	23 (77%)	11 (85%)	
Si	7 (23%)	2 (15%)	
<i>Tipos de enf. sistémicas</i>			0.30
<i>Ninguna</i>	23 (77%)	11 (85%)	
<i>Hipotiroidismo</i>	6 (20%)	1 (8%)	
<i>Diabetes Mellitus I</i>	1 (3%)	0 (0%)	
<i>Otra</i>	0 (0%)	1 (8%)	
AF cutáneos			0.09
No	14 (47%)	10 (77%)	
Si	16 (53%)	3 (23%)	
<i>Tipos de AF cutáneos</i>			
<i>Ninguno</i>	14 (47%)	10 (77%)	
<i>Vitílago</i>	14 (47%)	1 (7,7%)	
<i>Halo nevus</i>	0	1 (7,7%)	
<i>Psoriasis</i>	0	1 (7,7%)	
<i>Vitílago y Halo nevus</i>	1 (3%)	0	
<i>Vitílago y psoriasis</i>	1 (3%)	0	
AF enfermedades sistémicas			0.72
No	21 (70%)	10 (77%)	
Si	9 (30%)	3 (23%)	

<i>Tipos de AF de enf. Sistémicas</i>			0.34
<i>No AF</i>	21 (70%)	10 (77%)	
<i>Hipotiroidismo</i>	8 (27%)	2 (15%)	
<i>Diabetes Mellitus I</i>	0 (0%)	1 (8%)	
<i>Lupus Eritematoso Sistémico</i>	1 (3%)	0 (0%)	

AF: Antecedentes familiares. HN: Halo Nevus

1.2.7. Tratamiento

Como cabía esperar, los pacientes con VNS demandaron tratamiento con más frecuencia que los pacientes con HN, conforme con la superficie corporal afectada en cada caso, y con una consecuente mayor repercusión sobre la calidad de vida.

Así, una vez incluidos en el estudio y realizada la extracción de sangre, recibieron tratamiento el 45% de los pacientes con VNS y ninguno de los pacientes con HN y /u otras formas de vitiligo.

El tratamiento siempre fue tópico, con Tacrolimus en todos los casos excepto en uno, en que fue necesario tratamiento con UVB de banda estrecha, con escasa repercusión sobre los índices de severidad.

TABLA 19. Tratamientos según grupos clínicos

	Vitiligo No Segmentario n=30	Otros Vitiligos y HN n=13	p-valor
No tratamiento	15 (52%)	13 (100%)	0.009
Tacrólimus tópico	13 (45%)	0	
UVB	1 (3%)	0	

1.3. Variables analíticas de autoinmunidad

Se realizó estudio tiroideo y de autoinmunidad (Tabla 20) a todos los pacientes en el momento de entrar en el estudio, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

TABLA 20. Datos analíticos según grupos clínicos (I)

	Vitíligo No Segmentario n=30	Otros Vitíligos y HN n=13	p- valor
aTG*	44±71 21 (16 -43)	30±26 21 (18-29)	0,95
aPOT*	35±61 13 (8-35)	17±12 16 (8-23)	0,96
TSH*	2,3±1,6 1,7 (1,4-3,0)	1,8±0,7 1,5 (1,4-2,5)	0,69
T4*	1,1±0,04 1,1 (1,1-1,3)	1,4±0,7 1,2 (0,9-1,3)	0,83
ANA			
Negativo	25 (96%)	9 (82%)	0,20
Positivo	1 (4%)	2 (18%)	

* Valores expresados en Media±Desviación estándar, Mediana, y Rango intercuartil
aTG: anti-Tiroglobulina (0 -115 UI/ml). aPOT: anti-peroxidasa tiroidea (0 - 34 UI/ml). TSH:
Hormona estimulante del tiroides (0,27 - 4,2µU/ml). T4: Tiroxina 4 (0,88 -1,7 ng/dl). ANA:
Anticuerpos anti nucleares.

Empleando como referencia los valores normales de las variables de autoinmunidad estudiadas (Tabla 21), como cabía esperar, los pacientes con VNS presentaban con más frecuencia valores anormales, presentando elevación de los títulos de anti-peroxidasa tiroidea (n=6), de los niveles de anticuerpos anti-tiroglobulina (n=1) y de las cifras de TSH (n=2), en rango subclínico, y no coincidentes con las alteraciones en los títulos de anticuerpos. En el grupo de HN y otros vitíligos, sólo 1 caso presentaba elevación de los títulos de anti-peroxidasa tiroidea, con el resto de las determinaciones dentro de la normalidad.

TABLA 21. Datos analíticos según grupos clínicos (II)

		Vitíligo No Segmentario n=30	Otros Vitíligos y HN n=13	p-valor
aTG	Normal (<115)	95%	100%	0,44
	Elevado (>115)	5%	0%	
aPOT	Normal (<34)	76%	92%	0,26
	Elevado (>34)	24%	8%	
TSH	Normal (0,27-4,2)	93%	100%	0,36
	Elevado (>4,2)	7%	0%	
T4			1	
	Normal (0,4-1,9)	100%	100%	
	Elevado (>1,9)	0%	0%	

aTG: anti-Tiroglobulina (0 -115 UI/ml). aPOT: anti-peroxidasa tiroidea (0 - 34 UI//ml). TSH: Hormona estimulante del tiroides (0,27 - 4,2 μ U/ml). T4: Tiroxina 4 (0,88 -1,7 ng/dl).

2. RESULTADOS POR OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO 1:

Caracterizar, mediante citometría de flujo de alta densidad, las poblaciones celulares implicadas en el sistema inmune (células B, T, NK, dendríticas y mieloides) presentes en la sangre en pacientes con vitíligo y/o halo nevus y comparar su perfil de expresión inmunofenotípico con el de individuos normales.

2.1.1. Casos totales frente a controles

En primer lugar, se compararon los resultados del total de pacientes con vitíligo y/o halo nevus (n=43) con el grupo control de sujetos sanos (n=10), que mostró algunas diferencias en las poblaciones analizadas en sangre periférica (Tabla 22).

El recuento total de leucocitos en sangre periférica era significativamente menor en el grupo problema que en control (media \pm DE de $5,90 \pm 1,53 \times 10^9/L$ vs $7,44 \pm 1,25 \times 10^9/L$; $p=0,004$), fundamentalmente debido a un menor número absoluto de linfocitos T CD3+ ($p=0,02$) y de granulocitos ($p=0,01$).

Respecto a las poblaciones mayoritarias de linfocitos T, el grupo problema mostraba un descenso de números absolutos de LTCD3 respecto al control ($1178,6 \pm 506,0$ vs $1503,2 \pm 383,4$ cels/ μ L; $p=0,02$), a expensas tanto de LTCD4 ($668,1 \pm 348,4$ vs $838,9 \pm 177,9$ cels/ μ L; $p=0,015$) como de LTCD8 ($424,8 \pm 195,3$ vs $569,7 \pm 218,3$ cels/ μ L; $p=0,048$).

Cuando se analizan las subpoblaciones de LTCD4 y CD8 de acuerdo a su maduración periférica (LT naive, LT de memoria central, LT de memoria efectora y LT efectores), sólo se aprecian diferencias en el compartimento de LT naive, que están disminuidos en números absolutos en el grupo problema tanto en los LT cooperadores CD4+ ($238,05 \pm 208,77$ vs $315,17 \pm 76,77$ cels/ μ L; $p=0,07$), como en los LT supresores CD8+ ($106,36 \pm 88,25$ vs $155,64 \pm 56,22$ cels/ μ L; $p=0,044$), en los que las diferencias alcanzan significación estadística. No se observaron cambios en el resto de las subpoblaciones analizadas (memoria central, memoria efectora o efector), ni cuando se consideraron en números absolutos en sangre periférica, ni cuando se consideraron en números relativos respecto a la celularidad global de la sangre periférica (% total) ni respecto a cada una de las subpoblaciones mayoritarias de LTCD4+ o LTCD8+ (% parcial).

Como se ha comentado previamente, los LT reguladores parecen tener un importante papel en la patogenia del vitíligo. En nuestra serie, hemos encontrado que los pacientes con vitíligo y/o halo nevus tienen un menor número absoluto de LTCD4reg (CD25++ CD127+dim) que el grupo control ($45,77 \pm 26,66$ vs $55,83 \pm 13,10$ cels/ μ L; $p=0,053$). No encontramos diferencias respecto a la población de LTCD8+CD25++ CD127+dim, que aunque es mucho menos conocida, también se le han atribuido funciones reguladoras.

Respecto a las poblaciones de LT no reguladores que se pueden definir en base a la expresión de CD127 (receptor de IL7), encontramos que los pacientes tenían menos

números absolutos que los controles sanos tanto de LTCD4+ CD127+ (601,81±326,59 vs 764,47±174,17 cels/ μ L; p=0,018) como de LT CD8+CD127+ (280,14±145,89 vs 373,80±130,22 cels/ μ L; p=0,020). Esto no se asociaba con diferencias ni en números absolutos ni en relativos de las poblaciones de LTCD4 ni CD8 CD127-, poblaciones celulares que se han relacionado con situaciones de activación linfocitaria.

Existen otras subpoblaciones de linfocitos T que están mucho menos representadas en la sangre periférica, como los LT RCT gamma-delta, o los LT que coexpresan CD4 y CD8, y en nuestra serie no encontramos ninguna diferencia entre el grupo de pacientes y el grupo control, ni en números absolutos ni relativos. Otra población minoritaria de LT, de funciones menos conocidas, que expresa CD3 en ausencia de CD4, CD8 o RCT gamma-delta, estaba significativamente disminuida en el grupo de pacientes respecto a los controles, tanto en números relativos como absolutos (5,28±4,59 vs 12,51±9,98 cels/ μ L; p=0,008).

En cuanto a los linfocitos T que expresan el antígeno CLA (Cutaneous Lymphocyte associated antigen), relacionado con la migración a piel de los LT, únicamente encontramos un aumento en números relativos tanto de los LTCD4CLA+ (porcentaje sobre el total de LTCD4+ de 20,20±8,54% vs 12,28±2,34%; p=0,003) como de los LTCD8CLA+ (porcentaje sobre el total de LTCD8+ de 9,76±5,81% vs 5,97±2,94%; p=0,043), sin que se detectaran diferencias en números absolutos. Aunque se detectaron algunas diferencias que alcanzaban la significación estadísticas en números relativos en los linfocitos T con afinidad por la piel (CLA+) que tenían otros marcadores que los identificaban como LTreg (CD4+CD25++CD127+dim), que expresaban marcadores de activación (HLA-DR+) o de inhibición (PD1+: Programmed cell death 1), estas diferencias no se mantenían cuando se consideraban números absolutos, y en cualquier caso los porcentajes, aunque con diferencia estadística, eran bastante similares y estaban representados en frecuencias muy bajas, por lo que estos resultados deben interpretarse con cautela.

Tanto el grupo de pacientes con vitíligo y/o halo nevus como el grupo de controles sanos tenían niveles similares de LB en sangre periférica. Con respecto al estudio de las diferentes subpoblaciones que se pueden identificar dentro del compartimento de

células B de la sangre periférica, únicamente encontramos diferencias cercanas a la significación estadística en el caso de los LB de memoria (CD27+), que estaban disminuidos en el grupo de problema ($35,46 \pm 20,35$ vs $58,34 \pm 36,67$ cels/ μ L; $p=0,078$), probablemente en relación con la existencia de un menor número de LB de memoria que expresan IgG ($6,63 \pm 5,61$ vs $15,32 \pm 12,96$ cels/ μ L; $p=0,018$). No encontramos diferencias en otras poblaciones B analizadas, como LB inmaduros (CD10+CD38+), LB naive (CD27-sIgM+), LB de memoria que expresan sIgM o sIgA, o linfoplasmodios. Se encontraron diferencias que alcanzaban la significación estadística en los linfoplasmodios que expresan sIgM, aunque sólo cuando se analizaban en números relativos, y también en este caso su representación era extremadamente baja, por lo que pensamos que estos resultados carecen de significado real.

No encontramos diferencias significativas entre el grupo problema y en control en el total de células NK, ni en las dos subpoblaciones que se pueden detectar en base a la intensidad de expresión de CD56 (CD56++ y CD56+), que tienen diferentes funciones y se pueden considerar como dos estadios madurativos diferentes. Sin embargo, cuando analizamos la expresión del antígeno de activación HLA-DR en las células NK, encontramos que el grupo problema tenían niveles significativamente más altos que los controles tanto en números relativos como absolutos ($8,43 \pm 11,66$ vs $1,56 \pm 0,73$ cels/ μ L; $p < 0,001$).

Con respecto al estudio de otras poblaciones presentes en sangre periférica en baja frecuencia, encontramos un descenso al límite de la significación estadística de los LTCD3CD56+, también conocidos como células T-NK, en los casos problema vs controles, ($111,16 \pm 134,32$ vs $310,71 \pm 561,82$ cels/ μ ; $p=0,080$). También las células dendríticas plasmocitoides estaban disminuidas significativamente en los pacientes ($6,78 \pm 4,10$ vs $13,10 \pm 6,23$ cels/ μ L; $p=0,003$).

La población monocitaria estaba disminuida en los pacientes de la serie ($307,34 \pm 146,13$ vs $400,46 \pm 124,57$; $p=0,043$), y el análisis pormenorizado del compartimento monocitoide de la sangre periférica reveló que esta disminución se producía a expensas de los monocitos clásicos ($219,42 \pm 101,87$ vs $309,37 \pm 94,82$ cels/ μ L; $p=0,018$), sin que

se detectasen diferencias en otros tipos de monocitos habitualmente menos representados, como los monocitos intermedios o los no-clásicos.

Como comentamos al principio del presente apartado, también los pacientes mostraban valores inferiores de granulocitos respecto a los controles ($3942,7 \pm 1314,4$ vs $5040,4 \pm 1057,1$ cels/ μ L; $p=0,010$), sin que se hayan detectado diferencias en las poblaciones de basófilos ni eosinófilos.

Los datos completos del análisis de poblaciones se especifican en la Tabla 22.

Tabla 22. Caracterización inmunofenotípica de casos totales frente a controles

	CASOS TOTALES (n=43)	CONTROLES (n=10)		
	Media +/- DE Min - Max Mediana	Media +/- DE Min - Max Mediana	p-valor	
Leucocitos totales en hemograma	5,90 +/- 1,53 3,42 - 9,92 5,58	7,44 +/- 1,25 5,27 - 9,45 7,64	0,004*	absoluto
Poblaciones mayoritarias de LT y marcadores de maduración periférica				
LTCD3 sobre total células	1178,6 +/- 506,0 406,7 - 2499,6 1055,5	1503,2 +/- 383,4 952,0 - 2133,8 1401,5	0,022*	absoluto
	20,67 +/- 8,88 7,00 - 51,21 20,26	20,53 +/- 5,27 11,90 - 28,99 20,02	0,73	% total
LTCD4 sobre total LTCD3	668,1 +/- 348,4 235,2 - 1728,0 549,1	838,3 +/- 177,9 564,9 - 1169,1 815,1	0,015*	absoluto
	11,72 +/- 6,10 3,07 - 32,98 10,34	11,32 +/- 1,75 8,75 - 14,24 10,96	0,68	% total
	56,09 +/- 10,89 33,23 - 71,90 57,52	56,90 +/- 8,66 43,70 - 73,45 57,68	0,89	% parcial
LTCD4naive CD45 RA+CD27+	238,05 +/- 208,77 0,60 - 830,86 216,96	315,17 +/- 76,77 197,63 - 444,16 342,45	0,07	absoluto
	4,13 +/- 4,08 0,01 - 16,47 3,33	4,32 +/- 1,22 2,65 - 6,94 4,13	0,31	% total
	35,49 +/- 22,10 0,05 - 69,27 35,38	38,88 +/- 11,51 20,53 - 56,70 39,43	1,00	% parcial
LTCD4 memoria central CD45RA-CD27+	383,78 +/- 364,91 37,86 - 1660,20 302,56	416,98 +/- 178,14 239,79 - 739,72 349,92	0,19	absoluto
	6,14 +/- 5,59 0,52 - 27,67 4,45	5,53 +/- 1,86 3,78 - 9,01 4,82	0,58	% total
	47,85 +/- 22,83 10,42 - 96,10 45,14	48,11 +/- 10,19 36,74 - 66,91 44,83	0,95	% parcial

LTCD4 memoria efectora CD45RA-CD27-	93,04 +/- 76,27 16,26 - 330,81 66,00	101,43 +/- 53,72 31,01 - 208,24 94,83	0,39	absoluto
	1,48 +/- 1,26 0,30 - 6,23 1,10	1,41 +/- 0,84 0,48 - 3,16 1,24	0,76	% total
	14,21 +/- 11,60 2,31 - 55,50 13,18	12,36 +/- 6,80 4,36 - 24,58 10,55	0,91	% parcial
LTCD4 efector CD45RA+CD27-	12,32 +/- 23,17 0,00 - 98,35 2,94	5,12 +/- 6,12 0,64 - 18,93 2,56	0,95	absoluto
	0,19 +/- 0,34 0,00 - 1,44 0,04	0,07 +/- 0,08 0,01 - 0,26 0,04	0,78	% total
	2,46 +/- 4,99 0,02 - 19,51 0,43	0,65 +/- 0,78 0,05 - 2,43 0,29	0,86	% parcial
LTCD8 sobre total LTCD3	424,8 +/- 195,3 135,4 - 870,1 388,8	569,7 +/- 218,3 195,2 - 914,0 564,4	0,048*	absoluto
	7,41 +/- 3,40 2,91 - 16,83 6,60	7,93 +/- 3,58 2,44 - 13,87 7,34	0,65	% total
	36,59 +/- 9,68 23,39 - 63,71 35,11	37,09 +/- 9,64 20,55 - 53,94 37,32	0,59	% parcial
LTCD8 naive CD45RA+CD27+	106,36 +/- 88,25 0,00 - 359,99 95,01	155,64 +/- 56,22 89,57 - 264,32 153,87	0,044*	absoluto
	1,88 +/- 1,81 0,00 - 7,86 1,35	2,20 +/- 1,03 1,06 - 4,13 1,74	0,19	% total
	23,69 +/- 18,33 0,05 - 67,34 23,22	31,98 +/- 16,72 11,73 - 57,12 29,20	0,20	% parcial
LTCD8 memoria central CD45RA-CD27+	166,68 +/- 129,63 23,73 - 598,20 147,05	181,76 +/- 86,54 80,80 - 359,60 152,58	0,45	absoluto
	2,73 +/- 2,06 0,42 - 9,97 2,32	2,50 +/- 1,25 1,01 - 4,77 2,21	0,91	% total
	36,01 +/- 20,88 8,69 - 97,55 33,91	32,94 +/- 10,80 18,62 - 54,38 31,36	0,97	% parcial
LTCD8 memoria efectora CD45RA-CD27-	112,56 +/- 87,51 6,23 - 297,44 91,88	93,44 +/- 119,37 4,80 - 411,88 59,91	0,34	absoluto
	1,76 +/- 1,38 0,13 - 5,34 1,52	1,29 +/- 1,80 0,06 - 6,25 0,86	0,12	% total
	23,30 +/- 16,91 1,94 - 73,26 25,39	13,88 +/- 13,22 2,59 - 45,02 8,28	0,12	% parcial
LTCD8 efector CD45RA+CD27-	96,10 +/- 125,62 0,00 - 411,17 31,74	139,06 +/- 112,66 8,40 - 371,32 129,07	0,12	absoluto
	1,58 +/- 2,10 0,00 - 7,46 0,35	1,94 +/- 1,60 0,12 - 4,49 1,56	0,29	% total
	17,86 +/- 18,85 0,02 - 51,69 9,16	21,21 +/- 13,55 2,77 - 45,57 21,69	0,34	% parcial
Cociente CD4/CD8	1,69 +/- 0,67 0,52 - 3,07 1,61	1,71 +/- 0,79 0,81 - 3,59 1,58	0,81	

Subpoblaciones LTCD4				
LTCD4reg CD25++CD127+	45,77 +/- 26,66 10,44 - 112,80 34,00	55,83 +/- 13,10 43,20 - 81,28 52,08	0,053**	absoluto
	0,81 +/- 0,49 0,13 - 2,32 0,77	0,76 +/- 0,17 0,52 - 0,99 0,81	0,59	% total
	7,04 +/- 3,32 3,02 - 25,49 6,59	6,71 +/- 0,86 4,98 - 8,04 6,89	0,73	% parcial
LTCD4 CD25-CD127+	601,81 +/- 326,59 211,04 - 1599,60 486,47	764,47 +/- 174,17 473,77 - 1080,44 751,25	0,018*	absoluto
	10,56 +/- 5,71 2,84 - 30,18 9,71	10,30 +/- 1,73 7,89 - 13,16 9,99	0,68	% total
	89,39 +/- 5,75 61,09 - 94,61 91,15	90,86 +/- 2,67 83,82 - 93,12 91,91	0,60	% parcial
LTCD4 CD25-CD127-	20,47 +/- 18,09 3,79 - 94,25 15,56	17,98 +/- 15,88 0,66 - 45,85 12,58	0,55	absoluto
	0,35 +/- 0,29 0,07 - 1,38 0,25	0,25 +/- 0,26 0,01 - 0,87 0,17	0,14	% total
	3,57 +/- 3,59 0,85 - 17,13 2,10	2,43 +/- 2,50 0,07 - 8,14 1,64	0,20	% parcial
Subpoblaciones LTCD8				
LTCD8reg CD25++CD127+dim	0,41 +/- 0,62 0,00 - 3,23 0,00	0,57 +/- 0,82 0,00 - 2,64 0,32	0,50	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,08 0,00	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,05 0,01	0,87	% total
	0,12 +/- 0,17 0,00 - 0,78 0,06	0,15 +/- 0,19 0,02 - 0,61 0,07	0,90	% parcial
LTCD8 CD25-CD127+	280,14 +/- 145,89 37,85 - 722,35 267,08	373,80 +/- 130,22 177,60 - 596,40 368,28	0,020*	absoluto
	4,95 +/- 2,64 0,83 - 13,78 4,78	5,15 +/- 1,93 2,22 - 9,05 4,87	0,55	% total
	66,52 +/- 18,54 27,98 - 99,41 65,13	69,54 +/- 17,26 42,97 - 90,73 69,56	0,67	% parcial
LTCD8 CD127-	144,25 +/- 119,13 1,80 - 567,58 119,62	195,30 +/- 146,61 16,80 - 424,25 175,12	0,30	absoluto
	2,45 +/- 2,03 0,04 - 10,19 2,13	2,77 +/- 2,35 0,21 - 7,50 2,11	0,78	% total
	33,36 +/- 18,55 0,44 - 71,92 34,68	30,32 +/- 17,29 8,66 - 56,68 30,42	0,68	% parcial
Otras poblaciones T minoritarias				
LTCD3CD4+CD8+	80,43 +/- 55,76 15,05 - 249,56 66,77	82,70 +/- 79,52 23,72 - 281,60 47,09	0,66	absoluto
	1,45 +/- 1,08 0,24 - 5,94 1,10	1,13 +/- 1,01 0,35 - 3,43 0,58	0,28	% total

	6,86 +/- 4,03 2,22 - 19,50 5,44	5,21 +/- 3,75 1,83 - 13,20 3,96	0,17	% parcial
LTCD3CD4-CD8-	5,28 +/- 4,59 0,56 - 23,03 3,83	12,51 +/- 9,98 3,30 - 30,42 6,95	0,008*	absoluto
	0,09 +/- 0,09 0,01 - 0,57 0,07	0,16 +/- 0,11 0,05 - 0,36 0,12	0,039*	% total
	0,46 +/- 0,37 0,06 - 1,86 0,36	0,80 +/- 0,58 0,17 - 1,93 0,54	0,019*	% parcial
LTCD3 TCR gd	59,82 +/- 45,59 4,65 - 233,21 47,85	76,31 +/- 56,34 20,03 - 178,98 56,74	0,35	absoluto
	1,07 +/- 0,82 0,08 - 3,52 0,77	1,05 +/- 0,79 0,31 - 2,53 0,78	0,96	% total
	5,53 +/- 3,81 0,63 - 18,78 4,40	4,94 +/- 2,76 1,59 - 8,91 4,42	0,75	% parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición				
LTCD4CLA+	119,73 +/- 66,29 23,71 - 347,68 115,91	103,13 +/- 38,35 64,00 - 189,65 93,52	0,55	absoluto
	2,09 +/- 1,11 0,52 - 5,26 1,89	1,39 +/- 0,45 0,80 - 2,31 1,30	0,027*	% total
	20,20 +/- 8,54 6,86 - 40,86 19,19	12,28 +/- 2,34 8,97 - 16,00 12,41	0,003*	% parcial
<i>LTCD4reg</i> <i>CD25++CD127+CLA+</i>	20,25 +/- 10,89 4,02 - 53,33 19,75	20,68 +/- 4,85 13,52 - 27,29 20,48	0,47	absoluto
	0,36 +/- 0,18 0,05 - 0,75 0,34	0,29 +/- 0,08 0,16 - 0,38 0,32	0,29	% total
	46,25 +/- 13,02 23,79 - 74,77 43,43	37,04 +/- 4,94 29,21 - 43,55 36,09	0,042*	% parcial
<i>LTCD4</i> <i>CD25-CD127+CLA+</i>	95,20 +/- 50,84 17,37 - 203,51 96,12	82,58 +/- 35,78 42,88 - 166,66 79,84	0,43	absoluto
	1,68 +/- 0,96 0,27 - 4,79 1,53	1,11 - 0,41 0,67 - 2,03 1,02	0,042*	% total
	16,74 +/- 7,90 4,64 - 40,86 14,64	10,66 +/- 2,93 5,92 - 15,46 10,43	0,012*	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR+</i>	16,64 +/- 11,42 5,15 - 70,39 13,80	16,29 +/- 7,52 4,23 - 24,81 14,66	0,67	absoluto
	0,29 +/- 0,16 0,07 - 0,99 0,25	0,23 +/- 0,11 0,05 - 0,37 0,24	0,41	% total
	15,29 +/- 7,31 4,08 - 42,34 14,35	16,44 +/- 7,31 6,05 - 31,07 17,31	0,36	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR-</i>	103,10 +/- 58,96 13,68 - 277,29 98,33	86,85 +/- 34,99 51,84 - 165,02 81,78	0,52	absoluto
	1,80 +/- 1,02 0,30 - 4,81 1,57	1,16 +/- 0,39 0,65 - 2,01 1,12	0,021*	% total

	84,71 +/- 7,31 57,66 - 95,92 85,65	83,56 +/- 7,31 68,93 - 93,95 82,69	0,36	% parcial
<i>LTCD4CLA+PDI+</i>	0,64 +/- 0,80 0,00 - 3,97 0,46	0,39 +/- 0,68 0,00 - 1,64 0,00	0,17	absoluto
	0,011 +/- 0,011 0,00 - 0,04 0,010	0,005 +/- 0,008 0,00 - 0,02 0,000	0,075**	% total
	0,61 +/- 0,72 0,05 - 3,59 0,36	0,49 +/- 0,78 0,03 - 2,55 0,12	0,10	% parcial
LTCD4CLA-	504,34 +/- 294,68 157,16 - 1532,40 414,22	723,29 +/- 158,97 476,94 - 994,23 702,37	0,002*	absoluto
	8,85 +/- 5,25 2,02 - 28,15 7,56	9,79 +/- 1,79 6,92 - 12,22 9,60	0,084**	% total
	79,80 +/- 8,54 59,14 - 93,14 80,81	87,72 +/- 2,34 84,00 - 91,03 87,60	0,003*	% parcial
<i>LTCD4reg CD25++CD127+CLA-</i>	25,52 +/- 18,27 6,42 - 78,00 18,48	35,15 +/- 9,23 25,82 - 54,19 32,21	0,012*	absoluto
	0,46 +/- 0,35 0,08 - 1,60 0,33	0,48 +/- 0,10 0,34 - 0,66 0,48	0,15	% total
	53,75 +/- 13,02 25,23 - 76,21 56,57	62,96 +/- 4,94 56,45 - 70,79 63,91	0,04	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA-</i>	506,61 +/- 300,23 183,23 - 1408,20 395,16	681,89 +/- 149,23 422,65 - 913,77 679,25	0,006*	absoluto
	8,88 +/- 5,28 2,57 - 27,92 7,85	9,20 +/- 1,50 7,13 - 11,13 8,96	0,20	% total
	83,26 +/- 7,90 59,14 - 95,36 85,36	89,35 +/- 2,93 84,54 - 94,08 89,58	0,012*	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR+</i>	15,54 +/- 9,96 3,00 - 48,30 12,43	15,32 +/- 6,85 7,56 - 27,02 13,42	0,82	absoluto
	0,27 +/- 0,16 0,05 - 0,70 0,20	0,22 +/- 0,11 0,08 - 0,41 0,18	0,39	% total
	3,72 +/- 2,46 0,19 - 9,98 2,98	2,15 +/- 0,83 1,13 - 3,35 2,12	0,072**	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR-</i>	488,80 +/- 293,77 149,38 - 1529,40 403,99	707,97 +/- 156,49 463,23 - 981,10 685,58	0,002*	absoluto
	8,58 +/- 5,25 1,92 - 27,90 7,15	9,58 +/- 1,72 6,84 - 11,95 9,46	0,072**	% total
	96,28 +/- 2,46 90,02 - 99,81 97,02	97,85 +/- 0,83 96,65 - 98,87 97,88	0,072**	% parcial
<i>LTCD4CLA-PDI+</i>	1,08 +/- 1,87 0,00 - 11,38 0,58	0,39 +/- 0,77 0,00 - 2,40 0,00	0,055**	absoluto
	0,02 +/- 0,03 0,00 - 0,16 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,00	0,018*	% total
	0,28 +/- 0,40 0,01 - 2,00 0,15	0,07 +/- 0,10 0,00 - 0,34 0,04	0,005*	% parcial

LTCD8CLA+	36,82 +/- 31,32 5,47 - 142,75 25,12	31,58 +/- 22,33 10,14 - 75,36 20,43	0,60	absoluto
	0,62 +/- 0,45 0,12 - 2,09 0,46	0,46 +/- 0,39 0,12 - 1,43 0,30	0,15	% total
	9,76 +/- 5,81 1,58 - 26,56 8,57	5,97 +/- 2,94 2,14 - 11,12 5,35	0,043*	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA+</i>	31,76 +/- 26,88 5,02 - 159,98 25,99	28,63 +/- 20,16 11,83 - 72,20 19,56	0,53	absoluto
	0,54 +/- 0,37 0,07 - 1,98 0,45	0,42 +/- 0,37 0,14 - 1,37 0,29	0,12	% total
	11,80 +/- 5,75 2,60 - 23,86 12,20	8,17 +/- 6,29 3,08 - 24,09 6,12	0,045*	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA+</i>	7,54 +/- 11,60 0,54 - 66,93 3,70	3,67 +/- 3,06 1,60 - 11,58 2,75	0,28	absoluto
	0,13 +/- 0,19 0,01 - 0,98 0,06	0,05 +/- 0,04 0,02 - 0,14 0,04	0,086**	% total
	7,47 +/- 14,95 0,68 - 100,00 4,40	3,27 +/- 3,11 0,80 - 9,38 2,37	0,027*	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR+</i>	5,9 +/- 7,53 1,56 - 42,35 4,04	4,32 +/- 2,61 0,85 - 10,75 3,92	0,96	absoluto
	0,10 +/- 0,11 0,02 - 0,62 0,07	0,06 +/- 0,03 0,01 - 0,13 0,05	0,28	% total
	16,23 +/- 7,94 2,53 - 42,89 14,14	16,53 +/- 6,88 3,65 - 26,82 18,25	0,59	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR-</i>	31,48 +/- 25,41 3,19 - 116,35 21,84	27,26 +/- 21,39 9,30 - 72,73 16,69	0,44	absoluto
	0,54 +/- 0,37 0,07 - 1,47 0,43	0,40 +/- 0,38 0,11 - 1,38 0,25	0,11	% total
	83,77 +/- 7,94 57,11 - 97,47 85,87	83,47 +/- 6,88 73,1 - 96,35 81,75	0,59	% parcial
<i>LTCD8CLA+PDI+</i>	0,28 +/- 0,61 0,00 - 3,56 0,00	0,28 +/- 0,37 0,00 - 0,82 0,00	0,76	absoluto
	0,00 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,00	0,00 +/- 0,01 0,00 - 0,01 0,00	0,93	% total
	0,84 +/- 0,89 0,05 - 4,00 0,56	1,22 +/- 1,49 0,03 - 4,73 0,75	0,70	% parcial
LTCD8CLA-	349,03 +/- 159,76 104,88 - 698,48 319,24	508,87 +/- 227,53 168,80 - 935,12 466,36	0,023*	absoluto
	6,09 +/- 2,88 1,83 - 14,72 5,64	7,10 +/- 3,64 2,11 - 14,19 6,36	0,38	% total
	90,24 +/- 5,81 73,44 - 98,42 91,43	94,04 +/- 2,94 88,88 - 97,86 94,65	0,043*	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA-</i>	248,38 +/- 131,75 32,83 - 609,14 232,27	345,17 +/- 128,47 161,60 - 575,97 343,36	0,02	absoluto

	4,41 +/- 2,49 0,72 - 13,30 4,02	4,73 +/- 1,87 2,02 - 8,74 4,31	0,49	% total
	88,20 +/- 5,75 76,14 - 97,40 87,80	91,83 +/- 6,29 75,91 - 96,92 93,88	0,045*	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA-</i>	139,97 +/- 110,74 11,40 - 529,15 117,34	191,63 +/- 144,55 15,20 - 412,67 172,82	0,30	absoluto
	2,38 +/- 1,89 0,19 - 9,50 2,05	2,72 +/- 2,32 0,19 - 7,44 2,07	0,86	% total
	94,73 +/- 3,90 82,53 - 99,32 95,72	96,74 +/- 3,11 90,62 - 99,20 97,64	0,033*	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR+</i>	35,65 +/- 30,39 0,60 - 120,39 24,09	40,69 +/- 39,06 11,83 - 146,30 31,30	0,62	absoluto
	0,58 +/- 0,42 0,01 - 1,54 0,46	0,59 +/- 0,62 0,14 - 2,22 0,39	0,77	% total
	10,31 +/- 7,62 0,14 - 31,29 7,52	7,59 +/- 3,64 2,49 - 15,65 6,66	0,48	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR-</i>	313,38 +/- 146,36 72,05 - 654,48 313,13	468,17 +/- 198,08 150,40 - 788,82 445,16	0,016*	absoluto
	5,51 +/- 2,78 1,58 - 14,29 5,27	6,51 +/- 3,13 1,88 - 11,97 5,96	0,29	% total
	89,69 +/- 7,62 68,71 - 99,86 92,48	92,41 +/- 3,64 84,35 - 97,51 93,35	0,48	% parcial
<i>LTCD8CLA-PDI+</i>	0,95 +/- 2,40 0,00 - 12,29 0,40	0,14 +/- 0,31 0,00 - 0,80 0,00	0,048*	absoluto
	0,02 +/- 0,03 0,00 - 0,18 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,033*	% total
	0,29 +/- 0,54 0,01 - 3,00 0,13	0,10 +/- 0,17 0,01 - 0,54 0,04	0,016*	% parcial
Poblaciones linfoides B				
LB, sobre total células	128,97 +/- 69,58 30,86 - 385,80 109,91	165,27 +/- 89,28 55,34 - 344,86 128,08	0,17	absoluto
	2,26 +/- 1,17 0,59 - 6,43 2,11	2,18 +/- 1,04 1,05 - 4,17 1,80	0,93	% total
LB inmaduros CD10+CD38+	2,80 +/- 2,63 0,00 - 15,35 2,23	2,92 +/- 1,72 0,82 - 5,79 2,62	0,56	absoluto
	0,05 +/- 0,04 0,00 - 0,19 0,04	0,04 +/- 0,02 0,01 - 0,07 0,03	0,67	% total
	2,11 +/- 1,35 0,07 - 5,21 1,99	1,77 +/- 0,57 0,58 - 2,61 1,77	0,65	% parcial
LB naive CD27-sIgM+	88,33 +/- 57,61 21,44 - 297,00 69,49	101,44 +/- 66,63 33,20 - 237,35 79,78	0,73	absoluto
	1,54 +/- 0,97 0,41 - 4,95 1,26	1,36 +/- 0,86 0,53 - 2,87 1,03	0,37	% total
	67,32 +/- 12,30	59,75 +/- 16,25	0,16	% parcial

	33,36 - 87,68 67,01	41,99 - 84,87 56,66		
LB memoria CD27+	35,46 +/- 20,35 9,41 - 89,90 33,14	58,34 +/- 36,67 14,72 - 119,15 55,03	0,078**	absoluto
	0,63 +/- 0,36 0,14 - 1,40 0,58	0,75 +/- 0,41 0,23 - 1,41 0,71	0,41	% total
	28,40 +/- 12,40 7,35 - 60,18 28,38	36,48 +/- 15,55 11,98 - 54,39 40,93	0,099**	% parcial
<i>LB memoria sIgM</i>	20,28 +/- 13,58 3,19 - 59,49 16,18	28,89 +/- 16,78 7,68 - 54,58 25,11	0,13	absoluto
	0,36 +/- 0,24 0,07 - 1,02 0,34	0,38 +/- 0,20 0,12 - 0,66 0,32	0,61	% total
	56,83 +/- 13,69 26,91 - 89,21 55,96	54,08 +/- 16,77 32,72 - 80,45 53,26	0,55	% parcial
<i>LB memoria sIgG</i>	6,63 +/- 5,61 0,00 - 30,00 5,95	15,32 +/- 12,96 3,20 - 43,94 10,94	0,018*	absoluto
	0,12 +/- 0,10 0,00 - 0,50 0,11	0,19 +/- 0,15 0,05 - 0,52 0,15	0,049*	% total
	19,11 +/- 9,06 0,49 - 37,00 19,48	24,69 +/- 7,96 15,76 - 36,51 22,60	0,11	% parcial
<i>LB memoria sIgA</i>	6,16 +/- 4,09 0,00 - 16,80 5,54	8,90 +/- 6,88 2,91 - 20,28 5,47	0,31	absoluto
	0,11 +/- 0,07 0,00 - 0,28 0,10	0,11 +/- 0,08 0,04 - 0,24 0,08	0,91	% total
	18,41 +/- 8,44 0,39 - 42,49 17,53	17,45 +/- 3,49 11,94 - 23,46 17,12	0,83	% parcial
Plasmocitos CD27++CD38++	3,07 +/- 3,60 0,00 - 16,16 1,76	2,58 +/- 3,26 0,00 - 11,34 2,06	0,86	absoluto
	0,05 +/- 0,05 0,00 - 0,20 0,03	0,03 +/- 0,03 0,00 - 0,12 0,03	0,30	% total
	2,54 +/- 2,38 0,10 - 11,52 1,56	2,00 +/- 3,08 0,36 - 10,57 0,98	0,17	% parcial
<i>Plasmocitos sIgM</i>	0,61 +/- 0,78 0,00 - 2,99 0,45	0,23 +/- 0,37 0,00 - 0,85 0,00	0,18	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,068**	% total
	20,88 +/- 12,17 0,00 - 57,67 18,97	12,43 +/- 6,12 3,54 - 19,89 15,06	0,039*	% parcial
<i>Plasmocitos sIgG</i>	0,03 +/- 0,12 0,00 - 0,71 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,49	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,49	% total
	4,30 +/- 5,19 0,00 - 29,79 2,91	3,09 +/- 1,76 0,72 - 6,20 2,88	0,87	% parcial

<i>Plasmocitos slgA</i>	1,57 +/- 1,86 0,00 - 8,08 0,96	1,27 +/- 0,88 0,00 - 2,84 1,06	0,70	absoluto
	0,03 +/- 0,03 0,00 - 0,10 0,02	0,02 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,02	0,53	% total
	48,32 +/- 15,62 0,00 - 79,27 48,52	53,73 +/- 11,48 34,65 - 72,00 53,96	0,36	% parcial
Células NK				
NKCD56+CD3-	205,53 +/- 125,65 32,06 - 499,29 186,00	192,83 +/- 95,23 80,00 - 438,48 166,29	0,95	absoluto
	3,48 +/- 1,91 0,58 - 8,61 3,10	2,57 +/- 0,95 1,00 - 4,64 2,43	0,36	% total
<i>NK precursoras</i>	9,85 +/- 6,52 0,80 - 26,66 9,12	8,37 +/- 3,12 3,16 - 12,29 8,18	0,71	absoluto
	0,17 +/- 0,11 0,01 - 0,40 0,15	0,11 +/- 0,04 0,06 - 0,18 0,11	0,15	% total
	6,23 +/- 4,95 0,31 - 21,38 5,37	5,20 +/- 3,62 1,81 - 14,36 3,86	0,83	% parcial
<i>NK maduras</i>	191,28 +/- 127,51 14,14 - 486,83 168,47	184,46 +/- 94,33 68,80 - 426,20 155,54	0,93	absoluto
	3,25 +/- 1,95 0,32 - 8,50 2,77	2,46 +/- 0,95 0,86 - 4,51 2,31	0,49	% total
	91,73 +/- 13,22 13,97 - 99,52 94,49	94,80 +/- 3,62 85,64 - 98,19 96,15	0,66	% parcial
<i>NK activadas</i>	8,43 +/- 11,66 0,56 - 60,51 5,46	1,56 +/- 0,73 0,53 - 2,58 1,50	<0,001*	absoluto
	0,13 +/- 0,14 0,01 - 0,61 0,09	0,02 +/- 0,01 0,01 - 0,04 0,02	<0,001*	% total
	4,08 +/- 4,08 0,37 - 17,40 2,39	0,95 +/- 0,39 0,41 - 1,59 0,99	<0,001*	% parcial
Otras poblaciones celulares				
LTCD3CD56+	111,16 +/- 134,32 9,71 - 840,19 73,94	310,71 +/- 561,82 15,20 - 1897,03 185,39	0,080**	absoluto
	2,14 +/- 3,36 0,19 - 21,88 1,35	3,99 +/- 6,58 0,19 - 22,45 2,25	0,23	% total
	11,10 +/- 14,38 1,58 - 92,46 6,97	18,05 +/- 27,48 1,66 - 95,10 9,43	0,28	% parcial
LTCD3CD56-	968,45 +/- 452,93 68,35 - 2275,80 882,80	1120,80 +/- 499,70 98,02 - 1981,07 1080,55	0,14	absoluto
	16,77 +/- 7,91 1,78 - 43,83 15,14	15,38 +/- 6,38 1,16 - 24,13 16,29	0,96	% total
	88,90 +/- 14,38 7,54 - 98,42 93,03	81,95 +/- 27,48 4,90 - 98,34 90,58	0,28	% parcial
CD plasmocitoides	6,78 +/- 4,10 1,64 - 19,20 5,45	13,10 +/- 6,23 3,84 - 23,81 12,08	0,003*	absoluto

	0,12 +/- 0,07 0,03 - 0,32 0,10	0,18 +/- 0,08 0,06 - 0,29 0,16	0,027*	% total
CD mieloides	11,18 +/- 4,74 2,74 - 25,00 11,04	14,63 +/- 7,44 4,48 - 28,95 14,23	0,17	absoluto
	0,20 +/- 0,08 0,06 - 0,39 0,19	0,20 +/- 0,09 0,07 - 0,35 0,19	0,96	% total
Monocitos DR+CD33+	307,34 +/- 146,13 107,57 - 789,42 264,19	400,46 +/- 124,57 211,84 - 645,06 383,46	0,043*	absoluto
	5,17 +/- 1,71 2,32 - 9,77 5,07	5,40 +/- 1,42 3,31 - 7,80 5,25	0,56	% total
<i>Monocitos clásicos</i>	219,42 +/- 101,87 54,40 - 496,92 187,18	309,47 +/- 94,82 153,60 - 521,84 283,20	0,018*	absoluto
	3,65 +/- 1,27 1,29 - 6,65 3,64	4,16 +/- 1,06 2,40 - 6,31 4,03	0,23	% total
	70,72 +/- 10,02 45,23 - 95,21 71,67	77,81 +/- 9,10 62,37 - 88,55 80,59	0,042*	% parcial
<i>Monocitos intermedios</i>	60,91 +/- 46,77 12,03 - 244,02 48,79	62,43 +/- 46,19 7,28 - 161,74 44,08	0,82	absoluto
	1,00 +/- 0,60 0,23 - 3,02 0,81	0,86 +/- 0,61 0,10 - 1,97 0,72	0,45	% total
	19,02 +/- 7,35 4,68 - 37,15 18,92	15,14 +/- 8,93 2,35 - 28,62 12,77	0,15	% parcial
<i>Monocitos no clásicos</i>	30,51 +/- 22,92 0,46 - 110,21 26,18	28,55 +/- 13,31 6,40 - 50,90 30,71	0,84	absoluto
	0,52 +/- 0,35 0,01 - 1,77 0,47	0,38 +/- 0,15 0,08 - 0,62 0,40	0,29	% total
	10,10 +/- 6,13 0,11 - 27,00 8,85	7,05 +/- 2,45 1,91 - 9,13 8,09	0,17	% parcial
Granulocitos	3942,7 +/- 314,4 1778,9 - 7523,3 3545,4	5040,4 +/- 1057,1 3504,0 - 7089,4 4917,3	0,010*	absoluto
	66,18 +/- 9,80 38,84 - 85,51 65,61	67,72 +/- 7,17 58,18 - 80,37 67,95	0,65	% total
Basófilos	40,26 +/- 18,98 10,63 - 80,35 37,45	41,11 +/- 16,66 23,66 - 68,64 39,50	0,86	absoluto
	0,71 +/- 0,37 0,19 - 2,03 0,65	0,55 +/- 0,19 0,28 - 0,83 0,55	0,22	% total
Eosinófilos	192,48 +/- 187,18 1,70 - 943,40 132,60	152,83 +/- 84,50 66,25 - 325,33 123,33	0,89	absoluto
	3,21 +/- 2,72 0,03 - 12,76 2,34	2,02 +/- 0,98 0,91 - 3,85 1,63	0,15	% total

p<0.05*, p<0.1**. DE: Desviación estándar. Min – Max: intervalo mínimo – máximo. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*.

2.1.2. Vitiligo no segmentario (asociado o no a halo nevus) frente a controles

Cuando se comparó grupo de pacientes con vitiligo no segmentario, asociado o no a nevus, (n=30) con el grupo control (n=10), los resultados (Tabla 23) fueron totalmente superponibles a cuando se consideraba el grupo total de pacientes (apartado 2.1.1).

Así, el total de leucocitos en sangre periférica era significativamente menor en el grupo problema (media de $6,02 \pm 1,56$ vs $7,44 \pm 1,25 \times 10^9/L$; $p=0,008$), condicionado por un menor número absoluto de linfocitos T CD3+ ($p=0,01$) y de granulocitos ($p=0,02$).

El grupo problema mostraba un descenso de números absolutos de LTCD3 respecto al control ($1140,1 \pm 389,1$ vs $1503,2 \pm 383,4$ cels/ μ L; $p=0,01$), a expensas tanto de LTCD4 ($623,4 \pm 239,7$ vs $838,3 \pm 177,9$ cels/ μ L; $p=0,005$) como de LTCD8 ($426,8 \pm 201,3$ vs $569,7 \pm 218,4$ cels/ μ L; $p=0,053$). Analizando su distribución de acuerdo a su maduración periférica, nuevamente sólo se aprecian diferencias en las poblaciones naive, que están descendidas, tanto en los LTCD4 naive ($196,24 \pm 145,13$ cels/ μ L vs $315,17 \pm 76,77$ cels/ μ L; $p=0,031$) como en los LTCD8 naive ($84,46 \pm 62,25$ vs $155,64 \pm 56,22$ cels/ μ L; $p=0,008$). Sin embargo, y aunque al límite de la significación estadística, llama la atención que los LTCD8 de memoria efectora están aumentados respecto a los controles ($138,75 \pm 88,48$ vs $93,44 \pm 119,37$ cels/ μ L; $p=0,081$), diferencias que no se habían objetivado cuando en el grupo de pacientes se incluían también los halo nevus (apartado 2.1.1).

Nuevamente se observaba un descenso en el número absoluto de LTCD4reg ($43,54 \pm 22,16$ vs $55,83 \pm 13,10$ cels/ μ L; $p=0,027$), y en los LT que expresan receptor de IL7 (CD127), tanto en el compartimento CD4 (LTCD4CD25-CD127+ $557,04 \pm 229,10$ vs $764,47 \pm 174,17$ cels/ μ L; $p=0,007$) como CD8 (LTCD8CD25-CD127+ $257,62 \pm 106,22$ vs $373,80 \pm 130,22$ cels/ μ L; $p=0,008$). También los LTCD3CD4-CD8- estaban descendidos ($5,27 \pm 5,19$ vs $12,51 \pm 9,98$ cels/ μ L; $p=0,004$).

Respecto a la expresión de otros marcadores en las distintas poblaciones de linfocitos T, como CLA (asociado a la piel), HLA-DR (marcador de activación), o PD1 (marcador

implicado en inhibición), y al igual que en el análisis del grupo total, aunque encontramos algunas diferencias que alcanzaban la significación estadística en números relativos (Tabla 23) estas diferencias no se mantenían cuando se consideraban números absolutos, y estaban representados en frecuencias muy bajas, por lo que estos resultados deben interpretarse con cautela.

Dentro de las poblaciones B y NK encontramos una situación similar. El grupo problema presentaba un descenso en los LB de memoria ($34,08 \pm 21,69$ vs $58,34 \pm 36,67$ cels/ μ L; $p=0,049$), a expensas de la población B que expresa IgG de superficie ($5,73 \pm 4,49$ vs $15,32 \pm 12,96$ cels/ μ L; $p=0,008$), y también estaban aumentadas las células NK activadas (DR+) ($10,47 \pm 13,33$ vs $1,56 \pm 0,73$ cels/ μ L; $p < 0,001$).

Con respecto a los LTCD3CD56+ (células T-NK), aunque había diferencias ($125,71 \pm 157,24$ vs $310,71 \pm 561,82$ cels/ μ L) estaban más lejos de la significación estadística ($p=0,15$) que cuando se consideraban todos los pacientes, probablemente condicionado por el menor número de casos problema en este análisis.

También encontramos resultados similares en otras poblaciones, con un descenso de células dendríticas plasmocitoides ($6,41 \pm 3,74$ vs $13,10 \pm 6,23$ cels/ μ L; $p=0,002$), y de monocitos totales ($308,00 \pm 134,71$ vs $400,46 \pm 124,57$ cels/ μ L; $p=0,061$) y monocitos clásicos ($220,83 \pm 92,64$ vs $309,47 \pm 94,82$ cels/ μ L; $p=0,022$).

Los datos completos del análisis de poblaciones de este apartado se especifican en la Tabla 23.

Tabla 23. Caracterización inmunofenotípica de VNS frente a controles

	VNS (n=30)	CONTROLES (n=10)	p-valor	
	Media +/- DE Min - Max Mediana	Media +/- DE Min - Max Mediana		
Leucocitos totales en hemograma	6,02 +/- 1,56 3,84 - 9,92 5,61	7,44 +/- 1,25 5,27 - 9,45 7,64	0,008*	absoluto
Poblaciones mayoritarias de LT y marcadores de maduración periférica				
LTCD3 sobre total células	1140,1 +/- 389,1 406,8 - 2359,5 1082,5	1503,2 +/- 383,4 952,0 - 2133,9 1401,5	0,014*	absoluto

	19,54 +/- 6,59 7,30 - 34,65 20,10	20,53 +/- 5,27 11,90 - 28,99 20,02	0,60	% total
LTCD4 sobre total LTCD3	623,4 +/- 239,7 254,5 - 1427,9 562,2	838,3 +/- 177,9 565,0 - 1169,1 815,1	0,005*	absoluto
	10,65 +/- 3,82 4,12 - 22,85 10,26	11,32 +/- 1,75 8,75 - 14,24 10,96	0,45	% total
	55,50 +/- 11,14 33,23 - 71,90 56,20	56,90 +/- 8,66 43,70 - 73,45 57,68	0,88	% parcial
LTCD4naive CD45 RA+CD27+	196,24 +/- 145,13 0,60 - 428,71 203,38	315,17 +/- 76,77 197,63 +/- 444,16 342,45	0,031*	absoluto
	3,31 +/- 2,61 0,01 - 8,24 3,27	4,32 +/- 1,22 2,65 - 6,94 4,13	0,16	% total
	32,47 +/- 22,26 0,07 - 62,95 33,24	38,88 +/- 11,51 20,53 - 56,70 39,43	0,58	% parcial
LTCD4 memoria central CD45RA-CD27+	322,64 +/- 252,69 37,86 - 1206,58 302,56	416,98 +/- 178,14 239,79 - 739,72 349,92	0,16	absoluto
	4,99 +/- 2,97 0,52 - 13,03 4,29	5,53 +/- 1,86 3,78 - 9,01 4,82	0,44	% total
	47,33 +/- 23,15 10,42 - 90,42 45,14	48,11 +/- 10,19 36,74 - 66,91 44,83	0,96	% parcial
LTCD4 memoria efectora CD45RA-CD27-	112,28 +/- 83,09 17,37 - 330,81 101,77	101,43 +/- 53,72 31,01 - 208,24 94,83	0,96	absoluto
	1,78 +/- 1,39 0,34 - 6,23 1,70	1,41 +/- 0,84 0,48 - 3,16 1,24	0,61	% total
	17,14 +/- 12,38 4,36 - 55,50 17,78	12,36 +/- 6,80 4,36 - 24,58 10,55	0,40	% parcial
LTCD4 efector CD45RA+CD27-	15,91 +/- 26,83 0,00 - 98,35 4,45	5,12 +/- 6,12 0,64 - 18,93 2,56	0,78	absoluto
	0,24 +/- 0,39 0,00 - 1,44 0,05	0,07 +/- 0,08 0,01 - 0,26 0,04	0,65	% total
	3,06 +/- 5,75 0,02 - 19,51 0,55	0,65 +/- 0,78 0,05 - 2,43 0,29	0,68	% parcial
LTCD8 sobre total LTCD3	426,8 +/- 201,3 135,4 - 870,1 417,7	569,7 +/- 218,3 195,2 - 914,0 564,4	0,053*	absoluto
	7,29 +/- 3,46 2,91 - 16,83 6,39	7,93 +/- 3,58 2,44 - 13,87 7,34	0,62	% total
	36,79 +/- 9,98 23,39 - 63,71 35,52	37,09 +/- 9,64 20,55 - 53,94 37,32	0,66	% parcial
LTCD8 naive CD45RA+CD27+	84,46 +/- 62,55 0,00 - 241,96 90,23	155,64 +/- 56,22 89,57 - 264,32 153,87	0,008*	absoluto
	1,48 +/- 1,27 0,00 - 4,68 1,34	2,20 +/- 1,03 1,06 - 4,13 1,74	0,074**	% total
	20,06 +/- 17,03 0,09 - 67,34 15,42	31,98 +/- 16,72 11,73 - 57,12 29,20	0,066**	% parcial

LTCD8 memoria central CD45RA-CD27+	134,12 +/- 66,79 23,73 - 278,01 141,17	181,76 +/- 86,54 80,80 - 359,60 152,58	0,27	absoluto
	2,21 +/- 1,15 0,42 - 4,58 2,32	2,50 +/- 1,25 1,01 - 4,77 2,21	0,57	% total
	32,57 +/- 17,85 8,69 - 63,46 31,67	32,94 +/- 10,80 18,62 - 54,38 31,36	0,71	% parcial
LTCD8 memoria efectora CD45RA-CD27-	138,75 +/- 88,48 13,80 - 297,44 125,14	93,44 +/- 119,37 4,80 - 411,88 59,91	0,081**	absoluto
	2,16 +/- 1,38 0,27 - 5,34 1,76	1,29 +/- 1,80 0,06 - 6,25 0,86	0,015*	% total
	28,44 +/- 16,50 5,49 - 73,26 31,37	13,88 +/- 13,22 2,59 - 45,02 8,28	0,012*	% parcial
LTCD8 efector CD45RA+CD27-	119,31 +/- 140,45 0,00 - 411,17 44,79	139,06 +/- 112,66 8,40 - 371,32 129,07	0,29	absoluto
	1,95 +/- 2,34 0,00 - 7,46 0,76	1,94 +/- 1,60 0,12 - 4,49 1,56	0,55	% total
	20,16 +/- 19,17 0,03 - 51,69 16,04	21,21 +/- 13,55 2,77 - 45,57 21,69	0,68	% parcial
Cociente CD4/CD8	1,67 +/- 0,68 0,52 - 3,07 1,59	1,71 +/- 0,79 0,81 - 3,59 1,58	0,94	
Subpoblaciones LTCD4				
LTCD4reg CD25++CD127+	43,54 +/- 22,16 13,22 - 102,71 35,43	55,83 +/- 13,10 43,20 - 81,28 52,08	0,027*	absoluto
	0,75 +/- 0,41 0,29 - 2,01 0,72	0,76 +/- 0,17 0,52 - 0,99 0,81	0,46	% total
	7,24 +/- 3,89 3,02 - 25,49 6,58	6,71 +/- 0,86 4,98 - 8,04 6,89	0,77	% parcial
LTCD4 CD25-CD127+	557,04 +/- 229,10 228,91 - 1321,40 491,50	764,47 +/- 174,17 473,77 - 1080,44 751,25	0,007*	absoluto
	9,51 +/- 3,64 3,59 - 20,68 9,67	10,30 +/- 1,73 7,89 - 13,16 9,99	0,44	% total
	88,71 +/- 6,59 61,09 - 94,61 90,52	90,86 +/- 2,67 83,82 - 93,12 91,91	0,47	% parcial
LTCD4 CD25-CD127-	22,78 +/- 20,26 4,99 - 94,25 15,71	17,98 +/- 15,88 0,66 - 45,85 12,58	0,35	absoluto
	0,39 +/- 0,33 0,10 - 1,38 0,25	0,25 +/- 0,26 0,01 - 0,87 0,17	0,10	% total
	4,06 +/- 3,93 0,98 - 17,13 2,25	2,43 +/- 2,50 0,07 - 8,14 1,64	0,11	% parcial
Subpoblaciones LTCD8				
LTCD8reg CD25++CD127+dim	0,52 +/- 0,69 0,00 - 3,23 0,48	0,57 +/- 0,82 0,00 - 2,64 0,32	0,88	absoluto
	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,08 0,01	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,05 0,01	0,67	% total

	0,15 +/- 0,19 0,00 - 0,78 0,10	0,15 +/- 0,19 0,02 - 0,61 0,07	0,86	% parcial
LTCD8 CD25-CD127+	257,62 +/- 106,22 37,85 - 518,03 264,65	373,80 +/- 130,22 177,60 - 596,40 368,28	0,008*	absoluto
	4,48 +/- 2,06 0,83 - 10,02 4,41	5,15 +/- 1,93 2,22 - 9,05 4,87	0,33	% total
	63,15 +/- 17,36 27,98 - 99,41 63,15	69,54 +/- 17,26 42,97 - 90,73 69,56	0,35	% parcial
LTCD8 CD127-	168,69 +/- 131,29 1,80 - 567,58 127,96	195,30 +/- 146,61 16,80 - 424,25 175,12	0,60	absoluto
	2,80 +/- 2,26 0,04 - 10,19 2,22	2,77 +/- 2,35 0,21 - 7,50 2,11	0,98	% total
	36,70 +/- 17,38 0,44 - 71,92 36,72	30,32 +/- 17,29 8,66 - 56,68 30,42	0,37	% parcial
Otras poblaciones T minoritarias				
LTCD3CD4+CD8+	84,63 +/- 61,81 15,05 - 249,56 67,93	82,70 +/- 79,52 23,72 - 281,60 47,09	0,65	absoluto
	1,51 +/- 1,23 0,24 - 5,94 1,06	1,13 +/- 1,01 0,35 - 3,43 0,58	0,33	% total
	7,24 +/- 4,51 2,22 - 19,50 5,25	5,21 +/- 3,75 1,83 - 13,20 3,96	0,16	% parcial
LTCD3CD4-CD8-	5,27 +/- 5,19 0,56 - 23,03 3,37	12,51 +/- 9,98 3,30 - 30,42 6,95	0,004*	absoluto
	0,09 +/- 0,11 0,01 - 0,57 0,06	0,16 +/- 0,11 0,05 - 0,36 0,12	0,024*	% total
	0,47 +/- 0,42 0,06 - 1,86 0,35	0,80 +/- 0,58 0,17 - 1,93 0,54	0,022*	% parcial
LTCD3 TCR gd	61,50 +/- 52,01 4,65 - 233,21 42,51	76,31 +/- 56,34 20,03 - 178,98 56,74	0,29	absoluto
	1,07 +/- 0,89 0,08 - 3,52 0,76	1,05 +/- 0,79 0,31 - 2,53 0,78	0,89	% total
	5,69 +/- 4,12 0,63 - 18,78 4,12	4,94 +/- 2,76 1,59 - 8,91 4,42	0,71	% parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición				
LTCD4CLA+	120,48 +/- 62,72 23,71 - 347,68 122,88	103,13 +/- 38,35 64,00 - 189,65 93,52	0,33	absoluto
	2,03 +/- 0,93 0,52 - 4,89 1,90	1,39 +/- 0,45 0,80 - 2,31 1,30	0,018*	% total
	21,41 +/- 8,56 8,50 - 40,86 20,66	12,28 +/- 2,34 8,97 - 16,00 12,41	0,001*	% parcial
LTCD4regCLA+	20,76 +/- 10,54 4,56 - 53,33 19,76	20,68 +/- 4,85 13,52 - 27,29 20,48	0,55	absoluto
	0,35 +/- 0,17 0,10 - 0,75 0,35	0,29 +/- 0,08 0,16 - 0,38 0,32	0,27	% total

	48,66 +/- 11,64 32,42 - 70,97 47,91	37,04 +/- 4,94 29,21 - 43,55 36,09	0,006*	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA+</i>	98,44 +/- 46,71 17,37 - 203,51 99,97	82,58 +/- 35,78 42,88 - 166,66 79,84	0,22	absoluto
	1,68 +/- 0,81 0,34 - 3,36 1,58	1,11 +/- 0,41 0,67 - 2,03 1,02	0,019*	% total
	18,07 +/- 7,61 7,07 - 40,86 16,27	10,66 +/- 2,93 5,92 - 15,46 10,43	0,002*	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR+</i>	17,82 +/- 11,98 5,17 - 70,39 15,04	16,29 +/- 7,52 4,23 - 24,81 14,66	0,98	absoluto
	0,30 +/- 0,17 0,10 - 0,99 0,27	0,23 +/- 0,11 0,05 - 0,37 0,24	0,32	% total
	16,38 +/- 8,13 5,57 - 42,34 15,19	16,44 +/- 7,31 6,05 - 31,07 17,31	0,60	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR-</i>	102,66 +/- 54,26 13,68 - 277,29 102,49	86,85 +/- 34,99 51,84 - 165,02 81,78	0,35	absoluto
	1,73 +/- 0,83 0,30 - 3,90 1,60	1,16 +/- 0,39 0,65 - 2,01 1,12	0,013*	% total
	83,62 +/- 8,13 57,66 - 94,43 84,81	83,56 +/- 7,31 68,93 - 93,95 82,69	0,60	% parcial
<i>LTCD4CLA+PDI+</i>	0,721 +/- 0,885 0,00 - 3,97 0,501	0,388 +/- 0,680 0,00 - 1,64 0,000	0,12	absoluto
	0,012 +/- 0,011 0,00 - 0,04 0,010	0,005 +/- 0,009 0,00 - 0,02 0,000	0,054**	% total
	0,654 +/- 0,745 0,05 - 3,59 0,370	0,494 +/- 0,783 0,03 - 2,55 0,115	0,091**	% parcial
LTCD4CLA-	448,01 +/- 178,75 157,16 - 898,29 416,32	723,29 +/- 158,97 476,94 - 994,23 702,37	<0,001*	absoluto
	7,67 +/- 2,91 2,02 - 15,44 7,55	9,79 +/- 1,79 6,92 - 12,22 9,60	0,027*	% total
	78,59 +/- 8,56 59,14 - 91,50 79,34	87,72 +/- 2,34 84,00 - 91,03 87,60	0,001*	% parcial
<i>LTCD4regCLA-</i>	22,78 +/- 14,10 8,48 - 64,90 17,96	35,15 +/- 9,23 25,82 - 54,19 32,21	0,003*	absoluto
	0,40 +/- 0,28 0,12 - 1,27 0,32	0,48 +/- 0,10 0,34 - 0,66 0,48	0,083**	% total
	51,34 +/- 11,64 29,03 - 67,58 52,10	62,96 +/- 4,94 56,45 - 70,79 63,91	0,006*	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA-</i>	458,60 +/- 206,02 207,48 - 1155,65 402,86	681,89 +/- 149,23 422,65 - 913,77 679,25	0,002*	absoluto
	7,83 +/- 3,25 3,03 +/- 17,54 7,72	9,20 +/- 1,50 7,13 - 11,13 8,96	0,086*	% total
	81,93 +/- 7,61 59,14 - 92,93 83,73	89,35 +/- 2,93 84,54 - 94,08 89,58	0,002*	% parcial

<i>LTCD4CLA-DR+</i>	17,41 +/- 10,70 3,07 - 48,30 14,72	15,32 +/- 6,85 7,56 - 27,02 13,42	0,64	absoluto
	0,30 +/- 0,18 0,06 - 0,70 0,24	0,22 +/- 0,11 0,08 - 0,41 0,18	0,23	% total
	4,18 +/- 2,56 1,05 - 9,98 3,45	2,15 +/- 0,83 1,13 - 3,35 2,12	0,027*	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR-</i>	430,59 +/- 174,63 149,38 - 868,59 404,13	707,97 +/- 156,49 463,23 - 981,10 685,58	<0,001*	absoluto
	7,37 +/- 2,85 1,92 - 14,74 7,12	9,58 +/- 1,72 6,84 - 11,95 9,46	0,023*	% total
	95,82 +/- 2,56 90,02 - 98,95 96,56	97,85 +/- 0,83 96,65 - 98,87 97,88	0,027*	% parcial
<i>LTCD4CLA-PDI+</i>	1,233 +/- 2,167 0,00 - 11,38 0,581	0,387 +/- 0,771 0,00 - 2,40 0,000	0,050*	absoluto
	0,020 +/- 0,032 0,00 - 0,16 0,010	0,005 +/- 0,010 0,00 - 0,03 0,000	0,016*	% total
	0,325 +/- 0,455 0,02 - 2,00 0,160	0,073 +/- 0,102 0,00 - 0,34 0,040	0,003*	% parcial
LTCD8CLA+	37,82 +/- 28,85 5,47 - 142,75 27,62	31,58 +/- 22,33 10,14 - 75,36 20,43	0,35	absoluto
	0,64 +/- 0,43 0,12 - 2,09 0,56	0,46 +/- 0,39 0,12 - 1,43 0,30	0,12	% total
	10,45 +/- 5,92 1,58 - 26,56 9,57	5,97 +/- 2,94 2,14 - 11,12 5,35	0,016*	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA+</i>	30,45 +/- 17,45 5,02 - 80,59 28,32	28,63 +/- 20,16 11,83 - 72,20 19,56	0,40	absoluto
	0,52 +/- 0,28 0,11 - 1,18 0,48	0,42 +/- 0,37 0,14 - 1,37 0,29	0,14	% total
	12,57 +/- 5,59 2,60 - 23,86 12,76	8,17 +/- 6,29 3,08 - 24,09 6,12	0,023*	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA+</i>	8,80 +/- 13,38 0,95 - 66,93 4,55	3,67 +/- 3,06 1,60 - 11,58 2,75	0,10	absoluto
	0,14 +/- 0,21 0,02 - 0,98 0,08	0,05 +/- 0,04 0,02 - 0,14 0,04	0,026*	% total
	8,36 +/- 17,74 0,68 - 100,00 4,46	3,27 +/- 3,11 0,80 - 9,38 2,37	0,029*	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR+</i>	6,60 +/- 8,18 1,56 - 42,35 4,19	4,32 +/- 2,61 0,85 - 10,75 3,92	0,51	absoluto
	0,11 +/- 0,12 0,02 - 0,62 0,07	0,06 +/- 0,03 0,01 - 0,13 0,05	0,12	% total
	17,24 +/- 8,26 4,45 - 42,89 16,12	16,53 +/- 6,88 3,65 - 26,82 18,25	0,86	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR-</i>	31,22 +/- 21,80 3,19 - 100,40 22,49	27,26 +/- 21,39 9,30 - 72,73 16,69	0,35	absoluto

	0,53 +/- 0,34 0,07 - 1,47 0,47	0,40 +/- 0,38 0,11 - 1,38 0,25	0,14	% total
	82,76 +/- 8,26 57,11 - 95,55 83,89	83,47 +/- 6,88 73,18 - 96,35 81,75	0,86	% parcial
<i>LTCD8CLA+PDI+</i>	0,33 +/- 0,70 0,00 - 3,56 0,00	0,28 +/- 0,37 0,00 - 0,82 0,00	0,94	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,00	0,00 +/- 0,01 0,00 - 0,01 0,00	0,80	% total
	0,80 +/- 0,93 0,05 - 4,00 0,48	1,22 +/- 1,49 0,03 - 4,73 0,75	0,60	% parcial
LTCD8CLA-	340,64 +/- 162,21 104,88 - 698,48 317,70	508,87 +/- 227,53 168,80 - 935,12 466,36	0,021*	absoluto
	5,82 +/- 2,80 1,83 - 13,35 5,64	7,10 +/- 3,64 2,11 - 14,19 6,36	0,31	% total
	89,55 +/- 5,92 73,44 - 98,42 90,43	94,04 +/- 2,94 88,88 - 97,86 94,65	0,016*	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA-</i>	227,18 +/- 101,11 32,83 - 491,67 226,23	345,17 +/- 128,47 161,60 - 575,97 343,36	0,008*	absoluto
	3,96 +/- 1,96 0,72 - 9,51 3,94	4,73 +/- 1,87 2,02 - 8,74 4,31	0,24	% total
	87,43 +/- 5,59 76,14 - 97,40 87,24	91,83 +/- 6,29 75,91 - 96,92 93,88	0,023*	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA-</i>	165,41 +/- 120,79 13,75 - 529,15 119,22	191,63 +/- 144,55 15,20 - 412,67 172,82	0,59	absoluto
	2,75 +/- 2,09 0,29 - 9,50 2,11	2,72 +/- 2,32 0,19 - 7,44 2,07	0,85	% total
	94,80 +/- 3,97 82,53 - 99,32 95,60	96,74 +/- 3,11 90,62 - 99,20 97,64	0,037*	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR+</i>	39,54 +/- 27,00 4,74 - 93,91 32,88	40,69 +/- 39,06 11,83 - 146,30 31,30	0,76	absoluto
	0,64 +/- 0,39 0,10 - 1,54 0,59	0,59 +/- 0,62 0,14 - 2,22 0,39	0,31	% total
	11,83 +/- 7,48 2,22 - 31,29 9,66	7,59 +/- 3,64 2,49 - 15,65 6,66	0,13	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR-</i>	301,10 +/- 146,51 72,05 - 646,77 263,71	468,17 +/- 198,08 150,40 - 788,82 445,16	0,015*	absoluto
	5,18 +/- 2,62 1,58 - 12,51 4,80	6,51 +/- 3,13 1,88 - 11,97 5,96	0,21	% total
	88,17 +/- 7,48 68,71 - 97,78 90,34	92,41 +/- 3,64 84,35 - 97,51 93,35	0,13	% parcial
<i>LTCD8CLA-PDI+</i>	1,179 +/- 2,817 0,00 - 12,29 0,404	0,145 +/- 0,307 0,00 - 0,80 0,000	0,038*	absoluto
	0,018 +/- 0,041 0,00 - 0,18 0,010	0,002 +/- 0,004 0,00 - 0,01 0,000	0,028*	% total

	0,346 +/- 0,626 0,01 - 3,00 0,150	0,103 +/- 0,171 0,01 - 0,54 0,035	0,016*	% parcial
Poblaciones linfoides B				
LB, sobre total células	123,82 +/- 52,24 30,86 - 274,66 111,64	165,27 +/- 89,28 55,34 - 344,86 128,08	0,16	absoluto
	2,17 +/- 1,05 0,59 - 5,56 1,75	2,18 +/- 1,04 1,05 - 4,17 1,80	0,90	% total
LB inmaduros CD10+CD38+	2,58 +/- 1,97 0,00 - 6,58 1,73	2,92 +/- 1,72 0,82 - 5,79 2,62	0,51	absoluto
	0,05 +/- 0,04 0,00 - 0,13 0,04	0,04 +/- 0,02 0,01 - 0,07 0,03	0,84	% total
	2,07 +/- 1,42 0,07 - 5,21 1,66	1,77 +/- 0,57 0,58 - 2,61 1,77	0,98	% parcial
LB naive CD27-sIgM+	84,48 +/- 43,43 21,44 - 241,07 69,90	101,44 +/- 66,63 33,20 - 237,35 79,78	0,80	absoluto
	1,48 +/- 0,88 0,41 - 4,88 1,23	1,36 +/- 0,86 0,53 - 2,87 1,03	0,43	% total
	67,91 +/- 12,79 33,36 - 87,68 68,12	59,75 +/- 16,25 41,99 - 84,87 56,66	0,14	% parcial
LB memoria CD27+	34,08 +/- 21,69 9,41 - 89,90 27,81	58,34 +/- 36,67 14,72 - 119,15 55,03	0,049*	absoluto
	0,59 +/- 0,38 0,18 - 1,36 0,48	0,75 +/- 0,41 0,23 - 1,41 0,71	0,28	% total
	27,68 +/- 13,01 7,35 - 60,18 27,75	36,48 +/- 15,55 11,98 - 54,39 40,93	0,098**	% parcial
<i>LB memoria sIgM</i>	20,67 +/- 15,02 3,19 - 59,49 15,90	28,89 +/- 16,78 7,68 - 54,58 25,11	0,17	absoluto
	0,36 +/- 0,27 0,07 - 1,02 0,32	0,38 +/- 0,20 0,12 - 0,66 0,32	0,55	% total
	58,77 +/- 13,75 26,91 - 89,21 59,06	54,08 +/- 16,77 32,72 - 80,45 53,26	0,38	% parcial
<i>LB memoria sIgG</i>	5,73 +/- 4,49 0,60 - 22,75 5,27	15,32 +/- 12,96 3,20 - 43,94 10,94	0,008*	absoluto
	0,10 +/- 0,08 0,01 - 0,32 0,09	0,19 +/- 0,15 0,05 - 0,52 0,15	0,021*	% total
	17,59 +/- 8,74 4,02 - 34,43 18,39	24,69 +/- 7,96 15,76 - 36,51 22,60	0,044*	% parcial
<i>LB memoria sIgA</i>	6,01 +/- 4,27 0,00 - 15,74 5,47	8,90 +/- 6,88 2,91 - 20,28 5,47	0,22	absoluto
	0,10 +/- 0,07 0,00 - 0,27 0,09	0,11 +/- 0,08 0,04 - 0,24 0,08	0,67	% total
	18,34 +/- 8,14 0,39 - 38,66 17,39	17,45 +/- 3,49 11,94 - 23,46 17,12	0,73	% parcial
Plasmocitos	2,65 +/- 2,75	2,58 +/- 3,26	1,00	absoluto

CD27++CD38++	0,00 - 11,96 1,56	0,00 - 11,34 2,06		
	0,04 +/- 0,04 0,00 - 0,20 0,03	0,03 +/- 0,03 0,00 - 0,12 0,03	0,43	% total
	2,40 +/- 2,05 0,10 - 6,64 1,38	2,00 +/- 3,08 0,36 - 10,57 0,98	0,22	% parcial
<i>Plasmocitos sIgM</i>	0,68 +/- 0,86 0,00 - 2,99 0,48	0,23 +/- 0,37 0,00 - 0,85 0,00	0,14	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,060**	% total
	22,78 +/- 13,26 0,00 - 57,67 20,49	12,43 +/- 6,12 3,54 - 19,89 15,06	0,012*	% parcial
<i>Plasmocitos sIgG</i>	0,04 +/- 0,15 0,00 - 0,71 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,41	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,41	% total
	5,09 +/- 5,97 0,00 - 29,79 3,42	3,09 +/- 1,76 0,72 - 6,20 2,88	0,53	% parcial
<i>Plasmocitos sIgA</i>	1,34 +/- 1,36 0,00 - 5,98 0,92	1,27 +/- 0,88 0,00 - 2,84 1,06	0,56	absoluto
	0,02 +/- 0,02 0,00 - 0,10 0,01	0,02 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,02	0,71	% total
	47,85 +/- 17,08 0,00 - 74,68 50,34	53,73 +/- 11,48 34,65 - 72,00 53,96	0,46	% parcial
Células NK				
NKCD56+CD3-	222,22 +/- 136,88 45,12 - 499,29 206,86	192,83 +/- 95,23 80,00 - 438,48 166,29	0,73	absoluto
	3,67 +/- 1,99 0,58 - 8,61 3,75	2,57 +/- 0,95 1,00 - 4,64 2,43	0,25	% total
<i>NK precursoras</i>	9,61 +/- 6,01 1,37 - 23,46 8,72	8,37 +/- 3,12 3,16 - 12,29 8,18	0,77	absoluto
	0,17 +/- 0,11 0,02 - 0,39 0,14	0,11 +/- 0,04 0,06 - 0,18 0,11	0,24	% total
	5,61 +/- 4,64 0,48 - 21,38 4,26	5,20 +/- 3,62 1,81 - 14,36 3,86	0,82	% parcial
<i>NK maduras</i>	210,04 +/- 139,05 14,14 - 486,83 199,28	184,46 +/- 94,33 68,80 - 426,20 155,54	0,73	absoluto
	3,44 +/- 2,04 0,32 - 8,50 3,55	2,46 +/- 0,95 0,86 - 4,51 2,31	0,32	% total
	91,71 +/- 15,37 13,97 - 99,52 95,61	94,80 +/- 3,62 85,64 - 98,19 96,15	0,95	% parcial
<i>NK activadas</i>	10,47 +/- 13,33 0,78 - 60,51 7,07	1,56 +/- 0,73 0,53 - 2,58 1,50	<0,001*	absoluto
	0,16 +/- 0,16 0,01 - 0,61	0,02 +/- 0,01 0,01 - 0,04	<0,001*	% total

	0,11	0,02		
	4,61 +/- 4,57 0,45 - 17,40 2,76	0,95 +/- 0,39 0,41 - 1,59 0,99	<0,001*	% parcial
Otras poblaciones celulares				
LTCD3CD56+	125,71 +/- 157,24 9,71 - 840,19 73,78	310,71 +/- 561,82 15,20 - 1897,03 185,39	0,15	absoluto
	2,40 +/- 3,96 0,19 - 21,88 1,36	3,99 +/- 6,58 0,19 - 22,45 2,25	0,30	% total
	12,45 +/- 16,63 1,58 - 92,46 7,90	18,05 +/- 27,48 1,66 - 95,10 9,43	0,45	% parcial
LTCD3CD56-	907,42 +/- 356,71 68,35 - 1721,43 879,85	1120,80 +/- 499,70 98,02 - 1981,07 1080,55	0,098**	absoluto
	15,31 +/- 5,84 1,78 - 29,61 15,02	15,38 +/- 6,38 1,16 - 24,13 16,29	0,76	% total
	87,55 +/- 16,63 7,54 - 98,42 92,10	81,95 +/- 27,48 4,90 - 98,34 90,58	0,45	% parcial
CD plasmocitoides	6,41 +/- 3,74 2,13 - 16,54 5,14	13,10 +/- 6,23 3,84 - 23,81 12,08	0,002*	absoluto
	0,11 +/- 0,06 0,03 - 0,32 0,10	0,18 +/- 0,08 0,06 - 0,29 0,16	0,017*	% total
CD mieloides	11,24 +/- 4,82 2,74 - 25,00 10,28	14,63 +/- 7,44 4,48 - 28,95 14,23	0,18	absoluto
	0,19 +/- 0,08 0,06 - 0,39 0,19	0,20 +/- 0,09 0,07 - 0,35 0,19	0,80	% total
MonocitosDR+CD33+	308,00 +/- 134,71 118,90 - 556,92 264,32	400,46 +/- 124,57 211,84 - 645,06 383,46	0,061**	absoluto
	5,09 +/- 1,51 2,32 - 8,19 5,05	5,40 +/- 1,42 3,31 - 7,80 5,25	0,51	% total
<i>Monocitos clásicos</i>	220,83 +/- 92,64 75,71 - 393,82 193,95	309,47 +/- 94,82 153,60 - 521,84 283,20	0,022*	absoluto
	3,56 +/- 0,99 1,34 - 5,65 3,55	4,16 +/- 1,06 2,40 - 6,31 4,03	0,16	% total
	70,91 +/- 7,73 56,68 - 84,10 71,50	77,81 +/- 9,10 62,37 - 88,55 80,59	0,037*	% parcial
<i>Monocitos intermedios</i>	59,35 +/- 41,87 12,03 - 206,75 46,23	62,43 +/- 46,19 7,28 - 161,74 44,08	0,83	absoluto
	0,96 +/- 0,55 0,23 - 2,84 0,81	0,86 +/- 0,61 0,10 - 1,97 0,72	0,50	% total
	18,32 +/- 6,63 7,23 - 37,15 18,00	15,14 +/- 8,93 2,35 - 28,62 12,77	0,22	% parcial
<i>Monocitos no clásicos</i>	33,03 +/- 24,24 5,75 - 110,21 26,61	28,55 +/- 13,31 6,40 - 50,90 30,71	0,98	absoluto
	0,56 +/- 0,38 0,11 - 1,77 0,48	0,38 +/- 0,15 0,08 - 0,62 0,40	0,18	% total

	10,57 +/- 5,59 3,55 - 25,56 9,43	7,05 +/- 2,45 1,91 - 9,13 8,09	0,068**	% parcial
Granulocitos	4073,9 +/- 1275,3 2224,5 - 7523,3 3700,5	5040,4 +/- 1057,1 3504,0 - 7089,4 4917,3	0,023*	absoluto
	67,14 +/- 8,03 55,10 - 85,51 66,48	67,72 +/- 7,17 58,18 - 80,37 67,95	0,71	% total
Basófilos	41,67 +/- 18,55 13,5 - 80,35 40,65	41,11 +/- 16,66 23,66 - 68,64 39,50	0,98	absoluto
	0,71 +/- 0,32 0,24 - 1,55 0,66	0,55 +/- 0,19 0,28 - 0,83 0,55	0,20	% total
Eosinófilos	212,89 +/- 214,30 1,70 - 943,40 134,73	152,83 +/- 84,50 66,25 - 325,33 123,33	0,76	absoluto
	3,41 +/- 3,03 0,03 - 12,76 2,35	2,02 +/- 0,98 0,91 - 3,85 1,63	0,14	% total

p<0.05*, p<0.1**. DE: Desviación estándar. Min – Max: intervalo mínimo – máximo. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/ μ L*.

2.1.3. Halo nevus (asociado o no a otras formas de vitiligo) frente a controles

Cuando se seleccionaban los pacientes con halo nevus (asociado o no a otras formas de vitiligo) (n=13) y se comparaban con los controles (n=10), los resultados fueron bastante similares, aunque la mayoría de las variables perdieron su significación estadística, probablemente condicionado por la disminución del tamaño muestral.

Se objetivó que los pacientes con halo nevus también tenían un menor número de leucocitos que los controles (5,62±1,50 vs 7,44±1,25 x10⁹/L; p= 0,008), y aunque no llegaban a la significación estadística, estos pacientes también tenían un menor número de LTCD3, LTCD4 y LTCD8, y LTCD4 naive, y LTreg (LTCD4+CD25+CD127+dim). Curiosamente, los LTCD8 naive presentaban valores muy similares en ambos grupos (158,37±120,30 vs 155,64±56,22), por lo que aunque el tamaño muestral hubiese sido mayor, las diferencias no hubiesen alcanzado la significación estadística. Otra diferencia respecto a los pacientes con vitiligo no segmentario, es que en este grupo de pacientes se detectó un descenso estadísticamente significativo de los LTCD4 de

memoria efectora ($47,34 \pm 21,46$ vs $101,43 \pm 53,72$ cels/ μ ; $p=0,021$), resultados que no habían sido detectados en los análisis previos.

Tampoco se encontraron diferencias reseñables en poblaciones de linfocitos T que expresaban CLA (asociado a la piel), HLA-DR (marcador de activación), o PD1 (marcador implicado en inhibición), ni en poblaciones de linfocitos B.

Nuevamente, también en este grupo se detectaban niveles similares de células NK totales, pero el número de NK activadas (HLA-DR+) era significativamente más alto ($3,60 \pm 2,99$ vs $1,56 \pm 0,73$ cels/ μ L; $p=0,035$).

También en este caso se detectaba un descenso de LTCD3CD56+ ($77,56 \pm 40,57$ vs $310,71 \pm 561,82$ cels/ μ L; $p=0,055$), un descenso de las células dendríticas plasmocitoides ($7,63 \pm 4,89$ vs $13,10 \pm 6,23$ cels/ μ L; $p=0,047$), y un descenso en las cifras de monocitos ($305,81 \pm 175,73$ vs $400,46 \pm 124,57$ cels/ μ L; $p=0,072$), a expensas de una disminución de los monocitos clásicos ($216,61 \pm 122,35$ vs $309,47 \pm 94,82$ cels/ μ L; $p=0,063$) en el grupo de HN frente al grupo control.

Los datos completos del análisis de poblaciones de este apartado se especifican en la Tabla 24.

Tabla 24. Caracterización inmunofenotípica de HN frente a controles

	HN (n=13)	CONTROLES (n=10)	p-valor	
	Media +/- DE Mín - Máx Mediana	Media +/- DE Mín - Máx Mediana		
Leucocitos totales en hemograma	5,62 +/- 1,50 3,42 - 8,08 5,58	7,44 +/- 1,25 5,27 - 9,45 7,64	0,008*	absoluto
Poblaciones mayoritarias de LT y marcadores de maduración periférica				
LTCD3 sobre total células	1267,3 +/- 719,7 562,1 - 2499,6 927,8	1503,2 +/- 383,4 952,0 - 2133,8 1401,5	0,17	absoluto
	23,28 +/- 12,65 7,00 - 51,21 21,30	20,53 +/- 5,27 11,90 - 28,99 20,02	0,90	% total

LTCD4 sobre total LTCD3	771,2 +/- 519,0 235,2 - 1728,0 489,5	838,3 +/- 177,9 565,0 - 1169,1 815,1	0,29	absoluto
	14,20 +/- 9,25 3,07 - 32,98 14,02	11,32 +/- 1,75 8,75 - 14,24 10,96	0,71	% total
	57,47 +/- 10,60 35,09 - 69,10 60,21	56,90 +/- 8,66 43,70 - 73,45 57,68	0,50	% parcial
LTCD4naive CD45 RA+CD27+	337,34 +/- 302,83 0,60 - 830,86 229,25	315,17 +/- 76,77 197,63 - 444,16 342,45	0,53	absoluto
	6,08 +/- 6,18 0,01 - 16,47 4,48	4,32 +/- 1,22 2,65 - 6,94 4,13	0,93	% total
	42,64 +/- 21,40 0,05 - 69,27 49,00	38,88 +/- 11,51 20,53 - 56,70 39,43	0,29	% parcial
LTCD4 memoria central CD45RA-CD27+	528,99 +/- 544,20 47,38 - 1660,20 276,49	416,98 +/- 178,14 239,79 - 739,72 349,92	0,53	absoluto
	8,89 +/- 9,00 0,59 - 27,67 5,27	5,53 +/- 1,86 3,78 - 9,01 4,82	0,93	% total
	49,09 +/- 23,56 19,24 - 96,10 44,75	48,11 +/- 10,19 36,74 - 66,91 44,83	0,93	% parcial
LTCD4 memoria efectora CD45RA-CD27-	47,34 +/- 21,46 16,26 - 81,61 43,66	101,43 +/- 53,72 31,01 - 208,24 94,83	0,021*	absoluto
	0,77 +/- 0,36 0,30 - 1,36 0,70	1,41 +/- 0,84 0,48 - 3,16 1,24	0,075**	% total
	7,24 +/- 5,23 2,31 - 16,97 4,98	12,36 +/- 6,80 4,36 - 24,58 10,55	0,051**	% parcial
LTCD4 efector CD45RA+CD27-	3,80 +/- 5,00 0,46 - 15,26 2,03	5,12 +/- 6,12 0,64 - 18,93 2,56	0,48	absoluto
	0,05 +/- 0,06 0,01 - 0,19 0,03	0,07 +/- 0,08 0,01 - 0,26 0,04	0,86	% total
	1,03 +/- 2,04 0,02 - 6,03 0,27	0,65 +/- 0,78 0,05 - 2,43 0,29	0,72	% parcial
LTCD8 sobre total LTCD3	420,1 +/- 188,3 211,4 - 784,6 346,9	569,7 +/- 218,3 195,2 - 914,0 564,4	0,12	absoluto
	7,68 +/- 3,36 3,57 - 16,60 6,80	7,93 +/- 3,58 2,44 - 13,87 7,34	0,80	% total
	36,11 +/- 9,33 24,53 - 53,68 33,82	37,09 +/- 9,64 20,55 - 53,94 37,32	0,54	% parcial
LTCD8 naive CD45RA+CD27+	158,37 +/- 120,30 0,60 - 359,99 150,78	155,64 +/- 56,22 89,57 - 264,32 153,87	0,93	absoluto
	2,84 +/- 2,55 0,01 - 7,86 2,47	2,20 +/- 1,03 1,06 - 4,13 1,74	0,93	% total
	32,33 +/- 19,52 0,05 - 57,75 30,48	31,98 +/- 16,72 11,73 - 57,12 29,20	0,82	% parcial
LTCD8 memoria central CD45RA-CD27+	244,02 +/- 203,05 43,36 - 598,20 183,36	181,76 +/- 86,54 80,80 - 359,60 152,58	0,86	absoluto

	3,98 +/- 3,14 0,54 - 9,97 2,96	2,50 +/- 1,25 1,01 - 4,77 2,21	0,42	% total
	44,19 +/- 26,30 15,18 - 97,55 38,59	32,94 +/- 10,80 18,62 - 54,38 31,36	0,42	% parcial
LTCD8 memoria efectora CD45RA-CD27-	50,34 +/- 45,02 6,23 - 124,58 39,54	93,44 +/- 119,37 4,80 - 411,88 59,91	0,37	absoluto
	0,82 +/- 0,87 0,13 - 2,72 0,55	1,29 +/- 1,80 0,06 - 6,25 0,86	0,53	% total
	11,08 +/- 10,97 1,94 - 27,73 5,78	13,88 +/- 13,22 2,59 - 45,02 8,28	0,42	% parcial
LTCD8 efector CD45RA+CD27-	40,96 +/- 54,32 0,00 - 144,66 15,60	139,06 +/- 112,66 8,40 - 371,32 129,07	0,05	absoluto
	0,70 +/- 1,03 0,00 - 3,02 0,30	1,94 +/- 1,60 0,12 - 4,49 1,56	0,11	% total
	12,40 +/- 18,05 0,02 - 44,34 3,36	21,21 +/- 13,55 2,77 - 45,57 21,69	0,09	% parcial
Cociente CD4/CD8	1,75 +/- 0,67 0,65 - 2,82 1,78	1,71 +/- 0,79 0,81 - 3,59 1,58	0,62	
Subpoblaciones LTCD4				
LTCD4reg CD25++CD127+	50,94 +/- 35,48 10,44 - 112,80 31,44	55,83 +/- 13,10 43,20 - 81,28 52,08	0,39	absoluto
	0,95 +/- 0,65 0,13 - 2,32 0,83	0,76 +/- 0,17 0,52 - 0,99 0,81	0,98	% total
	6,59 +/- 1,27 4,29 - 8,65 6,59	6,71 +/- 0,86 4,98 - 8,04 6,89	0,71	% parcial
LTCD4 CD25-CD127+	705,12 +/- 479,47 211,04 - 1599,60 453,61	764,47 +/- 174,17 473,77 - 1080,44 751,25	0,29	absoluto
	12,99 +/- 8,54 2,84 - 30,18 12,96	10,30 +/- 1,73 7,89 - 13,16 9,99	0,66	% total
	90,98 +/- 2,64 82,66 - 92,67 91,72	90,86 +/- 2,67 83,82 - 93,12 91,91	1,00	% parcial
LTCD4 CD25-CD127-	15,13 +/- 10,44 3,79 - 35,28 12,45	17,98 +/- 15,88 0,66 - 45,85 12,58	0,80	absoluto
	0,26 +/- 0,15 0,07 - 0,48 0,26	0,25 +/- 0,26 0,01 - 0,87 0,17	0,46	% total
	2,43 +/- 2,44 0,85 - 10,18 1,75	2,43 +/- 2,50 0,07 - 8,14 1,64	0,76	% parcial
Subpoblaciones LTCD8				
LTCD8reg CD25++CD127+dim	0,14 +/- 0,28 0,00 - 0,81 0,00	0,57 +/- 0,82 0,00 - 2,64 0,32	0,094**	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,05 0,01	0,16	% total
	0,05 +/- 0,03 0,02 - 0,14 0,05	0,15 +/- 0,19 0,02 - 0,61 0,07	0,49	% parcial

LTCD8 CD25-CD127+	332,10 +/- 207,46 103,97 - 722,35 267,08	373,80 +/- 130,22 177,60 - 596,40 368,28	0,29	absoluto
	6,03 +/- 3,50 1,46 - 13,78 5,51	5,15 +/- 1,93 2,22 - 9,05 4,87	0,76	% total
	74,29 +/- 19,52 40,91 - 97,90 80,37	69,54 +/- 17,26 42,97 - 90,73 69,56	0,50	% parcial
LTCD8 CD127-	87,86 +/- 55,43 12,60 - 186,69 64,06	195,30 +/- 146,61 16,80 - 424,25 175,12	0,072**	absoluto
	1,65 +/- 1,03 0,21 - 3,14 1,40	2,77 +/- 2,35 0,21 - 7,50 2,11	0,40	% total
	25,66 +/- 19,54 2,06 - 59,07 19,57	30,32 +/- 17,29 8,66 - 56,68 30,42	0,50	% parcial
Otras poblaciones T minoritarias				
LTCD3CD4+CD8+	70,73 +/- 38,74 23,52 - 151,20 65,84	82,70 +/- 79,52 23,72 - 281,60 47,09	0,76	absoluto
	1,30 +/- 0,65 0,34 - 2,52 1,37	1,13 +/- 1,01 0,35 - 3,43 0,58	0,32	% total
	5,98 +/- 2,51 2,86 - 11,71 5,49	5,21 +/- 3,75 1,83 - 13,20 3,96	0,34	% parcial
LTCD3CD4-CD8-	5,30 +/- 2,96 1,03 - 11,31 4,88	12,51 +/- 9,98 3,30 - 30,42 6,95	0,10	absoluto
	0,10 +/- 0,05 0,02 - 0,16 0,09	0,16 +/- 0,11 0,05 - 0,36 0,12	0,25	% total
	0,45 +/- 0,25 0,15 - 0,99 0,41	0,80 +/- 0,58 0,17 - 1,93 0,54	0,06	% parcial
LTCD3 TCR gd	55,96 +/- 26,73 14,56 - 94,84 51,45	76,31 +/- 56,34 20,03 - 178,98 56,74	0,66	absoluto
	1,07 +/- 0,63 0,26 - 2,49 1,07	1,05 +/- 0,79 0,31 - 2,53 0,78	0,69	% total
	5,17 +/- 3,08 2,27 - 11,67 4,40	4,94 +/- 2,76 1,59 - 8,91 4,42	0,90	% parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición				
LTCD4CLA+	118,01 +/- 76,61 41,44 - 275,40 77,56	103,13 +/- 38,35 64,00 - 189,65 93,52	0,76	absoluto
	2,22 +/- 1,47 0,59 - 5,26 1,60	1,39 +/- 0,45 0,80 - 2,31 1,30	0,17	% total
	17,39 +/- 8,12 6,86 - 37,39 16,38	12,28 +/- 2,34 8,97 - 16,00 12,41	0,13	% parcial
<i>LTCD4regCLA+</i>	19,08 +/- 12,01 4,02 - 42,82 16,00	20,68 +/- 4,85 13,52 - 27,29 20,48	0,42	absoluto
	0,36 +/- 0,21 0,05 - 0,72 0,33	0,29 +/- 0,08 0,16 - 0,38 0,32	0,46	% total
	40,69 +/- 14,76 23,79 - 74,77 39,84	37,04 +/- 4,94 29,21 - 43,55 36,09	0,90	% parcial

<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA+</i>	87,72 +/- 60,72 21,68 - 191,40 61,25	82,58 +/- 35,78 42,88 - 166,66 79,84	0,80	absoluto
	1,68 +/- 1,28 0,27 - 4,79 1,31	1,11 +/- 0,41 0,67 - 2,03 1,02	0,37	% total
	13,68 +/- 8,02 4,64 - 36,97 12,01	10,66 +/- 2,93 5,92 - 15,46 10,43	0,42	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR+</i>	13,92 +/- 9,88 5,15 - 42,82 11,16	16,29 +/- 7,52 4,23 - 24,81 14,66	0,26	absoluto
	0,26 +/- 0,15 0,07 - 0,53 0,25	0,23 +/- 0,11 0,05 - 0,37 0,24	0,80	% total
	12,78 +/- 4,15 4,08 - 18,93 13,83	16,44 +/- 7,31 6,05 - 31,07 17,31	0,15	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR-</i>	104,10 +/- 71,09 35,84 - 264,00 66,40	86,85 +/- 34,99 51,84 - 165,02 81,78	0,90	absoluto
	1,96 +/- 1,38 0,52 - 4,81 1,35	1,16 +/- 0,39 0,65 - 2,01 1,12	0,17	% total
	87,22 +/- 4,15 81,07 - 95,92 86,17	83,56 +/- 7,31 68,93 - 93,95 82,69	0,15	% parcial
<i>LTCD4CLA+PDI+</i>	0,43 +/- 0,53 0,00 - 1,64 0,37	0,39 +/- 0,68 0,00 - 1,64 0,00	0,49	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,04 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,02 0,00	0,31	% total
	0,49 +/- 0,66 0,09 - 2,49 0,27	0,49 +/- 0,78 0,03 - 2,55 0,12	0,29	% parcial
LTCD4CLA-	634,33 +/- 447,74 201,55 - 1532,40 403,52	723,29 +/- 158,97 476,94 - 994,23 702,37	0,22	absoluto
	11,58 +/- 8,02 2,51 - 28,15 8,81	9,79 +/- 1,79 6,92 - 12,22 9,60	0,76	% total
	82,61 +/- 8,12 62,61 - 93,14 83,62	87,72 +/- 2,34 84,00 - 91,03 87,60	0,13	% parcial
<i>LTCD4regCLA-</i>	31,86 +/- 25,01 6,42 - 78,00 18,48	35,15 +/- 9,23 25,82 - 54,19 32,21	0,32	absoluto
	0,59 +/- 0,48 0,08 - 1,60 0,34	0,48 +/- 0,10 0,34 - 0,66 0,48	0,64	% total
	59,31 +/- 14,76 25,23 - 76,21 60,16	62,96 +/- 4,94 56,45 - 70,79 63,91	0,90	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA-</i>	617,40 +/- 440,28 183,23 - 1408,20 376,02	681,89 +/- 149,23 422,65 - 913,77 679,25	0,22	absoluto
	11,31 +/- 7,94 2,57 - 27,92 8,17	9,20 +/- 1,50 7,13 - 11,13 8,96	0,95	% total
	86,32 +/- 8,02 63,03 - 95,36 87,99	89,35 +/- 2,93 84,54 - 94,08 89,58	0,42	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR+</i>	11,22 +/- 6,46 3,00 - 29,90 10,64	15,32 +/- 6,85 7,56 - 27,02 13,42	0,12	absoluto

	0,20 +/- 0,08 0,05 - 0,37 0,19	0,22 +/- 0,11 0,08 - 0,41 0,18	0,98	% total
	2,66 +/- 1,91 0,19 - 7,10 2,81	2,15 +/- 0,83 1,13 - 3,35 2,12	0,62	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR-</i>	623,11 +/- 447,61 187,10 - 1529,40 389,55	707,97 +/- 156,49 463,23 - 981,10 685,58	0,24	absoluto
	11,38 +/- 8,03 2,33 - 27,90 8,55	9,58 +/- 1,72 6,84 - 11,95 9,46	0,71	% total
	97,34 +/- 1,91 92,90 - 99,81 97,19	97,85 +/- 0,83 96,65 - 98,87 97,88	0,62	% parcial
<i>LTCD4CLA-PD1+</i>	0,73 +/- 0,74 0,00 - 2,40 0,59	0,39 +/- 0,77 0,00 - 2,40 0,00	0,17	absoluto
	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,04 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,00	0,081**	% total
	0,16 +/- 0,17 0,01 - 0,60 0,11	0,07 +/- 0,10 0,00 - 0,34 0,04	0,098**	% parcial
LTCD8CLA+	34,52 +/- 37,59 9,56 - 138,17 17,92	31,58 +/- 22,33 10,14 - 75,36 20,43	0,66	absoluto
	0,59 +/- 0,49 0,13 - 1,71 0,42	0,46 +/- 0,39 0,12 - 1,43 0,30	0,39	% total
	8,19 +/- 5,46 2,25 - 19,64 6,49	5,97 +/- 2,94 2,14 - 11,12 5,35	0,46	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA+</i>	34,77 +/- 42,18 5,15 - 159,98 19,71	28,63 +/- 20,16 11,83 + 72,20 19,56	0,98	absoluto
	0,59 +/- 0,53 0,07 - 1,98 0,40	0,42 +/- 0,37 0,14 - 1,37 0,29	0,19	% total
	10,01 +/- 5,93 3,07 - 22,18 7,63	8,17 +/- 6,29 3,08 - 24,09 6,12	0,35	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA+</i>	4,63 +/- 5,00 0,54 - 16,29 2,79	3,67 +/- 3,06 1,60 - 11,58 2,75	0,80	absoluto
	0,10 +/- 0,13 0,01 - 0,40 0,05	0,05 +/- 0,04 0,02 - 0,14 0,04	0,78	% total
	5,42 +/- 3,89 1,41 - 12,70 4,17	3,27 +/- 3,11 0,80 - 9,38 2,37	0,094**	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR+</i>	4,46 +/- 5,63 1,63 - 21,82 2,40	4,32 +/- 2,61 0,85 - 10,75 3,92	0,21	absoluto
	0,08 +/- 0,07 0,03 - 0,27 0,05	0,06 +/- 0,03 0,01 - 0,13 0,05	0,81	% total
	13,70 +/- 6,73 2,53 - 28,43 13,13	16,53 +/- 6,88 3,65 - 26,82 18,25	0,24	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR-</i>	32,13 +/- 33,95 10,44 - 116,35 17,39	27,26 +/- 21,39 9,30 - 72,73 16,69	0,84	absoluto
	0,55 +/- 0,45 0,13 - 1,45 0,37	0,40 +/- 0,38 0,11 - 1,38 0,25	0,16	% total

	86,31 +/- 6,73 71,57 - 97,47 86,87	83,47 +/- 6,88 73,18 - 96,35 81,75	0,24	% parcial
<i>LTCD8CLA+PDI+</i>	0,17 +/- 0,24 0,00 - 0,60 0,00	0,28 +/- 0,37 0,00 - 0,82 0,00	0,47	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,00 +/- 0,01 0,00 - 0,01 0,00	0,75	% total
	0,91 +/- 0,80 0,19 - 2,93 0,70	1,22 +/- 1,49 0,03 - 4,73 0,75	1,00	% parcial
LTCD8CLA-	368,40 +/- 158,61 134,75 - 674,18 347,42	508,87 +/- 227,53 168,80 - 935,12 466,36	0,11	absoluto
	6,71 +/- 3,10 3,51 - 14,72 5,85	7,10 +/- 3,64 2,11 - 14,19 6,36	0,71	% total
	91,81 +/- 5,46 80,36 - 97,75 93,51	94,04 +/- 2,94 88,88 - 97,86 94,65	0,46	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA-</i>	297,32 +/- 179,81 90,29 - 609,14 236,40	345,17 +/- 128,47 161,60 - 575,97 343,36	0,24	absoluto
	5,44 +/- 3,27 1,25 - 13,30 5,19	4,73 +/- 1,87 2,02 - 8,74 4,31	0,66	% total
	89,99 +/- 5,93 77,82 - 96,93 92,37	91,83 +/- 6,29 75,91 - 96,92 93,88	0,35	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA-</i>	83,22 +/- 52,93 11,40 - 183,02 60,37	191,63 +/- 144,55 15,20 - 412,67 172,82	0,082**	absoluto
	1,55 +/- 0,95 0,19 - 2,76 1,38	2,72 +/- 2,32 0,19 - 7,44 2,07	0,40	% total
	94,58 +/- 3,89 87,30 - 98,59 95,83	96,74 +/- 3,11 90,62 - 99,20 97,64	0,094**	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR+</i>	26,69 +/- 36,68 0,60 - 120,39 15,33	40,69 +/- 39,06 11,83 - 146,30 31,30	0,047*	absoluto
	0,42 +/- 0,46 0,01 - 1,49 0,32	0,59 +/- 0,62 0,14 - 2,22 0,39	0,23	% total
	6,78 +/- 6,99 0,14 - 21,54 5,93	7,59 +/- 3,64 2,49 - 15,65 6,66	0,26	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR-</i>	341,71 +/- 147,84 123,46 - 654,48 324,63	468,17 +/- 198,08 150,40 - 788,82 445,16	0,082**	absoluto
	6,29 +/- 3,10 3,27 - 14,29 5,42	6,51 +/- 3,13 1,88 - 11,97 5,96	0,66	% total
	93,22 +/- 6,99 78,46 - 99,86 94,07	92,41 +/- 3,64 84,35 - 97,51 93,35	0,26	% parcial
<i>LTCD8CLA-PDI+</i>	0,41 +/- 0,55 0,00 - 1,80 0,20	0,14 +/- 0,31 0,00 - 0,80 0,00	0,18	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,12	% total
	0,15 +/- 0,13 0,03 - 0,45 0,09	0,10 +/- 0,17 0,01 - 0,54 0,04	0,079**	% parcial

Poblaciones linfoides B				
LB, sobre total células	140,85 +/- 100,66 52,33 - 385,80 104,37	165,27 +/- 89,28 55,34 - 344,86 128,08	0,32	absoluto
	2,47 +/- 1,43 0,82 - 6,43 2,27	2,18 +/- 1,04 1,05 - 4,17 1,80	0,62	% total
LB inmaduros CD10+CD38+	3,31 +/- 3,81 0,00 - 15,35 2,40	2,92 +/- 1,72 0,82 - 5,79 2,62	0,78	absoluto
	0,05 +/- 0,05 0,00 - 0,19 0,04	0,04 +/- 0,02 0,01 - 0,07 0,03	0,45	% total
	2,21 +/- 1,22 0,14 - 4,60 2,13	1,77 +/- 0,57 0,58 - 2,61 1,77	0,24	% parcial
LB naive CD27-sIgM+	97,21 +/- 83,28 42,15 - 297,00 55,86	101,44 +/- 66,63 33,20 - 237,35 79,78	0,66	absoluto
	1,68 +/- 1,19 0,66 - 4,95 1,36	1,36 +/- 0,86 0,53 - 2,87 1,03	0,39	% total
	65,96 +/- 11,44 48,72 - 81,71 65,03	59,75 +/- 16,25 41,99 - 84,87 56,66	0,35	% parcial
LB memoria CD27+	38,91 +/- 16,89 11,24 - 84,00 37,83	58,34 +/- 36,67 14,72 - 119,15 55,03	0,39	absoluto
	0,71 +/- 0,32 0,14 - 1,40 0,68	0,75 +/- 0,41 0,23 - 1,41 0,71	0,95	% total
	30,21 +/- 11,04 11,36 - 48,57 30,05	36,48 +/- 15,55 11,98 - 54,39 40,93	0,24	% parcial
<i>LB memoria sIgM</i>	19,38 +/- 9,97 3,76 - 40,32 18,32	28,89 +/- 16,78 7,68 - 54,58 25,11	0,15	absoluto
	0,35 +/- 0,17 0,09 - 0,72 0,36	0,38 +/- 0,20 0,12 - 0,66 0,32	0,83	% total
	52,35 +/- 12,96 37,62 - 82,22 47,43	54,08 +/- 16,77 32,72 - 80,45 53,26	0,90	% parcial
<i>LB memoria sIgG</i>	8,71 +/- 7,42 0,00 - 30,00 8,62	15,32 +/- 12,96 3,20 - 43,94 10,94	0,24	absoluto
	0,16 +/- 0,13 0,00 - 0,50 0,13	0,19 +/- 0,15 0,05 - 0,52 0,15	0,42	% total
	22,63 +/- 9,13 0,49 - 37,00 21,84	24,69 +/- 7,96 15,76 - 36,51 22,60	0,76	% parcial
<i>LB memoria sIgA</i>	6,49 +/- 3,77 2,80 - 16,80 5,54	8,90 +/- 6,88 2,91 - 20,28 5,47	0,71	absoluto
	0,12 +/- 0,07 0,04 - 0,28 0,12	0,11 +/- 0,08 0,04 - 0,24 0,08	0,60	% total
	18,57 +/- 9,44 5,48 - 42,49 18,36	17,45 +/- 3,49 11,94 - 23,46 17,12	0,93	% parcial
Plasmocitos CD27++CD38++	4,07 +/- 5,09 0,00 - 16,16 2,28	2,58 +/- 3,26 0,00 - 11,34 2,06	0,62	absoluto
	0,06 +/- 0,06	0,03 +/- 0,03	0,21	% total

	0,00 - 0,20 0,04	0,00 - 0,12 0,03		
	2,85 +/- 3,10 0,50 - 11,52 1,97	2,00 +/- 3,08 0,36 - 10,57 0,98	0,20	% parcial
<i>Plasmocitos sIgM</i>	0,44 +/- 0,55 0,00 - 1,62 0,40	0,23 +/- 0,37 0,00 - 0,85 0,00	0,45	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,02 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,19	% total
	16,47 +/- 7,95 8,56 - 34,92 14,63	12,43 +/- 6,12 3,54 - 19,89 15,06	0,50	% parcial
<i>Plasmocitos sIgG</i>	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	1,00	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	1,00	% total
	2,48 +/- 1,76 0,10 - 6,19 1,74	3,09 +/- 1,76 0,72 - 6,20 2,88	0,44	% parcial
<i>Plasmocitos sIgA</i>	2,10 +/- 2,69 0,00 - 8,08 1,08	1,27 +/- 0,88 0,00 - 2,84 1,06	0,93	absoluto
	0,03 +/- 0,03 0,00 - 0,10 0,02	0,02 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,02	0,32	% total
	49,40 +/- 12,12 27,50 - 79,27 47,97	53,73 +/- 11,48 34,65 - 72,00 53,96	0,29	% parcial
Células NK				
NKCD56+CD3-	166,99 +/- 87,61 32,06 - 336,00 162,94	192,83 +/- 95,23 80,00 - 438,48 166,29	0,62	absoluto
	3,04 +/- 1,69 0,70 - 6,43 2,92	2,57 +/- 0,95 1,00 - 4,64 2,43	0,80	% total
<i>NK precursoras</i>	10,40 +/- 7,77 0,80 - 26,66 10,08	8,37 +/- 3,12 3,16 - 12,29 8,18	0,66	absoluto
	0,19 +/- 0,12 0,01 - 0,40 0,18	0,11 +/- 0,04 0,06 - 0,18 0,11	0,11	% total
	7,60 +/- 5,54 0,31 - 18,28 5,92	5,20 +/- 3,62 1,81 - 4,36 3,86	0,32	% parcial
<i>NK maduras</i>	144,41 +/- 79,19 27,94 - 325,92 146,63	184,46 +/- 94,33 68,80 - 426,20 155,54	0,32	absoluto
	2,78 +/- 1,72 0,61 - 6,08 2,44	2,46 +/- 0,95 0,86 - 4,51 2,31	0,90	% total
	91,79 +/- 5,31 81,72 - 98,76 93,34	94,80 +/- 3,62 85,64 - 98,19 96,15	0,17	% parcial
<i>NK activadas</i>	3,60 +/- 2,99 0,56 - 10,50 2,71	1,56 +/- 0,73 0,53 - 2,58 1,50	0,035*	absoluto
	0,06 +/- 0,04 0,01 - 0,14 0,05	0,02 +/- 0,01 0,01 - 0,04 0,02	0,05*	% total
	2,84 +/- 2,29 0,37 - 7,44	0,95 +/- 0,39 0,41 - 1,59	0,009*	% parcial

	2,02	0,99		
Otras poblaciones celulares				
LTCD3CD56+	77,56 +/- 40,57 21,20 - 160,33 76,64	310,71 +/- 561,82 15,20 - 1897,03 185,39	0,055**	absoluto
	1,52 +/- 1,05 0,51 - 3,92 1,12	3,99 +/- 6,58 0,19 - 22,45 2,25	0,22	% total
	8,00 +/- 6,31 2,54 - 23,95 4,82	18,05 +/- 27,48 1,66 - 95,10 9,43	0,14	% parcial
LTCD3CD56-	1109,29 +/- 616,20 497,95 - 2275,80 882,80	1120,80 +/- 499,70 98,02 - 1981,07 1080,55	0,46	absoluto
	20,15 +/- 10,90 7,07 - 43,83 17,84	15,38 +/- 6,38 1,16 - 24,13 16,29	0,46	% total
	92,00 +/- 6,31 76,05 - 97,46 95,18	81,95 +/- 27,48 4,90 - 98,34 90,58	0,14	% parcial
CD plasmocitoides	7,63 +/- 4,89 1,64 - 19,20 8,03	13,10 +/- 6,23 3,84 - 23,81 12,08	0,047*	absoluto
	0,13 +/- 0,08 0,04 - 0,32 0,10	0,18 +/- 0,08 0,06 - 0,29 0,16	0,19	% total
CD mieloides	11,03 +/- 4,74 3,27 - 18,48 12,50	14,63 +/- 7,44 4,48 - 28,95 14,23	0,26	absoluto
	0,21 +/- 0,10 0,06 - 0,37 0,19	0,20 +/- 0,09 0,07 - 0,35 0,19	0,73	% total
Monocitos DR+CD33+	305,81 +/- 175,73 107,57 - 789,42 259,20	400,46 +/- 124,57 211,84 - 645,06 383,46	0,072**	absoluto
	5,35 +/- 2,15 2,63 - 9,77 5,07	5,40 +/- 1,42 3,31 - 7,80 5,25	0,78	% total
<i>Monocitos clásicos</i>	216,61 +/- 122,35 54,40 - 496,92 157,80	309,47 +/- 94,82 153,60 - 521,84 283,20	0,063**	absoluto
	3,84 +/- 1,74 1,29 - 6,65 3,79	4,16 +/- 1,06 2,40 - 6,31 4,03	0,62	% total
	70,34 +/- 13,90 45,23 - 95,21 73,28	77,81 +/- 9,10 62,37 - 88,55 80,59	0,15	% parcial
<i>Monocitos intermedios</i>	64,52 +/- 58,29 15,11 - 244,02 58,92	62,43 +/- 46,19 7,28 - 161,74 44,08	0,85	absoluto
	1,09 +/- 0,72 0,29 - 3,02 0,81	0,86 +/- 0,61 0,10 - 1,97 0,72	0,46	% total
	20,65 +/- 8,88 4,68 - 30,96 21,18	15,14 +/- 8,93 2,35 - 28,62 12,77	0,12	% parcial
<i>Monocitos no clásicos</i>	24,69 +/- 19,10 0,46 - 61,83 20,04	28,55 +/- 13,31 6,40 - 50,90 30,71	0,54	absoluto
	0,42 +/- 0,28 0,01 - 0,83 0,43	0,38 +/- 0,15 0,08 - 0,62 0,40	0,80	% total
	9,02 +/- 7,37 0,11 - 27,00 6,29	7,05 +/- 2,45 1,91 - 9,13 8,09	0,93	% parcial

Granulocitos	3640,1 +/- 1405,0 1778,9 - 6709,1 3107,3	5040,4 +/- 1057,1 3504,0 - 7089,4 4917,3	0,013*	absoluto
	63,99 +/- 13,15 38,84 - 83,55 64,87	67,72 +/- 7,17 58,18 - 80,37 67,95	0,62	% total
Basófilos	37,02 +/- 20,32 10,63 - 78,38 36,18	41,11 +/- 16,66 23,66 - 68,64 39,50	0,58	absoluto
	0,71 +/- 0,48 0,19 - 2,03 0,59	0,55 +/- 0,19 0,28 - 0,83 0,55	0,46	% total
Eosinófilos	145,37 +/- 90,50 10,30 - 310,27 132,60	152,83 +/- 84,50 66,25 - 325,33 123,33	0,80	absoluto
	2,77 +/- 1,85 0,19 - 6,89 2,34	2,02 +/- 0,98 0,91 - 3,85 1,63	0,29	% total

p<0.05*, p<0.1**. DE: Desviación estándar. Min – Max: intervalo mínimo – máximo. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*.

2.2 OBJETIVO 2:

Aislar, mediante citometría de flujo multidimensional ("sorting"), las poblaciones celulares mayoritarias del sistema inmune (células B, T, NK, dendríticas, y mieloides), para su congelación por separado, de cara a realizar estudios moleculares cuando se disponga de los fondos necesarios, que potencialmente puedan identificar vías de señalización o genes con potencial interés terapéutico en el contexto del vitiligo. Además, congelar suero de los pacientes y de los controles, para realizar estudios de citocinas cuando se disponga de los fondos necesarios.

Una vez realizado el estudio inmunofenotípico, la muestra restante se procesó para separar diferentes subpoblaciones mediante un separador celular FACS Aria III (Becton Dickinson Biosciences). Se ha obtenido un adecuado número de células de las distintas subpoblaciones (linfocitos CD4, Linfocitos CD8, Linfocitos T_H, Linfocitos T_{reg}, neutrófilos), que se congelaron en RTL plus y están almacenadas para realizar estudios genómicos y transcriptómicos cuando se disponga de los fondos necesarios. Debido a problemas técnicos, en 1 caso no fue posible realizar la separación de las distintas poblaciones.

Los sueros de los pacientes (n=40) se almacenaron congelados a -80°C, para realizar estudios posteriores de cuantificación de citocinas, cuando se disponga de los fondos necesarios.

Los datos concretos sobre las poblaciones separadas y el número de células obtenidas para cada una de ellas en los 39 casos en las que se realizó con éxito la separación se muestran en la siguiente tabla:

Nº Paciente (código)	Células separadas CD4	Células separadas CD8	Células separadas Linfocitos T g-d	Células separadas Linfocitos T reguladores	Células separadas Neutrófilos
109643	1400000	500000	18000	27000	500000
111005	500000	500000	130000	40000	500000
111004	500000	400000	70000	90000	500000
109667	700000	755000	54000	18000	500000
109198	500000	400000	230000	15000	500000
110925	500000	500000	400000	58000	500000
110989	500000	500000	29000	237000	1000000
109456	1500000	450000	12000	20000	500000
110924	500000	500000	140000	150000	500000
109787	500000	500000	100000	15000	500000
109809	280000	170000	80000	1000	225000
110772	500000	500000	28000	8000	500000
110771	500000	300000	28000	50000	500000
111140	500000	500000	75000	100000	1000000
110848	1200000	400000	35000	90000	500000
110849	500000	500000	100000	130000	500000
110879	500000	500000	9000	53000	500000
111940	500000	500000	120000	90000	1000000
111946	500000	500000	160000	146000	1000000
111941	183000	116000	22000	26000	1000000
111939	500000	500000	270000	80000	1000000
111996	500000	500000	280000	160000	1000000
111889	450000	740000	45000	1000	500000
111475	500000	500000	140000	84000	1000000
111414	500000	500000	100000	53000	1000000
111340	500000	500000	270000	170000	1000000
111263	500000	500000	323000	150000	1000000
111210	500000	500000	55000	70000	1000000
111209	500000	500000	150000	43000	1000000
112051	500000	500000	80000	100000	1000000
112083	500000	500000	50000	70000	1000000
112120	500000	500000	80000	120000	1000000
112215	500000	500000	70000	110000	1000000
112253	2000000	1500000	111000	141000	1000000
112367	1400000	1000000	220000	109000	1000000
112368	900000	700000	40000	39000	1000000

112397	1000000	500000	130000	50000	1000000
112429	1000000	1000000	230000	104000	1000000
112503	1000000	1000000	140000	139000	1000000

TABLA 25. Código de paciente, poblaciones celulares separadas y número de células obtenidas para cada una de ellas.

2.3 OBJETIVO 3:

Analizar si existen diferencias en los patrones inmunofenotípicos de la sangre periférica en relación con las distintas variantes clínicas de la enfermedad (vitíligo no segmentario, halo nevus asociado o no a otras formas de vitíligo)

Como cabía esperar, y dadas las similitudes que encontramos cuando comparamos los controles sanos con el grupo de pacientes con VNS (n=30) y con el grupo de HN asociados o no con otras formas de vitíligo (n=13), no se detectaban grandes diferencias cuando se compararon entre sí estas dos formas de enfermedad (Tabla 26).

No encontramos diferencias respecto al análisis de las poblaciones mayoritarias de LT. Al analizando su distribución de acuerdo a su maduración periférica, y al contrario de cuando se comparaban ambos grupos de pacientes frente a controles, en que se observaba que los pacientes tenían menos LT naive, tanto dentro del compartimento CD4 como CD8, los pacientes con VNS mostraban mayores valores de LT de memoria efectora que el grupo de HN y/u otras formas de vitíligo, tanto dentro del compartimento de LTCD4+ (112,28±83,09 vs 47,34±21,46 cels/μL; p=0,071) como de LTCD8+ (138,75±88,48 vs 40,96±54,32 cels/μL; p=0,009).

No se encontraron diferencias entre ambos grupos en los LTreg (LTCD4+CD25+CD127+dim), y respecto a los LT no reguladores que expresan receptor de IL7 (CD127), no se encontraron diferencias tanto en el compartimento de LTCD4+, aunque en el compartimento de LTCD8+, los LTCD8CD127- estaban aumentados en el grupo de VNS respecto al HN (168,69±131,29 vs 87,86±55,4 cels/μL; p=0,042).

Respecto a otras poblaciones muy minoritarias o a la expresión de otros marcadores como CLA (asociado a la piel), HLA-DR (marcador de activación), o PD1 (marcador implicado en inhibición), y al igual que en el análisis en el que se empleaba como comparador el grupo control, aunque encontramos algunas diferencias que alcanzaban la significación estadística en números relativos (Tabla 26), se trataba de diferencias en poblaciones que estaban representadas en muy baja frecuencias, sin que se detectasen diferencias en números absolutos, por lo que consideramos que estos resultados no deben ser considerados valorables.

No se encontraron diferencias relevantes en el estudio de las poblaciones linfoides B, ni de las poblaciones NK mayoritarias. En el caso de las poblaciones NK que expresan el antígeno HLA-DR (activadas), que ya se habían detectado más elevadas que los controles en ambos grupos de pacientes, encontramos que el incremento era significativamente mayor en el grupo de VNS que en los pacientes con HN y/u otras formas de vitíligo ($10,47 \pm 13,33$ vs $3,60 \pm 2,99$ cels/ μ L; $p=0,028$).

Tampoco se hallaron diferencias significativas en el resto de poblaciones celulares analizadas en sangre periférica.

Los datos completos del análisis de poblaciones de este apartado se especifican en la Tabla 26.

Tabla 26. Caracterización inmunofenotípica de VNS frente a HN y/u otras formas de vitíligo

	VNS (n=30)	HN (n=13)	p-valor	
	Media +/- DE Min - Max Mediana	Media +/- DE Mín - Máx Mediana		
Leucocitos totales en hemograma	6,02 +/- 1,56 3,84 - 9,92 5,61	5,62 +/- 1,50 3,42 - 8,08 5,58	0,62	absoluto
Poblaciones mayoritarias de LT y marcadores de maduración periférica				
LTCD3 sobre total células	1140,1 +/- 389,1 406,8 - 2359,5 1082,5	1267,3 +/- 719,7 562,1 - 2499,6 927,8	0,63	absoluto
	19,54 +/- 6,59 7,30 - 34,65	23,28 +/- 12,65 7,00 - 51,21	0,53	% total

	20,10	21,30		
LTCD4 sobre total LTCD3	623,4 +/- 239,7 254,5 - 1427,9 562,2	771,2 +/- 519,0 235,2 - 1728,0 489,5	0,90	absoluto
	10,65 +/- 3,82 4,12 - 22,85 10,26	14,20 +/- 9,25 3,07 - 32,98 14,02	0,37	% total
	55,50 +/- 11,14 33,23 - 71,90 56,20	57,47 +/- 10,60 35,09 - 69,10 60,21	0,49	% parcial
LTCD4naive CD45 RA+CD27+	196,24 +/- 145,13 0,60 - 428,71 203,38	337,34 +/- 302,83 0,60 - 830,86 229,25	0,43	absoluto
	3,31 +/- 2,61 0,01 - 8,24 3,27	6,08 +/- 6,18 0,01 - 16,47 4,48	0,35	% total
	32,47 +/- 22,26 0,07 - 62,95 33,24	42,64 +/- 21,40 0,05 - 69,27 49,00	0,31	% parcial
LTCD4 memoria central CD45RA-CD27+	322,64 +/- 252,69 37,86 - 1206,58 302,56	528,99 +/- 544,20 47,38 - 1660,20 276,49	0,71	absoluto
	4,99 +/- 2,97 0,52 - 13,03 4,29	8,89 +/- 9,00 0,59 - 27,67 5,27	0,49	% total
	47,33 +/- 23,15 10,42 - 90,42 45,14	49,09 +/- 23,56 19,24 - 96,10 44,75	1,00	% parcial
LTCD4 memoria efectora CD45RA-CD27-	112,28 +/- 83,09 17,37 - 330,81 101,77	47,34 +/- 21,46 16,26 - 81,61 43,66	0,071**	absoluto
	1,78 +/- 1,39 0,34 - 6,23 1,70	0,77 +/- 0,36 0,30 - 1,36 0,70	0,031*	% total
	17,14 +/- 12,38 4,36 - 55,50 17,78	7,24 +/- 5,23 2,31 - 16,97 4,98	0,065**	% parcial
LTCD4 efector CD45RA+CD27-	15,91 +/- 26,83 0,00 - 98,35 4,45	3,80 +/- 5,00 0,46 - 15,26 2,03	0,59	absoluto
	0,24 +/- 0,39 0,00 - 1,44 0,05	0,05 +/- 0,06 0,01 - 0,19 0,03	0,58	% total
	3,06 +/- 5,75 0,02 - 19,51 0,55	1,03 +/- 2,04 0,02 - 6,03 0,27	0,43	% parcial
LTCD8 sobre total LTCD3	426,84 +/- 201,30 135,43 - 870,11 417,73	420,09 +/- 188,34 211,36 - 784,57 346,92	0,81	absoluto
	7,29 +/- 3,46 2,91 - 16,83 6,39	7,68 +/- 3,36 3,57 - 16,60 6,80	0,64	% total
	36,79 +/- 9,98 23,39 - 63,71 35,52	36,11 +/- 9,33 24,53 - 53,68 33,82	0,77	% parcial
LTCD8 naive CD45RA+CD27+	84,46 +/- 62,55 0,00 - 241,96 90,23	158,37 +/- 120,30 0,60 - 359,99 150,78	0,17	absoluto
	1,48 +/- 1,27 0,00 - 4,68 1,34	2,84 +/- 2,55 0,01 - 7,86 2,47	0,18	% total
	20,06 +/- 17,03 0,09 - 67,34 15,42	32,33 +/- 19,52 0,05 - 57,75 30,48	0,15	% parcial
LTCD8 memoria central	134,12 +/- 66,79	244,02 +/- 203,05	0,22	absoluto

CD45RA-CD27+	23,73 - 278,01 141,17	43,36 - 598,20 183,36		
	2,21 +/- 1,15 0,42 - 4,58 2,32	3,98 +/- 3,14 0,54 - 9,97 2,96	0,31	% total
	32,57 +/- 17,85 8,69 - 63,46 31,67	44,19 +/- 26,30 15,18 - 97,55 38,59	0,24	% parcial
LTCD8 memoria efectora CD45RA-CD27-	138,75 +/- 88,48 13,80 - 297,44 125,14	50,34 +/- 45,02 6,23 - 124,58 39,54	0,009*	absoluto
	2,16 +/- 1,38 0,27 - 5,34 1,76	0,82 +/- 0,87 0,13 - 2,72 0,55	0,006*	% total
	28,44 +/- 16,50 5,49 - 73,26 31,37	11,08 +/- 10,97 1,94 - 27,73 5,78	0,004*	% parcial
LTCD8 efector CD45RA+CD27-	119,31 +/- 140,45 0,00 - 411,17 44,79	40,96 +/- 54,32 0,00 - 144,66 15,60	0,33	absoluto
	1,95 +/- 2,34 0,00 - 7,46 0,76	0,70 +/- 1,03 0,00 - 3,02 0,30	0,43	% total
	20,16 +/- 19,17 0,03 - 51,69 16,04	12,40 +/- 18,05 0,02 - 44,34 3,36	0,43	% parcial
Cociente CD4/CD8	1,67 +/- 0,68 0,52 - 3,07 1,59	1,75 +/- 0,67 0,65 - 2,82 1,78	0,61	
Subpoblaciones LTCD4				
LTCD4reg CD25++CD127+	43,54 +/- 22,16 13,22 - 102,71 35,43	50,94 +/- 35,48 10,44 - 112,80 31,44	1,00	absoluto
	0,75 +/- 0,41 0,29 - 2,01 0,72	0,95 +/- 0,65 0,13 - 2,32 0,83	0,46	% total
	7,24 +/- 3,89 3,02 - 25,49 6,58	6,59 +/- 1,27 4,29 - 8,65 6,59	0,99	% parcial
LTCD4 CD25-CD127+	557,04 +/- 229,10 228,91 - 1321,40 491,50	705,12 +/- 479,47 211,04 - 1599,60 453,61	0,94	absoluto
	9,51 +/- 3,64 3,59 - 20,68 9,67	12,99 +/- 8,54 2,84 - 30,18 12,96	0,29	% total
	88,71 +/- 6,59 61,09 - 94,61 90,52	90,98 +/- 2,64 82,66 - 92,67 91,72	0,33	% parcial
LTCD4 CD25-CD127-	22,78 +/- 20,26 4,99 - 94,25 15,71	15,13 +/- 10,44 3,79 - 35,28 12,45	0,18	absoluto
	0,39 +/- 0,33 0,10 - 1,38 0,25	0,26 +/- 0,15 0,07 - 0,48 0,26	0,35	% total
	4,06 +/- 3,93 0,98 - 17,13 2,25	2,43 +/- 2,44 0,85 - 10,18 1,75	0,06	% parcial
Subpoblaciones LTCD8				
LTCD8reg CD25++CD127+dim	0,52 +/- 0,69 0,00 - 3,23 0,48	0,14 +/- 0,28 0,00 - 0,81 0,00	0,039*	absoluto
	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,08 0,01	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,031*	% total

	0,15 +/- 0,19 0,00 - 0,78 0,10	0,05 +/- 0,03 0,02 - 0,14 0,05	0,065**	% parcial
LTCD8 CD25-CD127+	257,62 +/- 106,22 37,85 - 518,03 264,65	332,10 +/- 207,46 103,97 - 722,35 267,08	0,56	absoluto
	4,48 +/- 2,06 0,83 - 10,02 4,41	6,03 +/- 3,50 1,46 - 13,78 5,51	0,17	% total
	63,15 +/- 17,36 27,98 - 99,41 63,15	74,29 +/- 19,52 40,91 - 97,90 80,37	0,10	% parcial
LTCD8 CD25-CD127-	168,69 +/- 131,29 1,80 - 567,58 127,96	87,86 +/- 55,43 12,60 - 186,69 64,06	0,042*	absoluto
	2,80 +/- 2,26 0,04 - 10,19 2,22	1,65 +/- 1,03 0,21 - 3,14 1,40	0,17	% total
	36,70 +/- 17,38 0,44 - 71,92 36,72	25,66 +/- 19,54 2,06 - 59,07 19,57	0,11	% parcial
Otras poblaciones T minoritarias				
LTCD3CD4+CD8+	84,63 +/- 61,81 15,05 - 249,56 67,93	70,73 +/- 38,74 23,52 - 151,20 65,84	0,65	absoluto
	1,51 +/- 1,23 0,24 - 5,94 1,06	1,30 +/- 0,65 0,34 - 2,52 1,37	0,87	% total
	7,24 +/- 4,51 2,22 - 19,50 5,25	5,98 +/- 2,51 2,86 - 11,71 5,49	0,83	% parcial
LTCD3CD4-CD8-	5,27 +/- 5,19 0,56 - 23,03 3,37	5,30 +/- 2,96 1,03 - 11,31 4,88	0,36	absoluto
	0,09 +/- 0,11 0,01 - 0,57 0,06	0,10 +/- 0,05 0,02 - 0,16 0,09	0,17	% total
	0,47 +/- 0,42 0,06 - 1,86 0,35	0,45 +/- 0,25 0,15 - 0,99 0,41	0,56	% parcial
LTCD3 TCR gd	61,50 +/- 52,01 4,65 - 233,21 42,51	55,96 +/- 26,73 14,56 - 94,84 51,45	0,65	absoluto
	1,07 +/- 0,89 0,08 - 3,52 0,76	1,07 +/- 0,63 0,26 - 2,49 1,07	0,55	% total
	5,69 +/- 4,12 0,63 - 18,78 4,12	5,17 +/- 3,08 2,27 - 11,67 4,40	0,94	% parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición				
LTCD4CLA+	120,48 +/- 62,72 23,71 - 347,68 122,88	118,01 +/- 76,61 41,44 - 275,40 77,56	0,69	absoluto
	2,03 +/- 0,93 0,52 - 4,89 1,90	2,22 +/- 1,47 0,59 - 5,26 1,60	0,91	% total
	21,41 +/- 8,56 8,50 - 40,86 20,66	17,39 +/- 8,12 6,86 - 37,39 16,38	0,13	% parcial
LTCD4regCLA+	20,76 +/- 10,54 4,56 - 53,33 19,76	19,08 +/- 12,01 4,02 - 42,82 16,00	0,60	absoluto
	0,35 +/- 0,17 0,10 - 0,75 0,35	0,36 +/- 0,21 0,05 - 0,72 0,33	1,00	% total

	48,66 +/- 11,64 32,42 - 70,97 47,91	40,69 +/- 14,76 23,79 - 74,77 39,84	0,042*	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA+</i>	98,44 +/- 46,71 17,37 - 203,51 99,97	87,72 +/- 60,72 21,68 - 191,40 61,25	0,40	absoluto
	1,68 +/- 0,81 0,34 - 3,36 1,58	1,68 +/- 1,28 0,27 - 4,79 1,31	0,55	% total
	18,07 +/- 7,61 7,07 - 40,86 16,27	13,68 +/- 8,02 4,64 - 36,97 12,01	0,033*	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR+</i>	17,82 +/- 11,98 5,17 - 70,39 15,04	13,92 +/- 9,88 5,15 - 42,82 11,16	0,13	absoluto
	0,30 +/- 0,17 0,10 - 0,99 0,27	0,26 +/- 0,15 0,07 - 0,53 0,25	0,44	% total
	16,38 +/- 8,13 5,57 - 42,34 15,19	12,78 +/- 4,15 4,08 - 18,93 13,83	0,21	% parcial
<i>LTCD4CLA+DR-</i>	102,66 +/- 54,26 13,68 - 277,29 102,49	104,10 +/- 71,09 35,84 - 264,00 66,40	0,73	absoluto
	1,73 +/- 0,83 0,30 - 3,90 1,60	1,96 +/- 1,38 0,52 - 4,81 1,35	0,97	% total
	83,62 +/- 8,13 57,66 - 94,43 84,81	87,22 +/- 4,15 81,07 - 95,92 86,17	0,21	% parcial
<i>LTCD4CLA+PDI+</i>	0,72 +/- 0,89 0,00 - 3,97 0,50	0,43 +/- 0,53 0,00 - 1,64 0,37	0,29	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,04 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,04 0,01	0,40	% total
	0,65 +/- 0,74 0,05 - 3,59 0,37	0,49 +/- 0,66 0,09 - 2,49 0,27	0,21	% parcial
LTCD4CLA-	448,01 +/- 178,75 157,16 - 898,29 416,32	634,33 +/- 447,74 201,55 - 1532,40 403,52	0,63	absoluto
	7,67 +/- 2,91 2,02 - 15,44 7,55	11,58 +/- 8,02 2,51 - 28,15 8,81	0,19	% total
	78,59 +/- 8,56 59,14 - 91,50 79,34	82,61 +/- 8,12 62,61 - 93,14 83,62	0,13	% parcial
<i>LTCD4regCLA-</i>	22,78 +/- 14,10 8,48 - 64,90 17,96	31,86 +/- 25,01 6,42 - 78,00 18,48	0,60	absoluto
	0,40 +/- 0,28 0,12 - 1,27 0,32	0,59 +/- 0,48 0,08 - 1,60 0,34	0,30	% total
	51,34 +/- 11,64 29,03 - 67,58 52,10	59,31 +/- 14,76 25,23 - 76,21 60,16	0,042*	% parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA-</i>	458,60 +/- 206,02 207,48 - 1155,65 402,86	617,40 +/- 440,28 183,23 - 1408,20 376,02	0,85	absoluto
	7,83 +/- 3,25 3,03 +/- 17,54 7,72	11,31 +/- 7,94 2,57 - 27,92 8,17	0,32	% total
	81,93 +/- 7,61 59,14 - 92,93 83,73	86,32 +/- 8,02 63,03 - 95,36 87,99	0,033*	% parcial

<i>LTCD4CLA-DR+</i>	17,41 +/- 10,70 3,07 - 48,30 14,72	11,22 +/- 6,46 3,00 - 29,90 10,64	0,050*	absoluto
	0,30 +/- 0,18 0,06 - 0,70 0,24	0,20 +/- 0,08 0,05 - 0,37 0,19	0,15	% total
	4,18 +/- 2,56 1,05 - 9,98 3,45	2,66 +/- 1,91 0,19 - 7,10 2,81	0,060**	% parcial
<i>LTCD4CLA-DR-</i>	430,59 +/- 174,63 149,38 - 868,59 404,13	623,11 +/- 447,61 187,10 - 1529,40 389,55	0,60	absoluto
	7,37 +/- 2,85 1,92 - 14,74 7,12	11,38 +/- 8,03 2,33 - 27,90 8,55	0,17	% total
	95,82 +/- 2,56 90,02 - 98,95 96,56	97,34 +/- 1,91 92,90 - 99,81 97,19	0,060**	% parcial
<i>LTCD4CLA-PD1+</i>	1,23 +/- 2,17 0,00 - 11,38 0,58	0,73 +/- 0,74 0,00 - 2,40 0,59	0,80	absoluto
	0,02 +/- 0,03 0,00 - 0,16 0,01	0,01 +/- 0,02 0,00 - 0,04 0,01	0,70	% total
	0,32 +/- 0,46 0,02 - 2,00 0,16	0,16 +/- 0,17 0,01 - 0,60 0,11	0,20	% parcial
LTCD8CLA+	37,82 +/- 28,85 5,47 - 142,75 27,62	34,52 +/- 37,59 9,56 - 138,17 17,92	0,10	absoluto
	0,64 +/- 0,43 0,12 - 2,09 0,56	0,59 +/- 0,49 0,13 - 1,71 0,42	0,47	% total
	10,45 +/- 5,92 1,58 - 26,56 9,57	8,19 +/- 5,46 2,25 - 19,64 6,49	0,21	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA+</i>	30,45 +/- 17,45 5,02 - 80,59 28,32	34,77 +/- 42,18 5,15 - 159,98 19,71	0,20	absoluto
	0,52 +/- 0,28 0,11 - 1,18 0,48	0,59 +/- 0,53 0,07 - 1,98 0,40	0,62	% total
	12,57 +/- 5,59 2,60 - 23,86 12,76	10,01 +/- 5,93 3,07 - 22,18 7,63	0,19	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA+</i>	8,80 +/- 13,38 0,95 - 66,93 4,55	4,63 +/- 5,00 0,54 - 16,29 2,79	0,13	absoluto
	0,14 +/- 0,21 0,02 - 0,98 0,08	0,10 +/- 0,13 0,01 - 0,40 0,05	0,18	% total
	8,36 +/- 17,74 0,68 - 100,00 4,46	5,42 +/- 3,89 1,41 - 12,70 4,17	0,92	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR+</i>	6,60 +/- 8,18 1,56 - 42,35 4,19	4,46 +/- 5,63 1,63 - 21,82 2,40	0,055**	absoluto
	0,11 +/- 0,12 0,02 - 0,62 0,07	0,08 +/- 0,07 0,03 - 0,27 0,05	0,13	% total
	17,24 +/- 8,26 4,45 - 42,89 16,12	13,70 +/- 6,73 2,53 - 28,43 13,13	0,27	% parcial
<i>LTCD8CLA+DR-</i>	31,22 +/- 21,80 3,19 - 100,40 22,49	32,13 +/- 33,95 10,44 - 116,35 17,39	0,24	absoluto

	0,53 +/- 0,34 0,07 - 1,47 0,47	0,55 +/- 0,45 0,13 - 1,45 0,37	0,76	% total
	82,76 +/- 8,26 57,11 - 95,55 83,89	86,31 +/- 6,73 71,57 - 97,47 86,87	0,27	% parcial
<i>LTCD8CLA+PDI+</i>	0,33 +/- 0,70 0,00 - 3,56 0,00	0,17 +/- 0,24 0,00 - 0,60 0,00	0,48	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,51	% total
	0,80 +/- 0,93 0,05 - 4,00 0,48	0,91 +/- 0,80 0,19 - 2,93 0,70	0,45	% parcial
LTCD8CLA-	340,64 +/- 162,21 104,88 - 698,48 317,70	368,40 +/- 158,61 134,75 - 674,18 347,42	0,53	absoluto
	5,82 +/- 2,80 1,83 - 13,35 5,64	6,71 +/- 3,10 3,51 - 14,72 5,85	0,37	% total
	89,55 +/- 5,92 73,44 - 98,42 90,43	91,81 +/- 5,46 80,36 - 97,75 93,51	0,21	% parcial
<i>LTCD8 CD25-CD127+CLA-</i>	227,18 +/- 101,11 32,83 - 491,67 226,23	297,32 +/- 179,81 90,29 - 609,14 236,40	0,40	absoluto
	3,96 +/- 1,96 0,72 - 9,51 3,94	5,44 +/- 3,27 1,25 - 13,30 5,19	0,14	% total
	87,43 +/- 5,59 76,14 - 97,40 87,24	89,99 +/- 5,93 77,82 - 96,93 92,37	0,19	% parcial
<i>LTCD8 CD127-CLA-</i>	165,41 +/- 120,79 13,75 - 529,15 119,22	83,22 +/- 52,93 11,40 - 183,02 60,37	0,022*	absoluto
	2,75 +/- 2,09 0,29 - 9,50 2,11	1,55 +/- 0,95 0,19 - 2,76 1,38	0,11	% total
	94,80 +/- 3,97 82,53 - 99,32 95,60	94,58 +/- 3,89 87,30 - 98,59 95,83	0,95	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR+</i>	39,54 +/- 27,00 4,74 - 93,91 32,88	26,69 +/- 36,68 0,60 - 120,39 15,33	0,025*	absoluto
	0,64 +/- 0,39 0,10 - 1,54 0,59	0,42 +/- 0,46 0,01 - 1,49 0,32	0,029*	% total
	11,83 +/- 7,48 2,22 - 31,29 9,66	6,78 +/- 6,99 0,14 - 21,54 5,93	0,011*	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR-</i>	301,10 +/- 146,51 72,05 - 646,77 263,71	341,71 +/- 147,84 123,46 - 654,48 324,63	0,37	absoluto
	5,18 +/- 2,62 1,58 - 12,51 4,80	6,29 +/- 3,10 3,27 - 14,29 5,42	0,26	% total
	88,17 +/- 7,48 68,71 - 97,78 90,34	93,22 +/- 6,99 78,46 - 99,86 94,07	0,011*	% parcial
<i>LTCD8CLA-PDI+</i>	1,18 +/- 2,82 0,00 - 12,29 0,40	0,41 +/- 0,55 0,00 - 1,80 0,20	0,45	absoluto
	0,02 +/- 0,04 0,00 - 0,18 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,03 0,01	0,54	% total

	0,35 +/- 0,63 0,01 - 3,00 0,15	0,15 +/- 0,13 0,03 - 0,45 0,09	0,40	% parcial
Poblaciones linfoides B				
LB, sobre total células	123,82 +/- 52,24 30,86 - 274,66 111,64	140,85 +/- 100,66 52,33 - 385,80 104,37	0,73	absoluto
	2,17 +/- 1,05 0,59 - 5,56 1,75	2,47 +/- 1,43 0,82 - 6,43 2,27	0,44	% total
LB inmaduros CD10+CD38+	2,58 +/- 1,97 0,00 - 6,58 1,73	3,31 +/- 3,81 0,00 - 15,35 2,40	0,58	absoluto
	0,05 +/- 0,04 0,00 - 0,13 0,04	0,05 +/- 0,05 0,00 - 0,19 0,04	0,66	% total
	2,07 +/- 1,42 0,07 - 5,21 1,66	2,21 +/- 1,22 0,14 - 4,60 2,13	0,67	% parcial
LB naive CD27-sIgM+	84,48 +/- 43,43 21,44 - 241,07 69,90	97,21 +/- 83,28 42,15 - 297,00 55,86	0,54	absoluto
	1,48 +/- 0,88 0,41 - 4,88 1,23	1,68 +/- 1,19 0,66 - 4,95 1,36	0,71	% total
	67,91 +/- 12,79 33,36 - 87,68 68,12	65,96 +/- 11,44 48,72 - 81,71 65,03	0,49	% parcial
LB memoria CD27+	34,08 +/- 21,69 9,41 - 89,90 27,81	38,91 +/- 16,89 11,24 - 84,00 37,83	0,25	absoluto
	0,59 +/- 0,38 0,18 - 1,36 0,48	0,71 +/- 0,32 0,14 - 1,40 0,68	0,24	% total
	27,68 +/- 13,01 7,35 - 60,18 27,75	30,21 +/- 11,04 11,36 - 48,57 30,05	0,44	% parcial
<i>LB memoria sIgM</i>	20,67 +/- 15,02 3,19 - 59,49 15,90	19,38 +/- 9,97 3,76 - 40,32 18,32	0,77	absoluto
	0,36 +/- 0,27 0,07 - 1,02 0,32	0,35 +/- 0,17 0,09 - 0,72 0,36	0,70	% total
	58,77 +/- 13,75 26,91 - 89,21 59,06	52,35 +/- 12,96 37,62 - 82,22 47,43	0,096**	% parcial
<i>LB memoria sIgG</i>	5,73 +/- 4,49 0,60 - 22,75 5,27	8,71 +/- 7,42 0,00 - 30,00 8,62	0,10	absoluto
	0,10 +/- 0,08 0,01 - 0,32 0,09	0,16 +/- 0,13 0,00 - 0,50 0,13	0,12	% total
	17,59 +/- 8,74 4,02 - 34,43 18,39	22,63 +/- 9,13 0,49 - 37,00 21,84	0,050*	% parcial
<i>LB memoria sIgA</i>	6,01 +/- 4,27 0,00 - 15,74 5,47	6,49 +/- 3,77 2,80 - 16,80 5,54	0,44	absoluto
	0,10 +/- 0,07 0,00 - 0,27 0,09	0,12 +/- 0,07 0,04 - 0,28 0,12	0,36	% total
	18,34 +/- 8,14 0,39 - 38,66 17,39	18,57 +/- 9,44 5,48 - 42,49 18,36	0,81	% parcial
Plasmocitos	2,65 +/- 2,75	4,07 +/- 5,09	0,58	absoluto

CD27++CD38++	0,00 - 11,96 1,56	0,00 - 16,16 2,28		
	0,04 +/- 0,04 0,00 - 0,20 0,03	0,06 +/- 0,06 0,00 - 0,20 0,04	0,41	% total
	2,40 +/- 2,05 0,10 - 6,64 1,38	2,85 +/- 3,10 0,50 - 11,52 1,97	0,81	% parcial
<i>Plasmocitos sIgM</i>	0,68 +/- 0,86 0,00 - 2,99 0,48	0,44 +/- 0,55 0,00 - 1,62 0,40	0,43	absoluto
	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,05 0,01	0,01 +/- 0,01 0,00 - 0,02 0,01	0,54	% total
	22,78 +/- 13,26 0,00 - 57,67 20,49	16,47 +/- 7,95 8,56 - 34,92 14,63	0,11	% parcial
<i>Plasmocitos sIgG</i>	0,04 +/- 0,15 0,00 - 0,71 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,35	absoluto
	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,01 0,00	0,00 +/- 0,00 0,00 - 0,00 0,00	0,35	% total
	5,09 +/- 5,97 0,00 - 29,79 3,42	2,48 +/- 1,76 0,10 - 6,19 1,74	0,19	% parcial
<i>Plasmocitos sIgA</i>	1,34 +/- 1,36 0,00 - 5,98 0,92	2,10 +/- 2,69 0,00 - 8,08 1,08	0,50	absoluto
	0,02 +/- 0,02 0,00 - 0,10 0,01	0,03 +/- 0,03 0,00 - 0,10 0,02	0,39	% total
	47,85 +/- 17,08 0,00 - 74,68 50,34	49,40 +/- 12,12 27,50 - 79,27 47,97	0,76	% parcial
Células NK				
NKCD56+CD3-	222,22 +/- 136,88 45,12 - 499,29 206,86	166,99 +/- 87,61 32,06 - 336,00 162,94	0,29	absoluto
	3,67 +/- 1,99 0,58 - 8,61 3,75	3,04 +/- 1,69 0,70 - 6,43 2,92	0,38	% total
<i>NK precursoras</i>	9,61 +/- 6,01 1,37 - 23,46 8,72	10,40 +/- 7,77 0,80 - 26,66 10,08	0,95	absoluto
	0,17 +/- 0,11 0,02 - 0,39 0,14	0,19 +/- 0,12 0,01 - 0,40 0,18	0,67	% total
	5,61 +/- 4,64 0,48 - 21,38 4,26	7,60 +/- 5,54 0,31 - 18,28 5,92	0,28	% parcial
<i>NK maduras</i>	210,04 +/- 139,05 14,14 - 486,83 199,28	144,41 +/- 79,19 27,94 - 325,92 146,63	0,19	absoluto
	3,44 +/- 2,04 0,32 - 8,50 3,55	2,78 +/- 1,72 0,61 - 6,08 2,44	0,46	% total
	91,71 +/- 15,37 13,97 - 99,52 95,61	91,79 +/- 5,31 81,72 - 98,76 93,34	0,18	% parcial
<i>NK activadas</i>	10,47 +/- 13,33 0,78 - 60,51 7,07	3,60 +/- 2,99 0,56 - 10,50 2,71	0,028*	absoluto
	0,16 +/- 0,16 0,01 - 0,61	0,06 +/- 0,04 0,01 - 0,14	0,033*	% total

	0,11	0,05		
	4,61 +/- 4,57 0,45 - 17,40 2,76	2,84 +/- 2,29 0,37 - 7,44 2,02	0,39	% parcial
Otras poblaciones celulares				
LTCD3CD56+	125,71 +/- 157,24 9,71 - 840,19 73,78	77,56 +/- 40,57 21,20 - 160,33 76,64	0,65	absoluto
	2,40 +/- 3,96 0,19 - 21,88 1,36	1,52 +/- 1,05 0,51 - 3,92 1,12	0,87	% total
	12,45 +/- 16,63 1,58 - 92,46 7,90	8,00 +/- 6,31 2,54 - 23,95 4,82	0,21	% parcial
LTCD3CD56-	907,42 +/- 356,71 68,35 - 1721,43 879,85	1109,29 +/- 616,20 497,95 - 2275,80 882,80	0,65	absoluto
	15,31 +/- 5,84 1,78 - 29,61 15,02	20,15 +/- 10,90 7,07 - 43,83 17,84	0,36	% total
	87,55 +/- 16,63 7,54 - 98,42 92,10	92,00 +/- 6,31 76,05 - 97,46 95,18	0,21	% parcial
CD plasmocitoides	6,41 +/- 3,74 2,13 - 16,54 5,14	7,63 +/- 4,89 1,64 - 19,20 8,03	0,48	absoluto
	0,11 +/- 0,06 0,03 - 0,32 0,10	0,13 +/- 0,08 0,04 - 0,32 0,10	0,42	% total
CD mieloides	11,24 +/- 4,82 2,74 - 25,00 10,28	11,03 +/- 4,74 3,27 - 18,48 12,50	0,98	absoluto
	0,19 +/- 0,08 0,06 - 0,39 0,19	0,21 +/- 0,10 0,06 - 0,37 0,19	0,60	% total
MonocitosDR+CD33+	308,00 +/- 134,71 118,90 - 556,92 264,32	305,81 +/- 175,73 107,57 - 789,42 259,20	0,73	absoluto
	5,09 +/- 1,51 2,32 - 8,19 5,05	5,35 +/- 2,15 2,63 - 9,77 5,07	0,87	% total
<i>Monocitos clásicos</i>	220,83 +/- 92,64 75,71 - 393,82 193,95	216,61 +/- 122,35 54,40 - 496,92 157,80	0,59	absoluto
	3,56 +/- 0,99 1,34 - 5,65 3,55	3,84 +/- 1,74 1,29 - 6,65 3,79	0,74	% total
	70,91 +/- 7,73 56,68 - 84,10 71,50	70,34 +/- 13,90 45,23 - 95,21 73,28	0,86	% parcial
<i>Monocitos intermedios</i>	59,35 +/- 41,87 12,03 - 206,75 46,23	64,52 +/- 58,29 15,11 - 244,02 58,92	0,92	absoluto
	0,96 +/- 0,55 0,23 - 2,84 0,81	1,09 +/- 0,72 0,29 - 3,02 0,81	0,59	% total
	18,32 +/- 6,63 7,23 - 37,15 18,00	20,65 +/- 8,88 4,68 - 30,96 21,18	0,38	% parcial
<i>Monocitos no clásicos</i>	33,03 +/- 24,24 5,75 - 110,21 26,61	24,69 +/- 19,10 0,46 - 61,83 20,04	0,26	absoluto
	0,56 +/- 0,38 0,11 - 1,77 0,48	0,42 +/- 0,28 0,01 - 0,83 0,43	0,36	% total

	10,57 +/- 5,59 3,55 - 25,56 9,43	9,02 +/- 7,37 0,11 - 27,00 6,29	0,27	% parcial
Granulocitos	4073,9 +/- 1275,3 2224,5 - 7523,3 3700,5	3640,1 +/- 1405,0 1778,9 - 6709,1 3107,3	0,25	absoluto
	67,14 +/- 8,03 55,10 - 85,51 66,48	63,99 +/- 13,15 38,84 - 83,55 64,87	0,54	% total
Basófilos	41,67 +/- 18,55 13,5 - 80,35 40,65	37,02 +/- 20,32 10,63 - 78,38 36,18	0,41	absoluto
	0,71 +/- 0,32 0,24 - 1,55 0,66	0,71 +/- 0,48 0,19 - 2,03 0,59	0,62	% total
Eosinófilos	212,89 +/- 214,30 1,70 - 943,40 134,73	145,37 +/- 90,50 10,30 - 310,27 132,60	0,65	absoluto
	3,41 +/- 3,03 0,03 - 12,76 2,35	2,77 +/- 1,85 0,19 - 6,89 2,34	0,98	% total

p<0.05*, p<0.1**. DE: Desviación estándar. Min – Max: intervalo mínimo – máximo. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*.

2.4. OBJETIVO 4:

Analizar la relación de la caracterización inmunofenotípica en sangre periférica con el grado de despigmentación (grado según Vitiligo European Task Force: VETF) y extensión de la enfermedad (superficie corporal afectada según VETF) , así como con su capacidad de progresión (progresión según VETF) o repigmentación (según Vitiligo Potential Repigmentation Index: VPRI), en pacientes con vitiligo no segmentario.

2.4.1 Correlación entre los parámetros inmunofenotípicos y la superficie corporal afectada y grado de despigmentación según VETF del vitiligo en pacientes con VNS.

La superficie corporal afectada se evaluó mediante porcentaje de superficie corporal en los 30 pacientes afectados por VNS (media ± DE: 15% ± 23%; intervalo: 1% - 97%), y el grado de despigmentación según los criterios del VETF (la media ± DE: 6 ± 4; intervalo: 1 – 20).

Para comprobar si existe una relación lineal, y no debida al azar, entre las distintas poblaciones celulares estudiadas y ambos parámetros clínicos hemos utilizado el coeficiente de asociación de Spearman (ρ , ρ). En la Tabla 27 se muestran los resultados con significación estadística para la correlación lineal entre las variables inmunofenotípicas analizadas en sangre periférica y la superficie corporal afectada (primera columna) o el grado de despigmentación (segunda columna). Se considera que la correlación es moderada cuando está en el rango entre 0.5 y 0.8; y elevada cuando está en rango entre 0.8 y 1. Además si tiene signo positivo la correlación es directamente proporcional, y si lo tiene negativo, es inversamente proporcional.

Como se observa en la Tabla 27, pese a que el test de Spearman resultó con significación estadística para algunas variables, en ningún caso la intensidad de la correlación resultó elevada, ya que la totalidad de los valores de ρ en los casos con significación estadística estaba en torno a 0,5, tanto cuando se trataba de valores positivos (relación directamente proporcional) como cuando se trataba de valores negativos (relación inversamente proporcional). Además, para la mayoría de las variables analizadas, los resultados no eran consistentes, ya que frecuentemente se alcanzaba la significación estadística cuando se consideraban bien porcentajes relativos respecto a la celularidad global (% total), o a una de las subpoblaciones mayoritarias (%parcial) de la población concreta analizada, pero con frecuencia esas diferencias no se mantenían cuando se consideraban números absolutos (cels/ μ L) en sangre periférica.

Respecto a la superficie corporal afectada, consideramos que la única variable inmunofenotípica que podría tener un significado clínico sería la población de LTCD8+ naive, que muestra correlación moderada, de valor negativo ($\rho = -0,504$; $p < 0,05$), que significaría que a menor número absoluto de LTCD8+ naive habría una mayor extensión de la superficie corporal afecta.

Respecto al el grado de despigmentación según los criterios del VETF, consideramos que existe consistencia respecto a las células NK activadas (HLA-DR+), en las que se observa una correlación moderada, de valor positivo ($\rho = -0,528$; $p < 0,01$), que significaría que a un mayor número de células NK activadas el grado de despigmentación sería mayor.

Para el resto de variables que alcanzaron la significación estadística, consideramos que se debe ser cauteloso en su interpretación, ya que la correlación es como máximo moderada (en torno a 0,5), y los resultados no son concordantes con los obtenidos cuando se comparan los casos problema con el grupo control, o entre los distintos tipos de pacientes. Sin embargo, también cabría la posibilidad de que la baja potencia de estas asociaciones se debiera al tamaño muestral, y que con series de pacientes más numerosas los resultados sean más consistentes.

TABLA 27. Correlación entre superficie corporal y grado de afectación del vitíligo y parámetros inmunofenotípicos en sujetos con vitíligo no segmentario (n=30).

<i>Poblaciones linfoides T</i>			
	Superficie Corporal afectada	Grado según Vitíligo EuropeanTask Force	
	ρ (rho)	ρ (rho)	
LTCD4regCLA+	-0,021	0,074	absoluto
	-0,114	0,059	%total
	0,504**	0,469**	%parcial
LTCD4regCLA-	-0,432*	-0,256	absoluto
	-0,433*	-0,206	%total
	-0,504**	-0,469**	%parcial
LTCD8 CD127-	0,108	0,378*	absoluto
	0,108	0,394*	%total
	0,227	0,274	%parcial
LTCD8naive	-0,524*	-0,179	absoluto
	-0,497*	-0,179	%total
	-0,400	-0,481*	%parcial
LTCD3CD4-CD8-	0,338	0,356	absoluto
	0,244	0,381*	%total
	0,328	0,287	%parcial
<i>Marcadores de activación e inhibición</i>			
LTCD8CLA-PD1+	0,157	0,407*	absoluto
	0,113	0,388*	%total
	0,137	0,191	%parcial
<i>Poblaciones linfoides B</i>			
LB sobre total células	-0,416*	-0,379*	absoluto
	-0,402*	-0,355	%total
LB naive	-0,354	-0,466**	absoluto
	-0,370*	-0,447*	%total
	0,075	-0,255	%parcial
<i>Otras poblaciones celulares</i>			
NK activadas	0,358	0,528**	absoluto

	0,399*	0,576**	%total
	0,321	0,495*	%parcial
LTCD3CD56+	0,147	0,391*	absoluto
	0,147	0,370*	%total
	0,214	0,268	%parcial
CD mieloides	0,153	0,506**	absoluto
	0,038	0,440*	%total
Monocitos clásicos	0,176	0,386	absoluto
	0,150	0,442*	%total
	-0,002	-0,127	%parcial
Eosinófilos	0,468**	0,227	absoluto
	0,434*	0,186	%total

Correlación de Spearman. * p<0.05 ; ** p< 0.01

2.4.2. Parámetros inmunofenotípicos según el índice de progresión.

Siguiendo los criterios VETF, se establecieron tres grupos según la capacidad de progresión del vitíligo: casos con estabilidad clínica (valor 0) (n=20), casos con progresión menor (valor 1) (n=5) y casos con progresión mayor (valor 2) (n=5). En la Tabla 28 se muestran únicamente las variables para las que se encontró diferencia estadísticamente significativas para estos grupos.

Sin embargo, al analizar los resultados con detalle, se observa que las diferencias no son concordantes para la mayoría de las variables, ya que los resultados del grupo con progresión mayor eran más similares al grupo con estabilidad clínica que al grupo con progresión menor. Probablemente estos resultados estén condicionados por el reducido grupo de pacientes que cumplían criterios de progresión (n=10), que estaban distribuidos de forma homogénea entre el grupo de progresión menor (n=5) y el de progresión mayor (n=5).

También, para algunas de las variables, se daba la circunstancia de que las diferencias eran estadísticamente significativas, pero las poblaciones estaban representadas en frecuencias extremadamente bajas, como en el caso de los LT que expresaban PD1, o que sólo se detectaban diferencias en números relativos y no en números absolutos, como en el caso de los LT que expresaban CLA, por lo que consideramos que estas diferencias estadísticas deben ser interpretadas con cautela.

Tabla 28. Parámetros inmunofenotípicos según el índice de progresión

<i>Poblaciones linfoides T</i>					
Progresión según VETF (-5 – +5)	0 (n=20) Estables	+1 (n=5) Progresión menor	+2 (n=5) Progresión mayor	p-valor	
	Media+/-DE p25 - p75 Mediana	Media+/-DE p25 - p75 Mediana	Media+/-DE p25 - p75 Mediana		
LTCD4 sobre total LTCD3	600,6+/-191,5 481,7 - 671,5 586,0	810,6+/-400,8 459,6 - 518,0 1166,0	527,0+/-153,7 801,9 - 406,4 652,1	0,39	absoluto
	10,5+/-4,1 7,3 - 12,4 10,6	11,1+/-3,5 8,4 - 10,3 14,8	10,6+/-3,8 9,0 - 7,4 14,0	0,90	% total
	56,5+/- 0,7 51,3 - 65,2 56,2	64,1+/-5,7 59,0 - 43,3 69,8	42,9+/-5,6 63,1 - 38,5 47,1	0,010*	% parcial
LTCD4reg (CD25++CD127+)	41,3+/-18,8 28,7 - 52,6 35,4	66,0+/-30,2 39,0 - 27,4 96,3	30,1+/-9,1 59,6 - 23,3 38,2	0,038*	absoluto
	0,7+/-0,4 0,4 - 1,0 0,7	1,0+/-0,6 0,6 - 0,6 1,5	0,6+/-0,2 0,8 - 0,4 0,8	0,48	% total
	6,9+/-2,1 5,3 - 8,4 6,8	10,1+/-8,7 5,5 - 5,9 16,5	5,8/-1,0 6,3 - 5,0 6,5	0,45	% parcial
LTCD8 sobre total LTCD3	398,8+/-184,1 238,2 - 500,2 382,5	408,2+/-258,0 200,2 - 440,0 656,2	557,5+/-201,5 328,4 - 414,0 759,7	0,26	absoluto
	6,9+/-3,2 4,6 - 9,2 6,1	5,4+/-2,1 3,7 - 9,6 7,2	10,8+/-3,6 5,2 - 8,3 13,9	0,046*	% total
	36,2+/-9,9 29,1 - 41,1 34,4	30,7+/-4,2 27,2 - 43,7 35,1	45,2+/-10,0 29,0 - 36,6 54,6	0,038*	% parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición					
LTCD4CLA+	125,1+/-65,7 95,8 - 146,1 127,1	156,3+/-47,7 113,1 - 197,5 160,2	66,3+/-19,5 47,2 - 82,6 71,9	0,013*	absoluto
	2,1+/-1,0 1,6 - 2,7 2,1	2,3+/-0,9 1,6 - 3,3 1,7	1,4+/-0,6 0,9 - 1,9 1,4	0,10	%total
	22,0+/-8,6 17,3 - 25,7 20,9	24,1+/-9,9 16,9 - 32,2 22,3	16,3+/-6,5 11,8 - 21,8 14,3	0,27	%parcial
LTCD4regCLA+	20,2+/-10,6 12,1 - 23,8 19,8	29,9+/-9,4 20,6 - 14,5 39,3	13,9+/-4,0 29,8 - 10,2 17,3	0,026*	absoluto
	0,3+/-0,2 0,2 - 0,5 0,3	0,4+/-0,2 0,3 - 0,3 0,6	0,3+/-0,1 0,4 - 0,2 0,4	0,32	% total
	48,8+/-11,4 36,9 - 58,6 48,8	49,7+/-14,8 36,4 - 48,0 65,0	47,2+/-11,8 45,7 - 35,4 58,7	0,91	% parcial
LTCD4CLA+DR-	105,2+/-54,1 82,8 - 128,1 106,3	140,9+/-47,3 99,5 - 180,0 145,4	54,4+/-20,8 32,4 - 70,9 65,1	0,013*	absoluto
	1,8+/-0,8 1,3 - 2,3 1,8	2,1+/-0,9 1,4 - 3,0 1,6	1,1+/-0,6 0,6 - 1,6 1,3	0,13	%total
	83,1+/-7,8 80,4 - 88,7 84,2	89,3+/-3,9 85,7 - 92,5 90,2	79,9+/-10,8 68,7 - 88,8 84,5	0,14	%parcial

<i>LTCD4CLA-DR+</i>	18,8+/-11,3 9,3 - 28,7 15,3	11,1+/-7,3 3,9 - 18,2 11,6	18,1+/-10,5 8,6 - 29,1 14,9	0,39	absoluto
	0,3+/-0,2 0,2 - 0,4 0,3	0,2+/-0,1 0,1 - 0,2 0,1	0,4+/-0,2 0,2 - 0,5 0,4	0,07	%total
	4,3+/-2,1 2,5 - 5,5 4,3	1,9+/-0,8 1,2 - 2,5 1,8	5,8+/-3,8 1,9 - 9,5 6,5	0,033*	%parcial
LTCD8CLA+	44,4+/-33,0 21,1 - 56,6 34,6	27,5+/-7,1 23,3 - 32,9 24,7	21,7+/-11,1 10,0 - 31,6 25,5	0,28	absoluto
	0,7+/-0,5 0,3 - 0,9 0,7	0,4+/-0,2 0,3 - 0,6 0,4	0,4+/-0,2 0,2 - 0,6 0,6	0,15	%total
	11,8+/-5,9 6,9 - 15,1 10,3	10,2+/-5,8 5,1 - 16,0 8,6	5,3+/-3,4 2,2 - 8,8 4,6	0,034*	%parcial
<i>LTCD8 (CD25-CD127+)CLA+</i>	33,8+/-19,8 20,3 - 41,5 29,3	26,3+/-6,6 20,7 - 26,4 31,3	21,4+/-11,0 27,6 - 9,6 30,7	0,42	absoluto
	0,6+/-0,3 0,3 - 0,8 0,6	0,4+/-0,1 0,3 - 0,5 0,5	0,4+/-0,3 0,3 - 0,2 0,7	0,45	% total
	13,9+/-5,0 10,7 - 16,5 13,9	12,5+/-6,5 7,4 - 5,1 19,0	7,3+/-4,5 10,0 - 3,6 12,0	0,040*	% parcial
<i>LTCD8CLA-DR-</i>	284,1+/-143,2 192,6 - 342,6 259,6	273,3+/-132,6 153,8 - 411,7 235,2	397,0+/-163,4 266,5 - 552,0 348,4	0,28	absoluto
	4,9+/-2,5 2,8 - 6,4 4,7	3,7+/-0,9 2,8 - 4,5 3,7	7,6+/-2,8 5,8 - 10,1 6,3	0,034*	%total
	86,8+/-8,4 80,2 - 93,7 88,7	91,3+/-4,4 87,4 - 94,9 92,2	90,5+/-4,5 86,3 - 93,5 92,9	0,51	%parcial
<i>LTCD8CLA-PD1+</i>	1,661+/-3,300 0,0 - 1,126 0,797	0,142+/-0,247 0,000 - 0,398 0,029	0,081+/-0,181 0,0 - 0,202 0,000	0,036*	absoluto
	0,026+/-0,047 0,000 - 0,020 0,010	0,003+/-0,005 0,000 - 0,008 0,001	0,002+/-0,004 0,000 - 0,005 0,000	0,06	%total
	0,457+/-0,730 0,070 - 0,378 0,195	0,148+/-0,094 0,075 - 0,243 0,125	0,062+/-0,078 0,020 - 0,120 0,030	0,035*	%parcial
<i>Poblaciones linfoides B</i>					
LB memoria sIgM	19,3+/-15,7 8,2 - 24,8 13,0	20,4+/-11,6 10,7 - 32,3 15,8	26,3+/-16,6 13,1 - 41,6 21,8	0,50	absoluto
	0,3+/-0,3 0,1 - 0,5 0,2	0,3+/-0,1 0,2 - 0,4 0,3	0,5+/-0,3 0,2 - 0,8 0,5	0,31	%total
	55,3+/-12,4 44,5 - 63,6 55,9	56,9+/-11,3 46,6 - 67,4 56,8	74,5+/-11,7 62,9 - 85,8 75,2	0,026*	%parcial
LB memoria sIgA	6,3+/-4,5 2,8 - 8,8 6,1	7,2+/-5,1 3,5 - 11,4 6,4	3,7+/-1,7 2,1 - 5,5 3,2	0,28	absoluto
	0,1+/-0,1 0,0 - 0,2 0,1	0,1+/-0,0 0,1 - 0,1 0,1	0,1+/-0,0 0,0 - 0,1 0,1	0,74	%total
	20,3+/-8,7 16,3 - 25,5 20,6	17,7+/-4,4 13,9 - 22,4 16,1	11,2+/-4,5 6,6 - 15,2 12,5	0,030*	%parcial
<i>Otras poblaciones celulares</i>					

LTCD3CD56+	135,9+/-185,8 46,8 -134,0 68,8	68,5+/-75,0 17,6 - 140,6 26,0	142,3+/-68,0 84,5 - 212,6 117,2	0,16	absoluto
	2,7+/-4,7 0,7 - 2,4 1,4	0,8+/-0,8 0,3 - 1,6 0,4	2,9+/-1,6 1,4 - 4,5 2,9	0,048*	%total
	13,7+/-19,6 5,4 - 13,8 7,9	5,0+/-4,6 1,9 - 8,9 3,4	14,8+/-8,3 7,5 - 22,9 13,2	0,05	%parcial

Test Kruskal-Wallis. $p < 0.05^*$. DE: Desviación estándar. p25 – p75: rango intercuartílico. Valores absolutos medidos en *cels/μL*.

2.4.3. Parámetros inmunofenotípicos según la capacidad de repigmentación.

Se utilizó el cociente VPRI para establecer la capacidad potencial de repigmentación, estableciendo tres grupos de pacientes: con baja probabilidad de repigmentación ($VPRI < 1$) ($n=8$), con alta probabilidad de repigmentación ($VPRI > 1$) ($n=3$) y aquellos con $VPRI=1$ ($n=19$). En la Tabla 29 se exponen únicamente los parámetros cuyas diferencias resultaron estadísticamente significativas.

Observamos que el grupo de pacientes con menor capacidad potencial de repigmentación presentaba un descenso de los LTCD4+ totales respecto a los pacientes con $VPRI=1$, niveles que eran aún más altos en los pacientes con mayor probabilidad de repigmentación ($493,2 \pm 137,8$ vs $543,5 \pm 108,6$ vs $690,8 \pm 265,5$ *cels/μL*, respectivamente; $p=0,043$). Un comportamiento similar tienen los LTCD4CD25-CD127+ ($p=0,049$), que es la población mayoritaria cuando se clasifican los LT en base a la expresión de CD25 y CD127.

Observamos también que los pacientes con menor capacidad de repigmentación ($VPRI < 1$) tenían menos formas activadas, en base a la expresión de HLA-DR dentro de los LTCD4 que no expresaban el marcador de afinidad por la piel CLA ($p=0,044$), sin que se detectaran diferencias marcadas entre los casos con $VPRI=1$ y $VPRI > 1$. Se encontraron algunas diferencias significativas en LTCD8CLA+ y DR+, pero consideramos que probablemente son de escasa relevancia por las mismas razones que se han expuesto en apartados anteriores.

No se encontraron diferencias en el resto de poblaciones celulares analizadas en sangre periférica.

Tabla 29. Parámetros inmunofenotípicos según la capacidad de repigmentación

<i>Poblaciones linfoides T</i>					
VPRI	<1 (n=8)	= 1 (n=3)	> 1 (n=19)	p-valor	
	Media+/-DE Min -Max Mediana	Media+/-DE Min -Max Mediana	Media+/-DE Min -Max Mediana		
LTCD4 sobre total LTCD3	493,2+/-137,8 320,5 – 774,0 463,6	543,5+/-108,6 446,0 – 660,5 524,0	690,8+/-265,5 254,5 – 1427,0 631,4	0,043	absoluto
	9,4+/-3,4 4,1 – 15,00 9,5	11,1+/-2,0 9,8 – 13,4 10,0	11,1+/-4,2 5,0 – 22,9 10,3	0,61	%total
	52,4+/-10,6 33,2 – 65,2 54,1	52,5+/-11,0 44,4 – 65,0 48,0	57,3+/-11,6 34,2 – 71,9 60,5	0,38	%parcial
LTCD4 (CD25-CD127+)	420,9+/-140,7 246,3 – 692,5 421,7	495,6+/-108,4 397,6- 612,1 477,0	624,1+/-248,9 228,9 – 1321,4 571,6	0,049	absoluto
	8,1+/-3,4 3,6 – 13,5 8,0	10,1+/-2,0 8,7 – 12,4 9,1	10,0+/-3,9 4,6 – 20,7 9,7	0,51	%total
	84,6+/-10,2 61,2 – 92,2 87,9	90,9+/-1,8 89,1 – 92,7 91,0	90,1+/-4,4 78,2 – 94,6 90,8	0,09	%parcial
<i>Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición</i>					
LTCD4CLA-DR+	9,8+/-5,0 3,1 – 17,6 8,7	20,1+/-10,3 9,9 – 30,6 19,8	20,2+/-11,3 4,7 – 48,3 16,7	0,044	absoluto
	0,2+/-0,1 0,1 - 0,4 0,2	0,4+/-0,2 0,2 – 0,7 0,4	0,3+/-0,2 0,1 - 0,7 0,3	0,08	%total
	3,0+/-1,7 1,1 – 5,6 2,6	5,0+/-3,5 2,4 – 9,0 3,7	4,5+/-2,7 1,3 – 10,0 4,5	0,33	%parcial
LTCD8CLA+DR+	4,6+/-2,5 1,6 - 8,5 5,0	3,5+/-0,7 2,7 – 4,2 3,5	7,9+/-10,0 1,9 – 42,4 4,4	0,58	absoluto
	0,1+/-0,0 0,0 - 0,2 0,1	0,1+/-0,0 0,1 – 0,1 0,1	0,1+/-0,1 0,0 - 0,6 0,1	0,97	%total
	12,2+/-4,4 8,8 – 21,4 10,1	19,8+/-8,5 10,2 – 26,4 23,0	19,0+/-8,9 4,5 – 42,9 17,6	0,044	%parcial
LTCD8CLA-DR+	29,9+/-25,0 7,2 – 71,9 21,1	21,7+/-3,2 18,8 – 25,1 21,2	46,4+/-28,0 4,75 – 93,9 37,3	0,13	absoluto
	0,5+/-0,4 0,1 – 1,3 0,5	0,4+/-0,1 0,4 – 0,6 0,4	0,7+/-0,4 0,1 – 1,5 0,7	0,34	%total
	8,0+/-3,8 3,8 – 13,9 6,5	6,2+/-1,6 4,4 – 7,5 6,7	14,3+/-8,1 2,2 – 31,3 12,3	0,034	%parcial
<i>Poblaciones linfoides B</i>					
Plasmocitos	1,7+/-1,0 0,0 – 3,6 1,6	0,2+/-0,3 0,0 – 0,5 0,2	3,3+/-3,2 0,5 – 12,0 2,1	0,07	absoluto
	0,0+/-0,0	0,0+/-0,0	0,1+/-0,0	0,12	%total

	0,0 - 0,1 0,0	0,0 - 0,0 0,0	0,0 - 0,2 0,0		
	1,7+/-1,1 0,3 - 3,4 1,3	0,2+/-0,1 0,1 - 0,3 0,2	2,9+/-2,3 0,5 - 6,6 2,2	0,043	%parcial

Test Kruskal-Wallis. $p < 0.05^*$. DE: Desviación estándar. Min-Max: intervalo mínimo-máximo. Valores absolutos medidos en *cels/μL*.

2.5. OBJETIVO 5:

Analizar posibles diferencias clínicas e inmunofenotípicas en sangre periférica entre las formas de halo nevus asociado a vitíligo segmentario y halo nevus asociado o no a otras formas de vitíligo.

2.5.1. Diferencias clínicas

Aunque el número de pacientes por grupo era muy escaso, quisimos analizar las posibles diferencias clínicas entre los pacientes que presentaban HN asociado a VNS (n=5) y los que presentaban HN asociado a otras formas de vitíligo (n=13) (Tabla 30).

Como cabía esperar, únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas en la presencia de fenómeno de Koebner y el número de halo nevus que presentaban los pacientes. El fenómeno de Koebner se detectaba en todos los casos de HN asociados a VNS y sólo en 2 del grupo de HN y otros vitíligos, que en ambos casos era vitíligo indeterminado (Tabla 30). Lógicamente, el número de HN era mayor en el grupo asociado a VNS, presentando todos los pacientes de este grupo 3 o más nevus, mientras que sólo aproximadamente la mitad (46%) de los pacientes con HN y/u otras formas de vitíligo tenían 3 o más nevus.

TABLA 30. Diferencias clínicas entre grupos de HN

	VNS+HN (n=5)	HN y otros V (n=13)	p-valor
	n (%)	n (%)	
F. Koebner			0,001
0 No	0 (-)	11(86,6)	
1 I	0 (-)	1(7,7)	
2 II (2A)	4 (80)	1(7,7)	
3 III (2B)	1 (20)	0 (-)	
Número HN			0,035
1	0 (-)	4 (31)	
2	0 (-)	3 (23)	
3	2 (40)	3 (23)	
4	1 (20)	2 (15)	
>=5	2 (40)	1 (8)	

VNS: Vitiligo no segmentario, HN: Halo nevus, V: Vitiligo

2.5.2. Diferencias inmunofenotípicas

No detectamos diferencias que pudieran ser clínicamente relevantes en las variables inmunofenotípicas analizadas en sangre periférica, lo que podría estar condicionado por el pequeño tamaño de la serie (5 vs 13 casos). Aunque se detectaron algunas diferencias significativas (Tabla 31), consideramos que no son consistentes por las mismas razones expuestas en apartados anteriores.

TABLA 31. Diferencias inmunofenotípicas entre grupos de HN

	HN + VNS (n=5)	HN y otros V (n=13)	p-valor	
	Media±DE	Media±DE		
LTCD8reg CD25++CD127+dim	0,65±0,56	0,14±0,28	0,038	absoluto
	0,01±0,01	0,00±0,00	0,022	%total
LB sobre total células	150,00±55,58	122,28±93,74	0,043	absoluto
	2,87±0,60	2,13±1,38	0,027	%total
LB memoria sIgM	36,50±17,61	19,38±9,97	0,043	absoluto
	0,70±0,28	0,35±0,17	0,027	%total
	67,31±10,61	52,35±12,96	0,034	%parcial

HN: Halo Nevus; VNS: Vitiligo no segmentario; V: Vitiligo, LT: linfocitos T; LB: linfocitos B; DE: desviación estándar

2.6. OBJETIVO 6:

Analizar posibles diferencias inmunofenotípicas en sangre periférica según la presencia o no de la comorbilidad asociada en pacientes con VNS

Los pacientes con VNS (n=30) presentaban algunas comorbilidades, siendo las más frecuentes la presencia de alteraciones tiroideas y los antecedentes de atopia.

2.6.1 Alteraciones tiroideas

2.6.1.1. Presencia de hipotiroidismo

Dentro del grupo de VNS en 6 pacientes (20%) presentaban hipotiroidismo concomitante. Aunque también en este caso los grupos de pacientes eran pequeños, quisimos analizar si los pacientes con hipotiroidismo presentaban alguna característica inmunofenotípica diferencial en sangre periférica (Tabla 32).

Encontramos que los pacientes con hipotiroidismo presentaban un mayor número de LTCD4+ que expresaban la molécula de activación HLA-DR, tanto en los LTCD4+ que coexpresaban la molécula de afinidad por la piel CLA ($31,2 \pm 19,7$ vs $14,5 \pm 6,2$ cels/ μ L; $p=0,002$) como en los que eran CLA negativos ($24,9 \pm 7,3$ vs $15,5 \pm 10,7$ cels/ μ L; $p=0,017$).

En el compartimento B de sangre periférica también se detectó en los casos con hipotiroidismo un incremento de la población de plasmocitos que expresan IgA de superficie ($5,8 \pm 4,2$ vs $2,0 \pm 1,8$ cels/ μ L; $p=0,067$).

No se encontraron otras diferencias relevantes en el resto de las poblaciones analizadas.

En la Tabla 32 se muestran únicamente los resultados del análisis inmunofenotípico en los que se alcanzaba la significación estadística en estos dos grupos de pacientes.

Tabla 32. Caracterización inmunofenotípica en pacientes no hipotiroides frente a hipotiroides.

	NO HIPOTIROIDISMO (n=24)	HIPOTIROIDISMO (n=6)	p-valor	
	Media +/- DE p25 - p75 Mediana	Media +/- DE p25 - p75 Mediana		
Poblaciones linfocitos T				
LTCD4regCLA+	18,8 +/- 8,9 11,9 - 22,0 18,5	28,7 +/- 13,7 18,8 - 38,0 25,2	0,08	absoluto
	0,3 +/- 0,2 0,2 - 0,4 0,3	0,5 +/- 0,2 0,3 - 0,6 0,4	0,06	%total
	46,5 +/- 12,0 36,1 - 57,6 42,7	57,2 +/- 4,1 54,1 - 60,6 58,4	0,043	%parcial
LTCD4CLA+DR+	14,5 +/- 6,2 10,0 - 16,9 13,4	31,2 +/- 19,7 19,9 - 41,0 23,4	0,002	absoluto
	0,2 +/- 0,1 0,2 - 0,3 0,2	0,5 +/- 0,2 0,4 - 0,6 0,4	0,001	%total
	15,3 +/- 8,2 9,9 - 16,4 14,3	20,5 +/- 7,2 15,0 - 25,8 19,0	0,049	%parcial
LTCD4CLA-DR+	15,5 +/- 10,7 7,9 - 20,1 13,0	24,9 +/- 7,3 18,8 - 31,4 24,5	0,017	absoluto
	0,3 +/- 0,2 0,1 - 0,4 0,2	0,4 +/- 0,1 0,3 - 0,5 0,4	0,026	%total
	3,9 +/- 2,5 1,8 - 5,4 2,9	5,4 +/- 2,6 3,2 - 8,4 4,5	0,12	%parcial
LTCD8CLA+DR+	6,1 +/- 8,1 2,4 - 6,1 4,2	8,7 +/- 8,9 3,3 +/- 15,4 4,3	0,47	absoluto
	0,1 +/- 0,1 0,0 - 0,1 0,1	0,1 +/- 0,1 0,1 - 0,2 0,1	0,35	%total
	16,0 +/- 8,6 9,9-20,6 12,9	22,1 +/- 4,0 17,5 - 25,5 23,4	0,023	%parcial
Poblaciones linfocitos B				
Plasmocitos	2,0 +/- 1,8 0,6 - 2,3 1,5	5,8 +/- 4,2 2,1 - 9,5 5,7	0,067*	absoluto
	0,03 +/- 0,03 0,01- 0,04 0,02	0,09 +/- 0,07 0,04 - 0,15 0,08	0,048	%total
	1,9 +/- 1,6 0,8 - 2,8 1,3	4,6 +/- 2,6 2,1 - 6,4 6,1	0,05	%parcial
Plasmocitos sIgA	1,0 +/- 0,8 0,5 - 1,1 0,7	2,8 +/- 2,1 0,8 - 4,7 2,7	0,049	absoluto
	0,02 +/- 0,01 0,01 - 0,03 0,01	0,05 +/- 0,03 0,02 - 0,07 0,04	0,015	%total
	45,4 +/- 18,2 36,0 - 57,5 47,2	57,6 +/- 5,2 54,6 - 61,8 58,4	0,06	%parcial

DE: Desviación estándar. p25-p75: rango intercuartílico. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*. p<0.1*.

2.6.1.2. Presencia de anticuerpos antiperoxidasa tiroidea elevados

En 25 de los 30 pacientes con VNS se disponía de información sobre los títulos de anticuerpos aPOT, y en 6 casos (24%) estaban elevados.

Curiosamente, los resultados (Tabla 33) no fueron superponibles a cuando se consideraron los pacientes con hipotiroidismo, y para los pacientes con títulos elevados de aPOT los únicos hallazgos fueron un descenso de los LTCD4 naive ($88,1 \pm 95,2$ vs $269,2 \pm 115,4$ cels/ μ L; $p=0,015$), con un incremento de los LTCD8+CLA+HLA-DR+, que correspondería a LTCD8+ activados (HLA-DR+) y con capacidad de migración a piel (CLA+) ($13,6 \pm 14,6$ vs $5,1 \pm 5,3$ cels/ μ L; $p=0,026$).

No se encontraron otras diferencias estadísticamente significativas, o no se consideraron relevantes, en el resto de poblaciones celulares estudiadas.

Tabla 33. Caracterización inmunofenotípica en pacientes con anticuerpos aPOT normales frente a pacientes con anticuerpos aPOT elevados

	aPOT Negativos (n=19)	aPOT Positivos (n= 6)	p-valor	
	Media +/- DE p25 - p75 Mediana	Media +/- DE p25 - p75 Mediana		
Linfocitos T CD4				
LTCD4 naive	269,2 +/- 115,4 198,1 - 390,6 236,8	88,1 +/- 95,2 0,6 - 184,3 70,9	0,015	absoluto
	4,6 +/- 2,2 3,2 - 6,2 3,9	1,8 +/- 2,3 0,0 - 3,9 1,0	0,027	%total
	43,4 +/- 15,9 29,6 - 60,6 46,2	18,1 +/- 20,5 0,1 - 38,0 14,2	0,020	%parcial
LTCD4 memoria central	226,1 +/- 130,4 66,4 - 318,7 232,8	333,4 +/- 135,8 199,7 - 464,8 338,2	0,13	absoluto
	3,8 +/- 2,2 1,3 - 6,0 4,1	5,7 +/- 2,1 3,8 - 7,7 5,3	0,16	%total
	35,2 +/- 17,4 11,1 - 49,7 40,0	58,4 +/- 16,9 40,5 - 71,9 67,3	0,047	%parcial
LTCD4 efector	17,6 +/- 21,4 1,5 - 23,7 9,3	19,7 +/- 44,0 0,0 - 49,2 0,0	0,060*	absoluto
	0,3 +/- 0,3 0,0 - 0,4 0,2	0,3 +/- 0,6 0,0 - 0,7 0,0	0,059*	%total
	3,5 +/- 5,6 0,2 - 4,7 1,5	3,6 +/- 8,0 0,0 - 9,0 0,0	0,047	%parcial

Linfocitos T CD8				
LTCD8CLA+DR+	5,1 +/- 5,3 2,3 - 5,8 4,1	13,6 +/- 14,6 4,4 - 19,7 9,1	0,026	absoluto
	0,1 +/- 0,1 0,1 - 0,1 0,1	0,2 +/- 0,2 0,1 - 0,3 0,2	0,025	%total
	16,0 +/- 9,2 9,8 - 22,9 12,7	22,0 +/- 4,7 17,5 - 25,3 22,0	0,049	%parcial
LTCD8 (CD25-CD127+)CLA+	28,3 +/- 15,9 17,1 - 37,3 26,4	42,1 +/- 23,9 25,5 - 67,9 29,3	0,23	absoluto
	0,5 +/- 0,3 0,3 - 0,7 0,5	0,7 +/- 0,4 0,4 - 1,1 0,6	0,27	%total
	11,6 +/- 5,3 6,7 - 15,4 12,2	16,2 +/- 4,2 13,1 - 20,1 15,6	0,049	%parcial
LTCD8efector	149,0 +/- 133,4 36,0 - 302,5 126,0	82,7 +/- 183,6 0,3 - 206,0 0,7	0,062*	absoluto
	2,6 +/- 2,4 0,6 - 4,5 2,2	1,2 +/- 2,7 0,0 - 3,0 0,0	0,047	%total
	27,2 +/- 17,2 10,4 - 44,3 28,7	10,5 +/- 23,0 0,0 - 26,0 0,2	0,062*	%parcial

DE: Desviación estándar. p25-p75: rango intercuartílico. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*. p<0.1*.

2.6.2. Antecedentes personales de atopía

Se detectaron antecedentes de atopía en 7 (23%) de los 30 casos con VNS, y se consideraron globalmente todos los pacientes que habían presentado cualquier manifestación de atopía (rinitis, conjuntivitis, rinoconjuntivitis o asma). La Tabla 34 muestra las variables inmunofenotípicas en las que se encontraron diferencias significativas.

Respecto a las poblaciones mayoritarias de LT, se observó que los pacientes atópicos tenían niveles más elevados de LTCD4 (814,0±305,6 vs 565,3±187 cels/μL; p=0,026), y, en relación con la maduración periférica, también estaban elevados los LT de memoria central, tanto del compartimento de LTCD4 (525,3±383,5 vs 250,2±147,4 cels/μL; p=0,042) y como de LTCD8 (199,1±56,9 vs 110,9±54,6 cels/μL; p=0,021). En concordancia con estos resultados, también se observaba un aumento de los LTCD4CD25-CD127+ (p=0,029), que corresponden a LT de memoria, y de los LT

CLA-, tanto CD4 como CD8, y que corresponden a la mayoría de los LT cuando se analizan en base a la expresión de CLA.

Respecto a las poblaciones linfoides B presentes en sangre periférica, detectamos un aumento del total de LB en los pacientes con atopía ($180,3 \pm 62,9$ vs $106,6 \pm 34,5$ cels/ μ L; $p=0,003$), a expensas de LB de memoria ($59,6 \pm 21,0$ vs $26,3 \pm 15,1$ cels/ μ L; $p=0,001$), especialmente de los LB de memoria que expresan sIgM ($39,1 \pm 17,1$ vs $15,0 \pm 8,7$ cels/ μ L; $p=0,001$) y sIgA ($9,5 \pm 4,2$ vs $5,0 \pm 3,8$ cels/ μ L; $p=0,008$).

No se encontraron otras diferencias relevantes en el resto de las poblaciones analizadas.

En la Tabla 34 se muestran los resultados del análisis inmunofenotípico que mostraron significación estadística de este apartado.

Tabla 34. Caracterización inmunofenotípica en pacientes no atópicos frente atópicos

	No atopía (n=23)	Atopía (n=7)	p-valor	
	Media +/- DE p25 - p75 Mediana	Media +/- DE p25 - p75 Mediana		
Poblaciones mayoritarias de LT y marcadores de maduración periférica				
LTCD4 sobre total LTCD3	565,3 +/- 187,6 446,0 - 669,6 524,0	814,0 +/- 305,6 617,3 - 926,5 776,5	0,026	absoluto
	10,1 +/- 4,1 7,1 - 12,1 10,0	12,4 +/- 2,4 10,2 - 15,0 12,5	0,07	%total
	54,6 +/- 11,9 44,4 - 65,4 55,8	58,3 +/- 8,3 51,4 - 65,2 60,5	0,54	%parcial
LTCD4 memoria central	250,2 +/- 147,4 153,0 - 359,4 217,4	525,3 +/- 383,5 314,7 - 814,8 367,6	0,042	absoluto
	4,3 +/- 2,5 2,5 - 6,3 4,1	6,9 +/- 3,6 4,2 - 10,0 6,0	0,14	%total
	44,7 +/- 24,0 25,6 - 58,6 45,1	54,7 +/- 21,1 37,2 - 76,5 45,9	0,52	%parcial
LTCD8 memoria central	110,9 +/- 54,6 59,4 - 150,4 124,1	199,1 +/- 56,9 144,3 - 251,5 203,8	0,021	absoluto
	2,0 +/- 1,1 0,9 - 2,7 2,3	2,8 +/- 1,0 2,1 - 3,7 2,4	0,27	%total
	31,8 +/- 19,4 13,3 - 51,5 26,3	34,8 +/- 14,2 22,4 - 47,9 33,6	0,64	%parcial
Subpoblaciones LTCD4				
LTCD4 CD25-CD127+	501,7 +/- 177,8 397,6 - 587,2	738,9 +/- 295,7 496,5 - 861,9	0,029	absoluto

	477,6	723,8		
	9,0 +/- 3,8 6,3 - 10,7 9,1	11,2 +/- 2,6 8,2 - 14,0 11,6	0,09	%total
	88,3 +/- 7,1 87,3 - 92,2 90,5	90,1 +/- 4,6 88,5 - 93,0 92,5	0,36	%parcial
Expresión CLA y marcadores de activación e inhibición				
LTCD4CLA+	121,4 +/- 70,3 63,0 - 148,8 124,9	117,4 +/- 29,5 90,6 - 138,8 115,9	0,94	absoluto
	2,1 +/- 1,0 1,5 - 2,7 2,1	1,8 +/- 0,4 1,6 - 2,1 1,7	0,45	%total
	23,0 +/- 9,1 16,2 - 27,4 22,0	16,3 +/- 3,6 11,7 - 19,2 18,2	0,033	%parcial
<i>LTCD4CLA+PDI+</i>	0,880 +/- 0,955 0,303 - 1,462 0,540	0,220 +/- 0,279 0,000 - 0,494 0,000	0,031	absoluto
	0,014 +/- 0,012 0,008 - 0,023 0,010	0,004 +/- 0,005 0,000 - 0,010 0,000	0,030	%total
	0,775 +/- 0,816 0,328 - 1,023 0,435	0,276 +/- 0,188 0,110 - 0,490 0,190	0,041	%parcial
LTCD4CLA-	394,9 +/- 137,9 277,4 - 500,1 396,8	622,6 +/- 195,7 457,7 - 885,3 546,0	0,008	absoluto
	7,1 +/- 3,0 4,9 - 8,5 6,3	9,6 +/- 1,9 7,5 - 11,1 9,6	0,029	%total
	77,0 +/- 9,1 72,6 - 83,8 78,0	83,7 +/- 3,6 80,8 - 88,3 81,9	0,033	%parcial
<i>LTCD4regCLA-</i>	20,5 +/- 14,2 11,9 - 23,3 14,9	30,4 +/- 11,3 19,8 - 38,3 30,5	0,026	absoluto
	0,4 +/- 0,3 0,2 - 0,5 0,3	0,5 +/- 0,1 0,4 - 0,6 0,5	0,07	%total
	49,3 +/- 12,2 39,8 - 63,2 44,5	58,1 +/- 6,5 52,1 - 64,0 56,6	0,10	%parcial
<i>LTCD4 CD25-CD127+CLA-</i>	402,7 +/- 147,4 294,1 - 486,1 357,1	642,3 +/- 272,2 395,2 - 789,8 629,2	0,013	absoluto
	7,3 +/- 3,3 4,7 - 8,7 7,5	9,7 +/- 2,5 7,1 - 12,5 10,6	0,05	%total
	80,7 +/- 8,0 75,8 - 86,6 82,2	86,1 +/- 4,2 81,9 - 89,9 86,8	0,08	%parcial
<i>LTCD4CLA-DR-</i>	378,0 +/- 135,0 249,7- 490,4 379,3	603,3 +/- 187,5 430,4 - 850,0 538,7	0,006	absoluto
	6,8 +/- 2,9 4,8 - 8,2 5,8	9,3 +/- 1,8 7,1 - 10,7 9,4	0,026	%total
	95,5 +/- 2,6 93,6 - 97,6 96,0	97,0 +/- 2,0 94,6 - 98,7 98,2	0,15	%parcial
<i>LTCD4CLA-PDI+</i>	1,556 +/- 2,406 0,470 - 1,619 0,915	0,220 +/- 0,279 0,000 - 0,494 0,000	0,008	absoluto

	0,025+/- 0,035 0,010 - 0,030 0,020	0,004+/- 0,005 0,000 - 0,010 0,000	0,007	%total
	0,401+/- 0,500 0,123 - 0,435 0,250	0,086 +/- 0,059 0,020 - 0,160 0,080	0,012	%parcial
LTCD8CLA+	40,9 +/- 31,8 23,5 - 51,8 30,1	27,6 +/- 12,4 20,8 - 33,1 23,2	0,27	absoluto
	0,7 +/- 0,5 0,4 - 0,9 0,6	0,4 +/- 0,2 0,3 - 0,6 0,3	0,20	%total
	11,6 +/- 6,1 8,2 - 15,5 10,1	6,6 +/- 2,9 4,6 - 10,0 5,2	0,029	%parcial
<i>LTCD8</i> <i>CD25-CD127+CLA+</i>	31,1 +/- 17,9 20,8 - 37,3 29,1	28,4 +/- 16,9 19,9 - 30,6 26,4	0,51	absoluto
	0,5 +/- 0,3 0,3 - 0,8 0,6	0,4 +/- 0,3 0,3 - 0,5 0,3	0,39	%total
	13,7 +/- 5,3 10,7 - 16,0 13,8	8,7 +/- 5,0 5,2 - 10,3 6,7	0,033	%parcial
LTCD8CLA-	316,9 +/- 158,9 179,5 - 389,6 293,6	418,5 +/- 159,4 282,6 - 522,3 413,4	0,09	absoluto
	5,6 +/- 2,7 3,0 - 7,6 5,6	6,6 +/- 3,1 4,7 - 6,8 5,6	0,56	%total
	88,4 +/- 6,1 84,5 - 91,8 89,9	93,4 +/- 2,9 90,0 - 95,4 94,8	0,029	%parcial
<i>LTCD8</i> <i>CD25-CD127+CLA-</i>	202,9 +/- 83,7 126,2 - 241,0 215,7	307,1 +/- 118,4 195,6 - 438,9 280,1	0,037	absoluto
	3,7 +/- 1,9 2,1 - 4,7 3,7	4,8 +/- 2,1 3,8 - 4,7 4,0	0,27	%total
	86,3 +/- 5,3 84,0 - 89,3 86,2	91,3 +/- 5,0 89,8 - 94,8 93,3	0,033	%parcial
<i>LTCD8CLA-PD1+</i>	1,512 +/- 3,174 0,00 - 1,12 0,557	0,135 +/- 0,331 0,000 - 0,061 0,000	0,042	absoluto
	0,02 +/- 0,05 0,000 - 0,018 0,01	0,003 +/- 0,008 0,000 - 0,001 0,000	0,06	%total
	0,425 +/- 0,702 0,090 - 0,373 0,195	0,097 +/- 0,102 0,040 - 0,120 0,060	0,07	%parcial
Poblaciones linfoides B				
LB sobre total células	106,6 +/- 34,5 88,9 - 120,6 103,1	180,3 +/- 62,9 138,3 - 265,3 150,5	0,003	absoluto
	1,9 +/- 0,8 1,4 - 2,7 1,6	3,0 +/- 1,4 1,8 - 3,6 2,7	0,05	%total
LB memoria	26,3 +/- 15,1 15,6 - 35,1 21,5	59,6 +/- 21,0 43,3 - 80,1 63,0	0,001	absoluto
	0,5 +/- 0,3 0,2 - 0,8 0,4	0,9 +/- 0,3 0,6 - 1,2 1,0	0,009	%total
	25,3 +/- 12,2 14,9 - 31,8	35,6 +/- 13,2 31,1 - 46,1	0,047	%parcial

	22,4	36,9		
<i>LB memoria sIgM</i>	15,0 +/- 8,7 8,1 - 22,3 12,3	39,1 +/- 17,1 23,9 - 56,5 36,1	0,001	absoluto
	0,3 +/- 0,2 0,1 - 0,4 0,2	0,6 +/- 0,3 0,3 - 1,0 0,5	0,009	%total
	57,2 +/- 14,4 44,3 - 68,3 56,8	64,1 +/- 10,3 55,8 - 74,1 61,3	0,32	%parcial
<i>LB memoria sIgA</i>	5,0 +/- 3,8 2,3 - 6,9 3,6	9,5 +/- 4,2 6,1 - 14,9 7,4	0,008	absoluto
	0,1 +/- 0,1 0,0 - 0,1 0,1	0,1 +/- 0,1 0,1 - 0,2 0,2	0,027	%total
	18,9 +/- 8,6 14,4 - 24,0 17,2	16,6 +/- 6,6 8,6 - 23,1 18,2	0,607	%parcial
Otras poblaciones celulares				
Granulocitos	4076,8 +/- 1289,2 3171,0 - 4760,7 3855,5	4064,2 +/- 1329,0 2890,0 - 5214,5 3362,7	0,86	absoluto
	68,9 +/- 8,0 63,6 - 75,5 68,3	61,4 +/- 5,4 55,9 - 68,1 60,6	0,023	%total
LTCD3CD56-	798,7 +/- 293,9 664,8 - 1032,3 782,2	1264,6 +/- 322,7 1013,9 - 1530,8 1289,6	0,006	absoluto
	13,9 +/- 5,4 11,0 - 19,1 13,6	19,8 +/- 5,3 14,9 - 22,9 18,6	0,033	%total
	86,0 +/- 18,7 82,7 - 94,7 91,8	92,8 +/- 3,2 90,9 - 95,5 94,4	0,36	%parcial

DE: Desviación estándar. p25-p75: rango intercuartílico. Valores absolutos de leucocitos totales en hemograma medidos en *num. cels. x 10⁹/L* y resto en *cels/μL*. p<0.1*.

V. DISCUSIÓN

El vitíligo es un trastorno adquirido de la pigmentación caracterizado por la presencia de manchas acrómicas o hipocrómicas en la piel, el pelo y las mucosas, debido a la pérdida de los melanocitos epidérmicos. Es una enfermedad que afecta al 1% de la población mundial, con una prevalencia similar en hombres y mujeres, y una edad de aparición comprendida entre los 10 y 30 años, aunque puede aparecer en cualquier momento de la vida. El curso de la enfermedad es impredecible y pueden transcurrir períodos estacionarios, producirse repigmentaciones espontáneas o avanzar progresivamente abarcando cada vez una mayor extensión sobre la piel, haciéndose imposible disociar el evidente contraste visual entre la piel afectada y no afectada de una cierta estigmatización social o emocional.

Existen diferentes tipos de vitíligo, siendo el vitíligo no segmentario (VNS) es el tipo más común. Aunque debido a su naturaleza cutánea la enfermedad se conozca desde hace siglos, la causa o el mecanismo por la que desaparecen los melanocitos no se conoce con exactitud. En la actualidad se considera que subyace una etiología autoinmune, aunque están por dilucidar completamente los mecanismos que conducen a la pérdida de tolerancia y desaparición de los melanocitos.

En relación al proceso autoinmune, se especula que tanto el sistema inmune humoral como el celular tendrían una participación directa en la patogenia de la enfermedad (18,114). Así, diferentes trabajos han demostrado tanto la presencia de anticuerpos contra múltiples antígenos expresados en los melanocitos (111,153), como la participación fundamentalmente de linfocitos T CD8 (citotóxicos) en la destrucción de los mismos (70,72,82,111). Se ha sugerido, sin embargo, que la producción de dichos anticuerpos antimelanocito podría ser un fenómeno secundario a la respuesta inmune provocada por la destrucción de los propios melanocitos, y que podría ser utilizado también como un marcador de actividad en la enfermedad (154).

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido caracterizar, mediante citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad (8 colores), las diferentes poblaciones celulares presentes en la sangre periférica que podrían participar en la respuesta inmune en el contexto del vitíligo y/o halo nevus, en un intento de contribuir a profundizar en el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad. Un objetivo complementario ha sido separar, mediante citometría de flujo, subpoblaciones celulares

potencialmente involucradas en la patogénesis de vitíligo, y almacenarlas congeladas, para disponer de una citoteca en la que realizar estudios genómicos y transcriptómicos cuando se disponga de los fondos necesarios.

Nuestra muestra consta de 43 pacientes con vitíligo y/o halo nevus y 10 controles, con una distribución similar de edad y sexo entre casos y controles. En nuestra serie de pacientes existe un ligero predominio del sexo masculino en el grupo de vitíligo no segmentario (VNS) y del sexo femenino en el grupo de halo nevus (HN) y/u otras formas de vitíligo, en contraposición a los datos publicados que no muestran diferencias en la distribución por sexos (26,114), aunque este dato podría estar condicionado por el tamaño muestral de nuestra serie. El resto de variables clínicas analizadas presentan una frecuencia y distribución comparable a la descrita en la literatura en cuanto a edad de inicio, meses de evolución, fototipo, comorbilidades asociadas y antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, en nuestra serie los pacientes muestran baja afectación de la calidad de vida, elevada frecuencia del fenómeno de Koebner, y una mayor frecuencia de vitíligo en los familiares de primer grado de los pacientes con VNS (12%), con respecto a los datos publicados (7%) (6,26,28,43,48). Además, creemos importante señalar que no se ha publicado hasta la fecha ningún trabajo en el que se analice la sangre periférica de estos pacientes mediante análisis multiparamétrico por citometría de flujo de alta sensibilidad (8 colores), ni en el que se estudien de forma tan exhaustiva todas las poblaciones celulares de sangre periférica que se han analizado en el presente trabajo.

Poblaciones mayoritarias de células T

En nuestra serie hemos encontrado que los pacientes con vitíligo muestran valores disminuidos de linfocitos T CD3 y de granulocitos. En la literatura existen resultados discrepantes, ya que algunos autores no han encontrado diferencias entre pacientes con vitíligo y controles sanos en los LTCD3+, LTCD4+, ni LTCD8+ circulantes (96,155), mientras que otros, coincidiendo con nuestros resultados, han encontrado una disminución del número de linfocitos en sangre periférica (156). Tampoco hay datos homogéneos en lo que se refiere a las distintas formas o situaciones de la enfermedad. Así, se ha comunicado que no existen diferencias en los linfocitos T de sangre periférica

entre formas de vitiligo activo y enfermedad estable (157), pero que cuando se comparan en base a la extensión de la enfermedad, los pacientes con vitiligo generalizado tienen niveles superiores de LTCD3+ que en las formas acrofaciales (157).

Aunque la disminución del número de linfocitos en sangre periférica en nuestra serie pudiera parecer un hecho contradictorio, dada la implicación de estas células en los fenómenos autoinmunes, es posible que las altas tasas de renovación de las células T puedan crear un equilibrio dinámico, en el que su expansión se compense con la muerte celular inducida por la propia activación. En este sentido, se ha objetivado (158) que niveles más altos de activación de células T producían con una mayor tasa de muerte inducida por activación, lo que podría estar en relación con los recuentos de leucocitos totales y LT más bajos observados en nuestra serie.

Las poblaciones mayoritarias de LT, los LTCD4+ y LTCD8+, han sido las más estudiadas en pacientes con vitiligo, aunque también existen discrepancias en los resultados publicados. La mayoría de los autores no han encontrado diferencias entre pacientes con vitiligo y controles en cuanto a los LTCD4+ (157,159), aunque en algunos trabajos se detecta un descenso en los porcentajes de LT CD3 y/o CD4 en sangre periférica (76,99,151).

Cuando se evaluó la capacidad de repigmentación en pacientes con vitiligo en base al cociente VPRI (*Vitiligo Potential Repigmentation Index*), observamos que aquellos con menor capacidad de repigmentación tenían menos LTCD4+, lo que podría indicar un papel protector de los LTCD4. Los demás índices empleados en la valoración del vitiligo no proporcionan información acerca de los melanocitos remanentes en cada lesión, ni permiten evaluar la capacidad potencial de repigmentación del paciente. El índice VPRI (*Vitiligo Potential Repigmentation Index*) se basa en la observación de que la repigmentación del vitiligo depende de la existencia de melanocitos viables en la epidermis y especialmente en los folículos pilosos (34,52), donde su presencia está inversamente relacionada con la duración de la enfermedad (26).

En cuanto a la ratio CD4/CD8, nosotros no encontramos diferencias significativas entre los pacientes y controles, ni entre las distintas formas de enfermedad o su actividad,

coincidiendo con algunos autores (85), aunque en otras publicaciones se han comunicado ratios de CD4/CD8 aumentadas (155,160), o disminuidas (76,101,151).

Aunque en nuestra serie los LTCD8+ estaban disminuidos en los pacientes respecto a los controles, numerosos trabajos han encontrado un aumento de los LTCD8+ en SP (70,101,102,157,161,162), aunque también hay autores que otros no encuentran diferencias (76), o incluso, coincidiendo con nuestros resultados, encuentran que los LTCD8+ de la SP están disminuidos (160). Cuando se analizan las formas activas de la enfermedad respecto a las formas estables, algunos autores encuentran que en las formas activas los LTCD8+ están más altos aún que en las formas estables (101).

Es interesante señalar que diferentes estudios han demostrado la presencia de células T CD8+ citotóxica específicas contra los melanocitos en la SP y la piel de los pacientes con vitíligo (102,160,163,164), y también se han observado en SP expansiones de LT CD8 que expresan IFN- γ (165).

Además, la participación del sistema inmune en la patogenia del vitíligo también se apoyan en la detección de infiltrados inflamatorios en la piel perilesional, con presencia de LTCD4+, y LTCD8+, que predominan en la piel afecta sobre la piel sana (160,165–167). También se ha demostrado que en pacientes con vitíligo la ratio CD4/CD8 en la piel afecta es más baja que en la piel sana (160).

Por todo ello, parece claro que los LTCD8 tienen un papel fundamental en la patogenia del vitíligo, y se ha demostrado que la eliminación de los melanocitos por los LT citotóxicos lleva a la despigmentación en el vitíligo.

Linfocitos T reguladores

Los LTreg se caracterizan (18) por la expresión de altos niveles de CD25+ (receptor de IL-2) junto con el factor de transcripción FoxP3. Suponen el 5-10% del total de los LTCD4+ periféricos y su principal mecanismo de acción es mediante interacción directa por contacto célula-célula, con una importante actividad supresora. Para su

identificación, además de CD4, clásicamente se ha empleado la expresión de CD25 y FoxP3 citoplasmático (LT CD4+CD25+FoxP3+), aunque también CTLA-4 (CD152) y CD103 se expresan en su superficie, y se ha demostrado que el marcaje con el antígeno de superficie CD127 es útil para su identificación y superponible en resultados al marcaje con FoxP3 (147–150).

Se ha demostrado en controles sanos que los LTreg son capaces de inducir anergia en los LT CD8 autoreactivos, controlando su proliferación y disminuyendo su producción de citocinas incluso bajo condiciones de restimulación/nuevo contacto con el antígeno in vitro (168), probablemente controlando la función coestimuladora de las células presentadoras de antígeno (168). En la actualidad se acepta que los LTreg controlan los LT autoreactivos induciendo anergia, y por tanto son claves en el mantenimiento de la tolerancia.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la población de LTreg en sangre periférica en pacientes con vitíligo. Estos resultados coinciden con la mayoría de los trabajos publicados, que muestran que los pacientes con vitíligo presentan defectos en el número y función de los LTreg, por lo que se ha postulado que favorecería un aumento de los LTCD8+ citotóxicos con actividad antimelanocito e incluso de los LTCD4+ autorreactivos (18,70). Sin embargo, no todos los resultados publicados en la literatura son concordantes, y aún no se han aclarado los mecanismos la posible interrelación del LTreg CD4+CD25+FoxP3+ y los LTCD8+ en la patogenia del vitíligo.

Así, diferentes autores han observado que en los pacientes con vitíligo el número de *LTreg*, analizados mediante citometría de flujo (CD4+CD25+FoxP3+), está disminuido en la sangre periférica (18,100,101), coincidiendo con una expansión también en sangre de los LTCD8+ (22,70,101,169). Otros autores sin embargo no han encontrado diferencias en los niveles de LTreg en la sangre de pacientes con vitíligo (95,96), e incluso se ha comunicado que los LTreg están aumentados respecto a los controles (97–99).

Cuando se considera la actividad de la enfermedad, parece que los pacientes con vitíligo de aparición temprana, y con lesiones activas o en progresión tienen aún menos LTreg que los pacientes con enfermedad estable (18,99–102,169) y se ha observado que la

disminución de los LTreg se correlaciona con el índice VIDA (169). Sin embargo, también respecto a este punto hay discordancias, ya que otros autores no han encontrado correlación con la extensión ni la actividad de la enfermedad (98), y han observado que en los pacientes que reciben tratamiento con NB-UVB los LTreg disminuyen, pero sin alcanzar los niveles normales (98).

En el presente estudio, no encontramos diferencias respecto a la población de LTCD8+CD25++ CD127+dim, que aunque es mucho menos conocida, también se le han atribuido funciones reguladoras (170). En cualquier caso, la representación de esta población celular en la sangre periférica tanto de los controles como del grupo de pacientes es extremadamente minoritaria, por lo que posiblemente se trata de una población de escasa importancia en este tejido. En nuestro conocimiento no existe ningún estudio en el que se haya analizado la presencia o función de esta población en pacientes con vitíligo.

No podemos dejar de tener en cuenta que el vitíligo es una enfermedad cutánea, y que por tanto es importante conocer si las alteraciones observadas en la sangre se corresponden con lo que ocurre en la piel. En este sentido, tampoco existen resultados homogéneos en la literatura. Así, mientras algunos autores no han encontrado alteraciones de los LTreg en la piel (95,96), otros han observado una llamativa reducción del número de *LTreg* en piel lesional y marginal de pacientes con vitíligo (18,167), e incluso se ha comunicado que existe un incremento de LTreg (97–99). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la piel normal de controles sanos hay porcentajes variables de LT CD3+ FoxP3+ (99), por lo que estos resultados deben interpretarse con cautela.

El vitíligo puede resultar de un defecto en el control de los LT autoreactivos por parte de los LTreg, bien por una disminución en su número, por un defecto en su función, o por ambas cosas. Así, se ha demostrado un defecto en la función de los LTreg de SP en pacientes con vitíligo (99), que apoyaría también la participación de los LTreg en la patogenia de la enfermedad. Los LTreg no serían capaces de suprimir suficientemente la proliferación y la citotoxicidad de los LTCD8 autoreactivos, ya que al estar los LTreg disminuidos numéricamente y con su función alterada, fallarían en el control de los LTCD8 autoreactivos que provocarían la destrucción de los melanocitos.

Es bien conocido que los LTreg juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia periférica mediante la eliminación de los LT autoreactivos. Pero incluso aunque funcionalmente los LTreg en SP no tuviesen ningún defecto intrínseco, cabría la posibilidad de que la disminución de estas células en SP que se han detectado en formas progresivas de vitíligo fuese el resultado de un reclutamiento de estas células regulatorias desde la SP a la piel lesionada en un intento de controlar el mecanismo autoreactivo (99). En este sentido, se ha comunicado un incremento de Treg en la piel perilesional, a pesar de la disminución y la alteración funcional de los LTreg en SP en los mismos pacientes (70).

Poblaciones de células T según su maduración periférica

De acuerdo con su maduración periférica, es posible identificar diferentes subpoblaciones tanto en linfocitos T CD4 como CD8, analizando la expresión de diferentes antígenos. Así, se pueden clasificar en LT naive (CD45RA+ CD27+), LT de memoria central (CD45RA- CD27+), LT de memoria efectora (CD45RA- CD27-), y LT efectoras (CD45RA+ CD27-), en los que se vuelve a expresar el antígeno CD45RA, más característico de células naive, y que tendrían capacidades efectoras muy potentes, y aparecen especialmente en la población de linfocitos CD8 (79,80).

Nuestros resultados muestran que los pacientes con vitíligo tienen niveles inferiores de LT naive, tanto de los LTCD4+ como de los LTCD8+, y no se observan diferencias significativas en los niveles de LT de memoria central, de memoria efectora y efectoras. Existe muy poca información en la literatura sobre estas poblaciones en pacientes con vitíligo, y aunque, coincidiendo con nuestros resultados, algunos autores han encontrado una disminución de los LT naive CD45RA+ en la sangre periférica de estos pacientes (156), otros encuentran niveles normales (157). Respecto a los LT de memoria, también se han comunicado resultados discordantes. Algunos autores han encontrado un incremento de LT de memoria CD45RO+ en la sangre periférica de los pacientes con vitíligo, especialmente en formas severas, mientras que otros han comunicado que las formas localizadas acrofaciales tienen más LT de memoria (CD45RO+) que las formas con vitíligo generalizado (157). Además, en nuestra serie

hemos encontrado una correlación negativa entre la superficie corporal afectada y los LTCD8+ naive de sangre periférica. Con estos datos, se podría interpretar que la disminución de los LT naive en los pacientes responde a un mayor reclutamiento de los LT hacia estadios de maduración más avanzado, en respuesta al contacto con el antígeno, que en estos pacientes sería un autoantígeno.

Algunos autores consideran que la presencia de HN podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de vitíligo, aunque otros opinan que sólo en un subgrupo de pacientes el HN podrían constituir un factor iniciador, y no hay acuerdo en si tendrían un mecanismo de producción inicial diferente (7,59–61). Con el objetivo de conocer la si ambas entidades eran iguales o no en sus patrones inmunofenotípicos en sangre periférica, las hemos analizado por separado. Desde el punto de vista clínico únicamente se encuentran diferencias en el número de HN existentes y en la presencia de fenómeno de Koebner, aunque es probable que no se detecten otras diferencias por el reducido tamaño de la muestra. Desde el punto de vista inmunofenotípico, cuando se analizaron de forma independiente el VNS y el HN, comparándolos con los casos controles, encontramos un aumento de los LTCD8 de memoria efectora en las formas de VNS, y por el contrario una disminución de LTCD4 en los casos de HN asociado o no a otras formas de vitíligo. Cuando se compararon entre sí estas dos enfermedades, encontramos que las formas de VNS mostraban mayores valores de LT de memoria efectora que el grupo de HN, tanto dentro del compartimento CD4 como CD8, lo que podría estar condicionado por una mayor estimulación antigénica de los LT en los pacientes con VNS (156), aunque también es posible que estos resultados puedan estar condicionados por el tamaño de la serie.

Es bien conocido que los pacientes con vitíligo pueden presentar con relativa presencia otros fenómenos autoinmunes. Cuando consideramos la presencia de comorbilidad, encontramos que los pacientes con atopia tenían niveles más elevados de LTCD4, y considerando los estadios de maduración periférica, también estaban elevados los LT de memoria central, tanto CD4 como CD8. Cabe la posibilidad de que, al intercurrir otros fenómenos autoinmunes, los resultados de las poblaciones en sangre sean diferentes.

El CD127 es el receptor de IL-7, que, junto a IL-2, controla la proliferación, la diferenciación y la homeostasis entre LT naive y de memoria. Las señales inducidas por

IL-7 son clave para la maduración de los LT. La unión de IL-7 a su receptor de alta afinidad CD127 produce una regulación al alza de moléculas antiapoptóticas como bcl-2, y favorecen las señales mediadas por TCR, estimulando a los LT recientemente activados a producir IL-2 y a proliferar (150).

En nuestra serie de pacientes existe una disminución de los LT que expresan CD127, tanto de los LTCD4+ como de los LTCD8+. Son los LT naive y los LT de memoria central los que expresan preferentemente CD127, por los que la disminución de LT CD127+ en nuestra serie podría estar en relación con la disminución de LT naive.

Al estar disminuidas las poblaciones CD127+ (R de IL-7) cabría la posibilidad de que existiese un defecto en el control de la homeostasis mediada por IL-7. Sin embargo, en nuestra serie esta disminución de LT CD127+ no se asociaba con diferencias ni en números absolutos ni en relativos de las poblaciones de LTCD4 ni CD8 CD127-, que son las que teóricamente escaparían a la modulación de IL-7 por carecer de su receptor. Se ha descrito que en situaciones de activación linfocitaria puede disminuir la expresión de CD127, y se ha postulado que la expansión de LTCD25-CD127-, tanto en CD4 como CD8, podría considerarse como un marcador de activación inmune crónica o reflejar una activación inmune en el contexto de infecciones víricas (150). Así, en infección por VIH se ha observado una disminución de la expresión de CD127 en LT CD8 y con menos frecuencia en CD4, que se acompaña de aparición de un fenotipo de célula efectora.

Dada la disminución de LT CD127+ encontrada en los pacientes con vitíligo en nuestra serie, cabría la posibilidad de que condicionara una reducción de la capacidad de control de homeostasis por parte de la IL-7, que podría contribuir a una disfunción linfoide T.

Poblaciones de LT CD3+CD4-CD8-

En nuestra serie hemos encontrado una disminución de la subpoblación T minoritaria CD3+CD4-CD8-. Estas células suponen menos del 5% del total de linfocitos T de la sangre periférica, son células postímicas maduras aunque carecen de los marcadores CD4 y CD8, y tienen un papel relevante en fenómenos de inflamación y

autoinmunidad. Así, son capaces de inducir tolerancia inmune, inhibir la actividad de LTCD4 y LTCD8 citotóxicos autorreactivos, e inducir la apoptosis, también en linfocitos B, causando un descenso de las inmunoglobulinas IgG e IgM (171,172). Se ha objetivado sin embargo, que los pacientes con lupus eritematoso, artritis reumatoide juvenil o enfermedad mixta del tejido conectivo, muestran un incremento en esta población, que podría estar relacionada con un mecanismo de compensación frente a la disminución de apoptosis linfocitaria en estas enfermedades (173), y se ha sugerido que su control podría ser relevante para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (174).

En nuestro conocimiento, no existe ninguna información en la literatura en la que se hayan investigado esta subpoblación T en pacientes con vitíligo. Sin embargo, es posible que puedan tener también un papel relevante, y que al estar disminuidas en los pacientes contribuyan a una falta de control de los mecanismos autoinmunes que conducen a la destrucción final de los melanocitos.

Expresión de CLA

El antígeno CLA (*Cutaneous Lymphocyte associated antigen*) es un importante epítipo de migración a la piel que se puede expresar en LT, y favorece el desplazamiento de las células desde la sangre hacia la piel, fenómeno en el que también participan otros receptores como CCR4 y CCR10. En diferentes trabajos publicados se ha sugerido que los LTCD8CLA⁺ tienen un papel importante de en la patogenia de enfermedades autoinmunes como alopecia areata (175) y la psoriasis (176), y también se ha objetivado la presencia de LTCLA⁺ formando grupos en la vecindad de áreas carentes de melanocitos en el margen de las lesiones de vitíligo (177).

En nuestra serie, respecto a la expresión de CLA en los linfocitos de sangre periférica, únicamente encontramos un aumento en números relativos tanto de los LTCD4CLA⁺ como de los LTCD8CLA⁺, sin que se detectaran diferencias en números absolutos. Sí se detectaron algunas diferencias en la expresión de CLA en otras poblaciones minoritarias, como los LTreg (CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁺dim), los LT con marcadores de activación (HLA-DR⁺) o los LT que expresaban PD1⁺ (*Programmed cell death 1*). Sin

embargo, estas diferencias no se mantenían cuando se consideraban números absolutos, y en cualquier caso, aunque se alcanzaba la significación estadística, los porcentajes eran bastante similares y estaban representados en frecuencias muy bajas, por lo que consideramos que estos resultados no deben interpretarse como definitivos y deberían confirmarse en otros estudios. Especial interés podría tener el hecho de que hayamos encontrado un incremento relativo en los LTreg que expresan CLA en la sangre de los pacientes con vitíligo, que potencialmente tendrían más capacidad de migración a la piel, en un intento de controlar a los LTCD8 autorreactivos.

Existen diferentes trabajos en la literatura que analizan la expresión de CLA en linfocitos de sangre periférica en pacientes con vitíligo. Respecto a los LTCD4+, la expresión de CLA en LTCD4+ ha sido poco estudiada, aunque se ha comunicado que los pacientes con vitíligo tienen niveles similares de LTCD4+CLA+ que los controles (85), y que es posible generar LTCD4+CLA+ en presencia de antígenos melanocitarios (166).

Respecto a los LTCD8+, se ha sugerido que los LT CD8+CLA+ son los responsables de la destrucción de los melanocitos en el vitíligo (102), ya que se ha observado un predominio de LTCD8CLA+ en los linfocitos que se localizan próximos a los melanocitos en la piel de los pacientes con vitíligo, que, además de CLA, también expresan moléculas efectoras de citotoxicidad como la perforina o la granzyma. También se ha descrito un incremento de LT CD8+CLA+ circulantes que tienen mayor expresión de granzyma y perforina en los pacientes con vitíligo (178), aunque otros autores han comunicado hallazgos en sentido contrario, con una disminución de LTCD8+CLA+ en la sangre periférica, que además no se modifica cuando los pacientes reciben tratamiento (85).

Un hallazgo interesante es que se ha observado que la respuesta proliferativa in vitro de los LTCD8+CLA+ circulantes en SP de pacientes con vitíligo en presencia de LTreg es significativamente mayor en los pacientes con vitíligo activo que en los pacientes con vitíligo estable o los controles sanos (102). Además, los LTreg de pacientes con vitíligo activo muestran menor capacidad inhibitoria sobre los LTCD8+CLA+ que los pacientes con enfermedad estable o los controles sanos (102).

Así, los LTreg no serían capaces de suprimir suficientemente la proliferación y la

citotoxicidad de los LTCD8 autoreactivos en pacientes con vitiligo, ya que al estar disminuidos y con su función alterada, fallarían en el control de los LTCD8 autoreactivos que provocarían la destrucción de los melanocitos.

Expresión de HLA-DR

El HLA-DR es un marcador que se expresa predominantemente en monocitos y en linfocitos B. No se detecta en las células T normales cuando están en reposo, pero sí en los LT activados, por lo que se emplea como un marcador de activación del sistema inmune.

En la presente serie, no hemos encontrado diferencias en la expresión de HLA-DR respecto a los controles en ninguna de las poblaciones analizadas. Nuevamente, también hay discrepancias en los datos publicados, ya que algunos autores han encontrado un incremento de LT activados en la SP de los pacientes con vitiligo (76,179), mientras que otros los encuentran disminuidos (151).

Cabría esperar que existiese una relación entre la expresión de HLA-DR en los LT de la sangre periférica y las formas más agresivas de la enfermedad. Sin embargo, en nuestra serie no hemos encontrado diferencias entre las distintas formas de enfermedad ni el grado de extensión de la misma. Tampoco en la literatura hay resultados concordantes, ya que mientras algunos sugieren que hay más LT activados en las formas severas (156), otros autores no observaron diferencias al comparar formas de vitiligo segmentario vs no segmentario (151).

Al analizar las comorbilidades de los pacientes con vitiligo, encontramos que aquellos que presentaban alteraciones tiroideas tenían un mayor número de LTCD4 activados que expresaban la molécula HLA-DR, mientras que aquellos en los que únicamente se detectaban elevados los anticuerpos antiperoxidasa tenían un descenso de LTCD4 naive y un aumento de LTCD8 activados (HLA-DR+) con capacidad de migración a la piel (CLA+). Debido a la relativa inconsistencia de estos resultados, consideramos que deben interpretarse con cautela, ya que podrían corresponder a un epifenómeno. No existen en nuestro conocimiento estudios en los que se analice la comorbilidad de estos

pacientes en relación con los patrones inmunofenotípicos de las células implicadas en la respuesta inmune.

Respecto a los marcadores de activación en los LT de la piel perilesional en pacientes con vitíligo, se ha observado que los LTCD8⁺ perilesionales tienen marcadores de activación, son capaces de inducir apoptosis de los melanocitos cuando se co-cultivan *in vitro*, y son más activos que los LTCD8⁺ obtenidos de la SP de los mismos pacientes (180).

Todos estos datos apoyan el importante rol de los LTCD8⁺ en la patogenia del vitíligo

Expresión de PD-1

La molécula PD-1 (*Programmed cell death-1*) es un conocido marcador de inhibición que actúa como regulador negativo sobre los LT efector limitando la respuesta inmune (21). Son los LTreg los encargados de ejercer la supresión mediada por PD-1, que se expresa en los LT o LB autorreactivos, gracias a la presencia en LTreg de los ligandos de PD-1 (PDL1 y PDL2). Esta unión inhibiría la proliferación e induciría la apoptosis de las células autorreactivas, favoreciendo así la tolerancia inmune.

En nuestra serie, no hemos encontrado diferencias relevantes en la expresión de PD-1 en los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con vitíligo, ya que la presencia de esta molécula en las diferentes poblaciones analizadas era tan escasa que aunque se alcanza la significación estadística, consideramos que estos resultados no deben interpretarse como definitivos.

En nuestro conocimiento sólo hay un trabajo que analice la expresión de PD-1 en la sangre periférica de pacientes con vitíligo. En este trabajo se describe un descenso en el porcentaje de LTCD4^{reg} con un incremento de LTCD4^{reg}PD-1⁺ en pacientes con vitíligo generalizado, por lo que estos autores sugieren que el eje PD1/PDL-1 pueda tener un papel en el agotamiento o el déficit funcional de los LTreg en los pacientes con vitíligo (22).

Esto podría ser importante, porque en la actualidad se dispone de nuevos fármacos que actúan inhibiendo el eje PD1/PDL1, y podrían ser una potencial diana terapéutica que evitase la disminución de los LTreg y potenciase su función como controladores de los LTCD8+autoreactivos causantes de la destrucción de los melanocitos.

Poblaciones de Linfocitos B

Dentro del compartimento de células B de sangre periférica, tanto en los pacientes como en los controles, fue posible identificar todos los estadios madurativos que están presentes en este tejido (181), incluso los compartimentos minoritarios de linfoplasmocitos (o plasmablastos) y de células B inmaduras, y nuestros resultados reproducen mayoritariamente los resultados publicados en sangre normal (181,182).

Las células B inmaduras suponen aproximadamente entre el 1-4% del total de células B en sangre periférica, se ha descrito que pueden aumentar en condiciones de autoinmunidad, en enfermedades con componente autoinmune, y durante la reconstitución post trasplante, y este incremento se ha asociado a una disminución del número de LB de memoria (183). En nuestra serie no hemos encontrado cambios en las células B inmaduras dentro del compartimento B de la sangre periférica, aunque sí detectamos una disminución porcentual de LB de memoria (CD27+), que no se mantenía cuando se analizaban los números absolutos.

Respecto a los linfoplasmocitos, se ha comunicado que suponen aproximadamente el 1-3% del total de células B circulantes en sangre periférica en adultos sanos en situación basal, que expresan en su mayoría IgA de superficie, y que pueden aumentar tras vacunación o en el contexto de respuesta inmune (181,184). En nuestra serie, de forma similar al caso de los LB de memoria, encontramos que los pacientes con vitiligo tenían porcentualmente menos linfoplasmocitos que expresan sIgM, diferencias que tampoco se mantenía al analizar números absolutos.

Sin embargo, al analizar las comorbilidades de los pacientes con vitiligo, encontramos que aquellos que presentaban alteraciones tiroideas tenían un mayor número de plasmocitos circulantes, y los pacientes con atopía, mayor número de LB de memoria.

Aunque no hemos encontrado en la literatura series que analicen patrones inmunofenotípicos y comorbilidades de componente inmune en pacientes con vitiligo, se ha descrito una expansión en sangre periférica de linfocitos B de memoria y plasmocitos en pacientes con dermatitis atópica y con psoriasis (185), lo que podría ser reflejo de una mayor estimulación B.

Dado que las diferencias en el compartimento B en nuestra serie únicamente se detectaban cuando se consideraban números relativos y no se mantenían al analizar números absolutos y que la presencia de estas poblaciones en sangre periférica es muy minoritaria, nuestros resultados parecen sugerir que las células B, al menos las de este tejido, tendrían un papel secundario en la patogenia del vitiligo.

Cabría plantear que nuestros resultados se contraponen con el hecho de la producción autoanticuerpos antimelanocito en la patogenia del vitiligo (1,26,108,110), aunque está aún por determinar si estos anticuerpos son causa o consecuencia de la enfermedad (154). Recientemente se ha comunicado que el *factor activador de los linfocitos B (FALB)*, perteneciente a la familia del TNF, es capaz de activar LB autorreactivos que pueden producir anticuerpos antimelanocito, y actuar como adyuvantes en la activación de LTCD4+, capaces de estimular a su vez a los LTCD8+ autorreactivos que responderán frente a los antígenos melanocitarios. Así, se ha sugerido que FALB, capaz de estimular células B y T, podría participar en los fenómenos de autoinmunidad que causan el vitiligo (186).

Poblaciones de Células NK

Dentro de las células NK de SP, se pueden identificar dos poblaciones en base a la expresión de CD56 y CD16. Así, se puede identificar una población mayoritaria que expresa CD56 y CD16 (CD56+CD16+), y otra menos representada de células NK que expresan de forma intensa el antígeno CD56, con expresión débil o negativa de CD16 (CD56++ CD16-/low). Las células CD56+ son las que tienen principalmente capacidad citotóxica, mientras que las células CD56++ participan en la inmunoregulación mediante la producción de citocinas (187). La mayoría de los autores están de acuerdo en que la población CD56++ correspondería células NK inmaduras, precursoras de las CD56+, que serían las terminalmente diferenciadas. Así, la maduración de las células

NK se caracteriza por una regulación a la baja de CD56, junto a la adquisición de CD16 y de moléculas KIR (187).

En nuestra serie, no hemos encontrado diferencias en el porcentaje ni el número absoluto de las células NK de sangre periférica. En la literatura también se han comunicado resultados discrepantes respecto a las células NK en pacientes con vitíligo. Algunos autores han encontrado aumento de células NK en la sangre de pacientes con vitíligo (75,76,157,161), mientras que otros no encontraron diferencias (159,188), e incluso se ha descrito que pueden estar disminuidas (156).

Es interesante también señalar que un estudio ha demostrado, mediante análisis transcriptómico de muestras de piel con vitíligo comparado con piel normal (74), que existe una expresión disminuida o ausente de genes relacionados con la melanogénesis, pero también sobreexpresión de genes relacionados con defectos del sistema inmune innato y especialmente relacionados con células NK.

Lo que sí hemos detectado en nuestro estudio, es un aumento de células NK que expresan HLA-DR, un marcador clásico de activación en linfocitos T. También en células NK la expresión de HLA-DR se ha empleado como un marcador de activación, ya que su expresión aumenta en respuesta a IL-2, se ha observado que las células NK HLA-DR⁺ tienen una mayor capacidad citolítica, y son capaces de presentar los antígenos a las células T, estimulando su proliferación. Además, se ha detectado un incremento de células NK HLA-DR⁺ en situaciones de inflamación crónica, y se ha sugerido que podrían tener un papel proinflamatorio, especialmente durante el inicio y la amplificación de la respuesta inflamatoria (189). Además, es bien conocido que las proliferaciones clonales de células NK que se comportan como síndromes linfoproliferativos crónicos puede cursar con múltiples manifestaciones autoimunes como tiroiditis, artritis psoriásica, escleritis, síndrome de Sjogren y también vitíligo (190).

En nuestra serie además hemos encontrado que existe una correlación, aunque es moderada, entre el número de células NK activadas (HLA-DR⁺) y el grado de despigmentación según los criterios del VETF.

Cabría por tanto la posibilidad de que las células NK activadas también tuviesen un papel relevante en la patogenia del vitíligo.

Linfocitos T-NK

Otra de las poblaciones linfoides poco representada en la sangre periférica normal son los LT CD56+, también conocidos como células T-NK (NKT cells). Las células T-NK son capaces de producir rápidamente citocinas como IL-4 e INF- γ en respuesta a un estímulo, pueden facilitar la producción de anticuerpos por parte de las células B, y se ha sugerido también que pueden participar en la respuesta inmune innata. Las células T-NK contienen diferentes subpoblaciones, una de las cuales es la que se conoce como “invariant” NKT (iNKT). Estas células iNKT son una población muy minoritaria de linfocitos CD3+ que expresan CD1d, que se han mantenido estables a lo largo de la evolución de los mamíferos y que tienen funciones tanto reguladoras como efectoras en una amplia variedad de respuestas inmunes. Sin embargo, el papel de las células T-NK en la respuesta inmune en humanos, en condiciones normales o en enfermedad, aún no ha sido aclarado (191).

En nuestra serie, encontramos una disminución de los LTCD56+ en la sangre periférica de los patients con vitíligo, coincidiendo con los resultados de otros autores que han comunicado un descenso de estas células en pacientes con vitíligo (156), y en otras enfermedades de naturaleza autoimmune como la artritis reumatoide (192). Sin embargo, también se han comunicado resultados en sentido contrario, con un incremento en los porcentajes de CD3+CD56+CD16+ en la SP de los pacientes con vitíligo (157). Otros autores (96) han encontrado una disminución en la subpoblación de células iNKT cells en la SP de pacientes con vitíligo vs controles en la SP.

Estos resultados sugieren que las células T-NK también pueden tener un papel en la patogenia del vitíligo.

Células dendríticas plasmocitoides

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno que se originan en médula ósea pero están presentes en numerosos tejidos. En la sangre periférica, existen diferentes poblaciones de CD, que son diferentes tanto fenotípica como funcionalmente. Las dos poblaciones principales son las CD linfoplasmocitoides, que se pueden caracterizan fenotípicamente por la expresión intensa de HLA-DR y CD123 (IL-3R) en ausencia de CD11c, y las CD mieloides, que son CD11c+, CD33++, CD123low, y HLA-DRlow (193). Funcionalmente, las CD plasmocitoides pueden producir niveles muy altos de IFN en respuesta a estímulos, activar a las CD mieloides, y estimular a los LT a producir IFN- γ y IL-10 (194,195). También parecen tener efecto sobre la activación de las células B y el desarrollo de autoinmunidad humoral *in vivo*, y se han relacionado con la génesis de autoanticuerpos en modelos experimentales de lupus eritematoso sistémico (196). Además, se ha demostrado que pueden también jugar un papel en la tolerancia periférica, ya que son capaces de favorecer la generación de LTreg (194,195). En este sentido, también se ha observado en controles sanos que los LTreg son capaces de inducir anergia en los LT CD8 autoreactivos, controlando su proliferación y disminuyendo su producción de citocinas, incluso bajo condiciones de restimulación/nuevo contacto con el antígeno *in vitro* (168), probablemente controlando la función coestimuladora de las células presentadoras de antígeno (168). Estos datos sugieren que existirían interacciones entre las CD y los LTreg que serían claves en el mantenimiento de la tolerancia.

En nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan analizado las poblaciones de CD en la sangre periférica de pacientes con vitíligo. Sí que se han publicado algunos trabajos en los que se analiza la piel de estos pacientes, y se ha observado (73) la presencia de células dendríticas plasmocitoides (pDC) infiltrando lesiones de vitíligo en progresión, con una evidente producción local de interferón alfa (IFN- α), que conduciría a la activación y reclutamiento de células T. Otros autores han mostrado que las lesiones cutáneas tempranas tienen una infiltración preferente por células dendríticas, mientras que las lesiones mas establecidas tienen mayores proporciones de linfocitos T (197), lo que sugiere que en fases iniciales las células presentadoras de antígenos expondrían moléculas que provocarían como un efecto secundario una autorreactividad de LT que conduciría a la destrucción de los melanocitos.

En nuestra serie hemos encontrado una disminución significativa de CD plasmocitoides en la sangre periférica de los pacientes con vitíligo. Cabría entonces la posibilidad de que esta disminución de CD participase en mecanismos que tuviesen como consecuencia final la disminución de los LTreg, que no podrían controlar a los LTCD8+ autoreactivos que causarían la destrucción de los melanocitos y la aparición del vitíligo. Las pDC serían por tanto un nuevo factor clave en los mecanismos patogénicos de vitíligo con potenciales consecuencias terapéuticas.

Monocitos

Los monocitos se originan en la médula ósea, y salen posteriormente a sangre periférica donde circulan durante unos días hasta que pasan a los tejidos, madurando a distintos tipos de macrófagos. Los monocitos y macrófagos son importantes células en la respuesta inmune, actúan como presentadoras de antígenos y tienen importantes funciones en la homeostasis, y la defensa inmune. En la actualidad, se recomienda subdividir a los monocitos de sangre periférica en tres subtipos en base a la expresión de CD14 y CD16. Los monocitos “clásicos” son los más numerosos en la sangre, y se caracterizan por la expresión intensa de CD14 en ausencia de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁻). Los monocitos “intermedios” muestran también altos niveles de CD14, pero expresan CD16 en baja intensidad (CD14⁺⁺CD16^{low}). Sin embargo, los monocitos “no clásicos” o monocitos inflamatorios expresan CD16, tienen niveles más bajos de CD14 (CD14^{low} CD16⁺) y suponen aproximadamente el 10% del total de monocitos en sangre periférica normal (193). Se ha observado que durante el curso de algunas infecciones se produce un aumento de primero de monocitos intermedios y posteriormente de monocitos “no clásicos”, lo que demostraría éstos últimos son las formas más diferenciadas presentes en la sangre periférica. Se ha demostrado que los monocitos “intermedios” y los “no clásicos” aumentan en situaciones de inflamación y pueden diferenciarse hacia células dendríticas in vitro e in vivo (193). También se ha demostrado que los monocitos “no clásicos” son claves en la patogenia de la arterioesclerosis, pueden estar alterados en enfermedades autoinmunes y tienen funciones moduladoras sobre los monocitos “clásicos” y las células T (198–200), e

incluso se ha sugerido que podrían ser una diana terapéutica en enfermedades inflamatorias mediadas por IL-17 (201).

Existe muy poca información sobre el posible impacto de las diferentes poblaciones monocitarias en sangre periférica en pacientes con vitíligo. En nuestra serie hemos encontrado una disminución de monocitos en sangre periférica en los pacientes con vitíligo, a expensas de los monocitos clásicos, sin que hayamos encontrado diferencias en los monocitos “intermedios” ni los “no clásicos”. Cabría pensar que esta disminución podría estar en relación con un mayor reclutamiento de estas células en la piel lesionada, al menos en las fases iniciales. En un modelo animal de melanoma, se ha demostrado que los casos que desarrollan vitíligo tienen menos LT CD4⁺reg en piel y otros tejidos, así como una acumulación de monocitos inflamatorios y células dendríticas en la piel, por lo que se ha sugerido que los LTreg también actuarían modulando las funciones de los monocitos y las células dendríticas como presentadores de antígenos (202).

VII. CONCLUSIONES

- 1- Los patrones inmunofenotípicos encontrados en la sangre periférica de los pacientes con VNS y/o HN en la serie son concordantes con la participación del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad, que parece involucrar a diferentes tipos celulares. Además, los hallazgos tanto en pacientes con VNS como con HN asociado o no a otras formas de vitiligo eran muy similares, con mayores diferencias respecto a la normalidad en los pacientes con VNS. Nuestros resultados por tanto apoyan la hipótesis de una patogenia común en ambas enfermedades.

- 2- Las poblaciones mayoritarias de linfocitos T CD4 y CD8 están disminuidas en la sangre periférica, lo que podría sugerir que existe un reclutamiento de estas células hacia la piel como órgano diana en esta enfermedad. Un resultado de nuestro trabajo que consideramos de especial relevancia es la detección de niveles disminuidos de LT CD4 reguladores en sangre periférica, que podría ser determinante en el fracaso de los mecanismos de control de los LTCD8 citotóxicos autoreactivos que se han implicado en la destrucción de los melanocitos. Aunque los resultados son muy preliminares, los LTreg con afinidad por la piel (CLA+) estaban aumentados, aunque sólo en números relativos, lo que podría reflejar un intento de control no efectivo en LTreg que tendrían más capacidad de migración a la piel.

- 3- Considerando los LT de acuerdo a su maduración periférica, existe una disminución de LT naive, tanto de los LT CD4+ como de los LT CD8+, lo que podría sugerir una evolución hacia formas más maduras debido al estímulo del contacto con el antígeno. Cuando se consideraban en exclusiva los casos de HN, las diferencias respecto a los controles eran menos marcadas.

- 4- La población minoritaria de LT CD3+CD4-CD8- también está disminuida e los pacientes con VNH y/o HN, lo que también podría contribuir a un fallo de los mecanismos reguladores de la respuesta autoinmune en el vitiligo.

- 5- Respecto al compartimento de células B en sangre periférica, nuestros resultados parecen sugerir que las células B, al menos las de este tejido, tendrían un papel secundario en la patogenia del vitíligo.
- 6- Aunque no se encontraron diferencias en las poblaciones NK consideradas globalmente, el incremento detectado en nuestra serie de células NK activadas que expresan la molécula HLA-DR podría reflejar también la participación del sistema inmune innato en la patogenia de la enfermedad. También hemos encontrado una disminución de la población de Linfocitos T-NK, a los que se han atribuido funciones reguladoras, y que podrían ser responsables, al menos en parte, del fallo en el control de los mecanismos inmunes autorreactivos que conducen a la destrucción final de los melanocitos.
- 7- Respecto a las células presentadoras de antígenos, no encontramos diferencias en las poblaciones de monocitos “intermedios” ni “no clásicos” o inflamatorios en la sangre periférica de estos pacientes, aunque sí se observaba un descenso de la población mayoritaria de monocitos “clásicos”. En el mismo sentido, las células dendríticas plasmocitoides estaban disminuidas en la sangre periférica. Por tanto, la disminución de células presentadoras de antígeno en sangre podría ser también el reflejo de la implicación del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad.
- 8- Se ha podido conseguir una citoteca de poblaciones separadas en 39 pacientes. En todos ellos se obtuvo un número adecuado de células de distintas subpoblaciones (Linfocitos CD4, Linfocitos CD8, Linfocitos T gd, Linfocitos T reguladores, y neutrófilos), que están almacenadas para realizar estudios genómicos y transcriptómicos cuando se disponga de los fondos necesarios.
- 9- Respecto a la posible relación entre las variables inmunofenotípicas y el grado de extensión de la enfermedad en pacientes con VNS, encontramos una correlación negativa entre la superficie corporal afectada y los LTCD8+ naive de sangre periférica. Sin embargo, la asociación era moderada-baja, por lo que consideramos que son resultados de escasa relevancia clínica. Tampoco se encontraron asociaciones clínicamente relevantes con el grado de

despigmentación, ni el índice de progresión de la enfermedad. Sin embargo, los pacientes con menor capacidad de repigmentación mostraban niveles más bajos de LTCD4 y menores signos de activación en estas células, lo que podría indicar un papel protector de los LTCD4.

10- Cuando se consideraron las comorbilidades de origen inmune, en los casos con hipotiroidismo se detectaban mayores niveles de LTCD4+ que expresaban la molécula de activación HLA-DR, tanto en los LTCD4+CLA+ como en los LRCD4+CLA-, mientras que en los pacientes con niveles elevados de aPOT los linfocitos que presentaban más activación eran los LTCD8+CLA+. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra, estos resultados deben considerarse preliminares y precisarían confirmación con otros estudios. En el caso de los pacientes con atopia, tenían más linfocitos de memoria, tanto de LT CD4 y CD8, como de linfocitos B, probablemente en relación con una estimulación antigénica más intensa y constante.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ram M, Shoenfeld Y. Harnessing autoimmunity (vitiligo) to treat melanoma: A myth or reality? *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1110:410–25.
2. González R, Torres-lópez E. Bases inmunológicas de la hipopigmentación vitiligoide asociada a melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2014;105:122-7.
3. V. Monsálvez, R.J. Chico, S.López-Gómez y F. Vanaclocha. Eritema exudativo multiforme perinévico. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100:333–4.
4. Zattra E, Fortina AB, Bordignon M, Piaserico S, Alaibac M. Immunosuppression and melanocyte proliferation. *Melanoma Res.* 2009;19:63–8.
5. Speeckaert R, van Geel N, Vermaelen K V., Lambert J, Van Gele M, Speeckaert MM, et al. Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: Lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:334–44.
6. Barona MI, Arrunátegui A, Falabella R and Alzate A. An epidemiologic case-control study in a population with vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 1995;621–5.
7. Ezzedine K, Diallo A, Leaute-Labreze C, Seneschal J, Mossalayi D, AlGhamdi K, et al. Halo Nevi Association in Nonsegmental Vitiligo Affects Age at Onset and Depigmentation Pattern. *Arch Dermatol.* 2012;148(4):497–502.
8. Arpaia N, Cassano N, Vena G a. Regressing cutaneous malignant melanoma and vitiligo-like depigmentation. *Int J Dermatol.* 2006;45:952–6.
9. Nishitani N, Bito T, Ikeda T, Tokura Y, Nishigori C. Complete remission of metastatic malignant melanoma after surgery in association with development of systemic vitiligo. *J Dermatol.* 2010;37(c):770–2.
10. Piqué-Duran E, Palacios-Llopis S, Martínez-Martín MS, Pérez-Cejudo JA. Complete regression of melanoma associated with vitiligo. *Dermatology Online Journal.* 2011;17(1):4.
11. Ferneiny M, Pansé I, Schartz N, Battistella M, Verola O, Morel P, et al. Phénomène de Meyerson périnévique disséminé révélateur d'un mélanome. *Ann Dermatol Venereol.* 2012;139(2):137–41.
12. Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C, Prignano F, Fabbri P. Fibrosis in regressing melanoma versus nonfibrosis in halo nevus upon melanocyte disappearance: Could it be related to a different cytokine microenvironment? *J Cutan Pathol.* 2007;34(4):301–8.
13. Hamadah I, Binamer Y, Sanai FM, Abdo A a, Alajlan A. Pharmacology and therapeutics Interferon-induced vitiligo in hepatitis C patients : a case series. *Int J Dermatol.* 2010;829–33.
14. Stavropoulou-giokas C, Frangia K, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilias G, et al. Prognostic Significance of Autoimmunity during Treatment of Melanoma with Interferon. *Blood.* 2006;709–18

15. Satzger I, Meier A, Schenck F, Kapp A, Hauschild A, Gutzmer R. Autoimmunity as a prognostic factor in melanoma patients treated with adjuvant low-dose interferon alpha. *Int J Cancer*. 2007;121:2562–6.
16. Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA (2001) Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 19:3477–82.
17. Khan R, Gupta S, Sharma A. Circulatory levels of T-cell cytokines (interleukin [IL]-2, IL-4, IL-17, and transforming growth factor- β) in patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):510–1.
18. Dwivedi M, Kemp EH, Laddha NC, Shoab M, Weetman AP, Begum R. Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics. *Autoimmun Rev*. 2015;14(1):49–56.
19. Dwivedi M, Laddha NC, Imran M, Shah BJ, Begum R. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) in isolated vitiligo: A genotype-phenotype correlation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24:737–40.
20. Macdonald JB, Macdonald B, Golitz LE, LoRusso P, Sekulic A. Cutaneous adverse effects of targeted therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(2):221–36.
21. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369:134–44.
22. Tembhre MK, Parihar a. S, Sharma VK, Sharma a., Chattopadhyay P, Gupta S. Alteration in regulatory T cells and programmed cell death 1-expressing regulatory T cells in active generalized vitiligo and their clinical correlation. *Br J Dermatol*. 2015;172(4):940–50.
23. Das PK, Van Den Wijngaard RMJGJ, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole IC. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: Lessons from vitiligo. *Trends Immunol*. 2001;22(3):130–6.
24. Zhan P, Coté AL, de Vires VC, Usherwood EJ et Turk MJ. Induction of postsurgical tumor immunity and T- cell memory by a poorly immunogenic tumor. *Cancer Res*. 2007;67(13):6468-76.
25. Uchi H, Stan R, Turk MJ, Engelhorn ME, Rizzuto G a., Goldberg SM, et al. Unraveling the Complex Relationship Between Cancer Immunity and Autoimmunity: Lessons from Melanoma and Vitiligo. *Adv Immunol*. 2006;90(06):215–41.
26. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: A comprehensive overview: Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:473–91.

27. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CCE et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012; 25(3):E1-E13.
28. Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz R a. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res.* 2003;16:208–14.
29. Taïeb A. Vitiligo as an inflammatory skin disorder: A therapeutic perspective. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:9–13.
30. Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V. Vitiligo: A comprehensive overview: Part II: Treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65:493–514.
31. Morrone A, Picardo M, de Luca C, Terminali O, Passi S, Ippolito F. Catecholamines and vitiligo. *Pigment Cell Res* 1992;5:65-9.
32. Boissy RE, Manga P. On the Etiology of Contact / Occupational Vitiligo. *Pigmente Cell Res* 2004;17:208–14.
33. Gauthier Y, Cario Andre M, Taïeb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res.* 2003;16:322–32.
34. Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Taïeb a. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br J Dermatol.* 2003;148:95–101.
35. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Das PK. Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. *Br J Dermatol.* 1997;137:171–8.
36. Reichert-Faria A, Jung J E, Moreschi Neto V, Silva de CAstro CC, Távora Mira M et De Noronha L. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in vitiligo skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27(8):1057-59.
37. Tarlé RG, Cesar C, Castro S De, Machado L, Mira MT. Polymorphism of the E-cadherin gene CDH1 is associated with susceptibility to vitiligo. *Experimental Dermatol.* 2015;24(4):300-02.
38. Fu C, Jiang A. Generation of tolerogenic dendritic cells via the E-cadherin/beta-catenin-signaling pathway. *Immunol Res.* 2010:72–8.
39. Kitamura R, Tsukamoto K, Harada K, Shimizu A, Shimada S, Kobayashi T, et al. Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: Role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. *J Pathol.* 2004;202:463–75.

40. Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2005;124:976–83.
41. Benzekri L, Gauthier Y, Hamada S, Hassam B. Clinical features and histological findings are potential indicators of activity in lesions of common vitiligo. *Br J Dermatol.* 2013;168:265–71.
42. Van Geel N, Speeckaert R, Taieb A, Picardo M, Böhm M, Gawkrödger DJ, et al. Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:564–73.
43. Taïeb A, Picardo M. Vitiligo. *N Engl J Med.* 2009;360:160-9.
44. Abdallah M, Abdel-Naser MB, Moussa MH, Assaf C, Orfanos CE. Sequential immunohistochemical study of depigmenting and repigmenting minigrafts in vitiligo. *Eur J Dermatology.* 2003;13:548–52.
45. Steitz J, Wenzel J, Gaffal E et Thomas T. Initiation and regulation of CD8 + T cells recognizing melanocytic antigens in the epidermis: Implications for the pathophysiology of vitiligo. *Eur J Cell Biol.* 2004; 797-803.
46. Mulekar, S.V., Asaad, M., Ghwish, B., Al Issa, A., and Al Eisa, A. Koebner phenomenon in vitiligo: not always an indication of surgical failure. *Arch. Dermatol.* 2007; 143 801–802.
47. Basak PY, Adiloglu AK, Ceyhan AM, Tas T, Akkaya VB. The role of helper and regulatory T cells in the pathogenesis of vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(2):256–60.
48. Njoo, M.D., Das, P.K., Bos, J.D., and Westerhof, W. Association of the Koebner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. *Arch. Dermatol.* 1999;135:407–413.
49. Sharquie KE, Mehenna SH, Naji A a., Al-Azzawi H. Inflammatory Changes in Vitiligo. *Am J Dermatopathol.* 2004;26(2):108–12.
50. Attili VR, Attili SK. Lichenoid inflammation in vitiligo - A clinical and histopathologic review of 210 cases. *Int J Dermatol.* 2008;47:663–9.
51. Hamzavi I, Jain H, McLean D, Shapiro J, Zeng H, Lui H. Parametric modeling of narrowband UV-B phototherapy for vitiligo using a novel quantitative tool: the Vitiligo Area Scoring Index. *Arch Dermatol.* 2004;140(June):677–83.
52. Taïeb A, Picardo M. The definition and assessment of vitiligo: A consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res.* 2007;20:27–35.
53. Alghamdi KM, Kumar a, Taïeb a, Ezzedine K. Assessment methods for the evaluation of vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:1463–71.

54. Benzekri L, Ezzedine K, Gauthier Y. Vitiligo Potential Repigmentation Index: A simple clinical score that might predict the ability of vitiligo lesions to repigment under therapy. *Br J Dermatol.* 2013;168:1143–6.
55. Van Geel N, Mollet I, Brochez L, Dutré M, De Schepper S, Verhaeghe E, et al. New insights in segmental vitiligo: case report and review of theories. *Br J Dermatol.* 2012;166:240–6.
56. Picardo M. Vitiligo: New insights. *Br J Dermatol.* 2012;166:472–3.
57. Van Geel N a C, Mollet IG, De Schepper S, Tjin EPM, Vermaelen K, Clark R a., et al. First histopathological and immunophenotypic analysis of early dynamic events in a patient with segmental vitiligo associated with halo nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23:375–84.
58. Ezzedine K, Diallo a., Léauté-Labrèze C, Séneschal J, Prey S, Ballanger F, et al. Halo naevi and leukotrichia are strong predictors of the passage to mixed vitiligo in a subgroup of segmental vitiligo. *Br J Dermatol.* 2012;166:539–44.
59. Van Geel N, Vandenhautte S, Speeckaert R, Brochez L, Mollet I, De Cooman L, et al. Prognostic value and clinical significance of halo naevi regarding vitiligo. *Br J Dermatol.* 2011;164:743–9.
60. De Vijlder HC, Westerhof W, Schreuder GMT, De Lange P, Claas FHJ. Difference in pathogenesis between vitiligo vulgaris and halo nevi associated with vitiligo is supported by an HLA association study. *Pigment Cell Res.* 2004;17:270–4.
61. Van Geel N, Speeckaert R, Lambert J, Mollet I, De Keyser S, De Schepper S, et al. Halo naevi with associated vitiligo-like depigmentations: Pathogenetic hypothesis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2012;26:755–61.
62. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ et al. Variant of TYR and Autoimmunity Susceptibility Loci in Generalized Vitiligo. *N Engl J Med.* 2010; 362:1686-97.
63. Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo: autoimmune pathways and an inverse relationship with malignant melanoma. *Genome Med.* 2010;2:78.
64. Mitchell MS, Harel W, Groshen. Association of HLA phenotype with response to active specific immunotherapy of melanoma. *J Clin Oncol.* 1992;10:1158–64.
65. Spritz RA. Six Decades of Vitiligo Genetics: Genome-Wide Studies Provide Insights into Autoimmune Pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2012;132:268–73.
66. Tripathi RK, Giebel LB, Strunk KM et Spritz RA. A polymorphism of the human tyrosinase gene that is associated with temperature-sensitive enzymatic activity. *Gene Expr.* 1991; 1:103–10.

67. Feily A, Pazyar N. Why vitiligo is associated with fewer risk of skin cancer? Providing a molecular mechanism. *Arch Dermatol Res.* 2011;303:623–4.
68. Teulings HE, Overkamp M, Ceylan E, Nieuweboer-Krobotova L, Bos JD, Nijsten T, et al. Decreased risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer in patients with vitiligo: A survey among 1307 patients and their partners. *Br J Dermatol.* 2013;168:162–71.
69. Tu CX, Jin WW, Lin M, Wang ZH, Man MQ. Levels of TGF- β 1 in serum and culture supernatants of CD4+CD25+ T cells from patients with non-segmental vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2011;303:685–9.
70. Lili Y, Yi W, Ji Y, Yue S, Weimin S, Ming L. Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized Vitiligo. *PLoS One.* 2012;7(5):e37513.
71. Peñate M, Peña AS. La importancia del sistema inmune innato. *Rev Esp Enferm Dig(madrid)2001; 93(11):721–30.*
72. Richmond JM, Frisoli ML, Harris JE. Innate immune mechanisms in vitiligo: Danger from within. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(6):676–82.
73. Bertolotti A, Boniface K, Vergier B, Mossalayi D, Taieb A, Ezzedine K, et al. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:398-407.
74. Yu R, Broady R, Huang Y, Wang Y, Yu J, Gao M, et al. Transcriptome Analysis Reveals Markers of Aberrantly Activated Innate Immunity in Vitiligo Lesional and Non-Lesional Skin. *PLoS One.* 2012;7(12):e51040.
75. Durham-Pierre DG, Walters CS, Halder RM, Pham HN, Vanderpool E a. Natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activity against melanocytes in vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:26–30.
76. Sheneef A, Ezz-El DR et Mahmoud TM. Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with vitiligo. *Egypt J Immuol.* 2012;19(1):31-8
77. Namazi MR. Statins: Novel additions to the dermatologic arsenal? *Exp Dermatol.* 2004;13(1):337–9.
78. Mackay CR. Dual personality of memory T cells. *Nature.*1999; 401(6754):659–60.
79. Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, Libri V, Riddell NE, Macaulay R et al. Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. *J Immunol.* 2011; 187(5):2093-100.
80. Belz GT, Kallies A. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: Toward a molecular understanding of fate determination. *Curr Opin Immunol*

2010;22(3):279–85.

81. Oyarbide-Valencia K, van den Boorn JG, Denman CJ, Li M, Carlson JM, Hernandez C, et al. Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev.* 2006;5(7):486–92.
82. van den Boorn JG, Konijnenberg D, DelleMijn T a M, van der Veen JPW, Bos JD, Melief CJM, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2009;129(9):2220–32
83. Rao A, Gupta S, Dinda AK, Sharma A, Sharma VK, Kumar G, et al. Study of clinical, biochemical and immunological factors determining stability of disease in patients with generalized vitiligo undergoing melanocyte transplantation. *Br J Dermatol.* 2012;166(6):1230–6.
84. Reyes E, Jaén P, de las Heras E, Carrión F, Álvarez-Mon M, de Eusebio E, et al. Systemic immunomodulatory effects of *Polypodium leucotomos* as an adjuvant to PUVAtherapy in generalized vitiligo: A pilot study. *J Dermatol Sci.* 2006;41(3):213–6.
85. Antelo DP, Filgueira AL, Cunha JMT. Reduction of skin-homing cytotoxic T cells (CD8+–CLA+) in patients with vitiligo. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2011;27(1):40–4.
86. Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, et al. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: Significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:219–30.
87. Chiricozzi A. Pathogenic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(Supl 1):9–20.
88. Tembhre MK, Sharma VK. T-helper and regulatory T-cell cytokines in the peripheral blood of patients with active alopecia areata. *Br J Dermatol.* 2013;169:543–8.
89. Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, Katayama I. Positive link between STAT3 activation and Th17 Cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2012;67:207–9.
90. Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: A dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci.* 2008;50(1):1–14.

91. Elela MA, Hegazy R a., Fawzy MM, Rashed L a., Rasheed H. Interleukin 17, interleukin 22 and FoxP3 expression in tissue and serum of non-segmental vitiligo: A case-controlled study on eighty-four patients. *Eur J Dermatology*. 2013;23(3):350–5.
92. Zhou L, Shi Y-L, Li K, Hamzavi I, Gao T-W, Huggins RH, et al. Increased circulating Th17 cells and elevated serum levels of TGF-beta and IL-21 are correlated with human non-segmental vitiligo development. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015; 28(3):324-9.
93. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*. 2001;193(11):1295–302.
94. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell R a. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99–146.
95. Terras S, Gambichler T, Moritz RK, Altmeyer P, Lambert J. Immunohistochemical analysis of FOXP3+ regulatory T cells in healthy human skin and autoimmune dermatoses. *Int J Dermatol*. 2013;3:294–9.
96. Zhou L, Li K, Shi Y, Hamzavi I, Gao T, Henderson M, et al. Systemic analyses of immunophenotypes of peripheral T cells in non-segmental vitiligo: implication of defective natural killer T cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012; 25(5):602-11.
97. Abdallah M, Saad A. Evaluation of circulating CD4+ CD25high FoxP3+ T-lymphocytes in active non-segmental vitiligo. *J Pan-Arab League Dermatol*. 2009;20:1.
98. Moftah NH, El-Barbary RAH, Ismail MA, Ali NAM. Effect of narrow band-ultraviolet B on CD4+ CD25high FoxP3+ T-lymphocytes in the peripheral blood of vitiligo patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2014;30(5):254–61.
99. Ben Ahmed M, Zaraa I, Rekik R, Elbeldi-Ferchiou A, Kourda N, Belhadj Hmida N, et al. Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25:99–109.
100. Richetta A, D'Epiro S, Salvi M, Campoli M, Giancristoforo S, Mattozzi C, et al. Serum levels of functional T-regs in vitiligo: our experience and mini-review of the literature. *Eur J Dermatol*. 2013;23:154–9.
101. Dwivedi M, Laddha NC, Arora P, Marfatia YS, Begum R. Decreased regulatory T-cells and CD4+/CD8+ ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(4):586–

102. Lin M, Zhang Bx, Shen N, Dong XJ, Zhang C, Qi XY et al. Regulatory T cells from active non-segmental vitiligo exhibit lower suppressive ability on CD8+CLA+ T cells. *Eur J Dermatology*. 2014;24(6):676–82.
103. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5138–43.
104. Hegazy RA., Fawzy MM, Gawdat HI, Samir N, Rashed LA. T helper 17 and Tregs: A novel proposed mechanism for NB-UVB in vitiligo. *Exp Dermatol*. 2014;23(22):283–6.
105. Birlea S a, Jin Y, Bennett DC, Herbstman DM, Wallace MR, McCormack WT, et al. Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports XBP1, FOXP3, and TSLP. *J Invest Dermatol*. 2011;131:371–81.
106. Yun JY, Uhm YK, Kim HJ, Lim SH, Chung JH, Shin MK, et al. Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) polymorphisms and the association with nonsegmental vitiligo in the Korean population. *Int J Immunogenet*. 2010;37:289–91.
107. Abanmi A, Al Harthi F, Zouman A, Kudwah A, Jamal M Al, Arfin M, et al. Association of Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Saudi patients with vitiligo. *Dis Markers*. 2008;24:51–7.
108. Cui J, Arita Y, Bystryn JC. Cytolytic antibodies to melanocytes in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1993;100:812-15.
109. Hedstrand H, Ekwall O, Olsson MJ, Landgren E, Kemp EH, Weetman AP, et al. The Transcription Factors SOX9 and SOX10 are Vitiligo Autoantigens in Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type I. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35390–5.
110. Harning R, Cui J, Bystryn JC. Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1991;97:1078–80.
111. Waterman EA, Kemp EH, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP. Autoantibodies in vitiligo patients are not directed to the melanocyte differentiation antigen MelanA/MART1. *Clin Exp Immunol*. 2002;129:527–32.
112. Morales JP. Estudio de polimorfismos e interacciones génicas de los genes IL1A, IL1B, IL1R, IL1RA, IL4R A, IL12, IFNG, TGFB1, TNFA, IL2, IL4, IL6, IL10 en pacientes con asma. 2010; Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca. Available from: <http://gredos.usal.es/jspui/handle/10366/83319>

113. Spritz RA. The Genetics of Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(E1):E18-20.
114. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *Lancet.* 2015;386:74–84.
115. Alkhateeb A, Fain PR, Spritz R a. Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2005;125:388–91.
116. Nath SK, Kelly J a, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, et al. Evidence for a susceptibility gene, SLEVI1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.*2001;69:1401–6.
117. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2007;356(12):1216–25.
118. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 2008;134(5):743-56
119. Jin Y, Birlea S a, Fain PR, Ferrara TM, Ben S, Riccardi SL, et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat Genet.* 2012;44(6):676–80.
120. Quan C, Ren Y-Q, Xiang L-H, Sun L-D, Xu A-E, Gao X-H, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nat Genet.* 2010;42(7):614–8.
121. Liu JB, Li M, Chen H, Zhong SQ, Yang S, Du WD, et al. Association of vitiligo with HLA-A2: A meta-analysis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;21:205–13.
122. Fain PR, Babu SR, Bennett DC, Spritz R a. HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and arly disease onset. *Pigment Cell Res.* 2006;19:51–7.
123. Hwang I, Ahn G, Park E, Ha D, Song JY, Jee Y. An acidic polysaccharide of Panax ginseng ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Immunol Lett.* 2011;138(2):169–78.
124. Singh RP, Hahn BH, La Cava A. Tuning immune suppression in systemic autoimmunity with self-derived peptides. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008;7:253–9.
125. Feily A, Baktash D, Mohebbipour A. Potential advantages of simvastatin as a novel anti-vitiligo arsenal. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:1982–3.

126. Lattouf C, Jimenez JJ, Tosti A, Miteva M, Wikramanayake TC, Kittles C, et al. Treatment of alopecia areata with simvastatin/ezetimibe. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(2):359–61.
127. Krysiak R, Zmuda W, Okopien B. The effect of ezetimibe, administered alone or in combination with simvastatin, on lymphocyte cytokine release in patients with elevated cholesterol levels. *J Intern Med.* 2012;271(1):32–42.
128. Agarwal P, Rashighi M, Essien KI, Richmond JM, Randall L, Pazoki-toroudi H, et al. Simvastatin Prevents and Reverses Depigmentation in a Mouse Model of Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2015;135(4):1080–8.
129. Sandoval-Usme MC, Umaña-Pérez A, Guerra B, Hernández-Perera O, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L, et al. Simvastatin impairs growth hormone-activated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in UMR-106 osteosarcoma cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87769.
130. Fang Z, Tang Y, Fang J, Zhou Z, Xing Z, Guo Z, et al. Simvastatin Inhibits Renal Cancer Cell Growth and Metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 Pathway. *PLoS One.* 2013;8(5):362823.
131. Zhang X, Tao Y, Wang J, García-mata R, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits secretion of Th17-polarizing cytokines and antigen presentation by DCs in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2013;43(1):281–9
132. Stamm JA, Ornstein DL. The role of statins in cancer prevention and treatment. *Oncology (Williston Park).* 2005; 19(6): 739–50.
133. Desai CS, Martin SS, Blumenthal RS. Non-cardiovascular effects associated with statins. *BMJ.* 2014; 349:g3743.
134. Noël M, Gagné C, Bergeron J, Jobin J, Poirier P. Positive pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vitiligo. *Lipids Health Dis.* 2004;3:7.
135. Yang R, Zheng Y, Li L, Liu S, Burrows M, Wei Z, et al. Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat Commun.* 2014;5:5807.
136. Adameyko I, Lallemand F, Furlan a., Zinin N, Aranda S, Kitambi SS, et al. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development.* 2012; 139(2):397–410.
137. PAX3 - paired box 3 - Genetics Home Reference. Disponible en [http://:ghr.nlm.nih.gov/](http://ghr.nlm.nih.gov/)
138. Jean-Paul Orteonne. Vitiligo y otros trastornos de la pigmentación. En: Jean L. Bologna, Joseph L. Jorizzo and Ronald P. Rapini. Dermatología. Elsevier España 2004. p 955.

139. Kim NH, Torchia D, Rouhani P, Roberts B, Romanelli P. Tumor necrosis factor- α in vitiligo: direct correlation between tissue levels and clinical parameters. *Cutan Ocul Toxicol.* 2011 Sep;30(3):225-7.
140. Alghamdi KM, Khurram H, Taieb a, Ezzedine K. Treatment of generalized vitiligo with anti-TNF-alpha Agents. *J Drugs Dermatol.* 2012;11(4):534-9.
141. Alghamdi KM, Khurram H, Rikabi A. Worsening of vitiligo and onset of new psoriasiform dermatitis following treatment with infliximab. *J Cutan Med Surg.* 2011;15(5):280-4.
142. Maruthappu T, Leandro M, Morris SD. Deterioration of vitiligo and new onset of halo naevi observed in two patients receiving adalimumab. *Dermatol Ther.* 2013;26(4):370-2.
143. Kemp EH. Tumour necrosis factor- α antagonists as therapies for vitiligo. *Br J Dermatol.* 2015; 173(3):635.
144. Webb KC, Tung R, Winterfield LS, Gottlieb a B, Eby JM, Henning SW, et al. TNF- α inhibition can stabilize disease in progressive vitiligo. *Br J Dermatol.* 2015;641-50.
145. Chattopadhyay PK, Roederer M. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. *Methods.* 2012;57(3):251-8.
146. Orfao A, López A, López-Berges MC, Vidriales B, Macedo A, González M et San Miguel JF. (1993). La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Universidad de Salamanca, 1993.
147. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):648-55.
148. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cells and Tissues of the Immune. In "Cellular and Molecular Immunology" 2014 Elsevier 8th Ed, Chapter 2, p. 13-33.
149. Gambichler T, Bindsteiner M, Höxtermann S, Terras S, Kreuter A. Circulating CD4+ CD25high CD127low regulatory T cells are an independent predictor of advanced melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(2):280-3.
150. Dunham RM, Cervasi B, Brenchley JM, Albrecht H, Weintrob A, Sumpter B et al. CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol.* 2008;180(8):5582-92.
151. Gunduz K, Ozturk G, Terzioglu E, Sebik F. T Cell Subpopulations and IL-2R in Vitiligo. *J Dermatol.* 2004;31:94-7.

152. Shen N, Dong X, Zhu J, Li Y, Man M, Tu C. Regulatory T cells from active non-segmental vitiligo exhibit lower suppressive ability on CD8 + CLA + T cells. *Eur J Dermatol* 2014;24(6):676–82.
153. Ingordo V, Cazzaniga S, Raone B, Digiuseppe MD, Musumeci ML, Fai D, et al. Circulating autoantibodies and autoimmune comorbidities in vitiligo patients: a multicenter Italian study. *Dermatology* 2014;228(3):240–9.
154. Rezaei N, Gavalas N, Weetman A, Kemp E. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2007;21(7):865–76.
155. Pichler R, Sfetsos K, Badics B, Gutenbrunner S, Berg J AJ. Lymphocyte imbalance in vitiligo patients indicated by elevated CD4+/CD8+ T-cell ratio. *Wien Med Wochenschr.* 2009;159(13-14):337–41.
156. Mahmoud F, Abul H, Haines D, Al-saleh C. Decreased Total Numbers of Peripheral Blood Lymphocytes with Elevated Percentages of CD4+CD45RO+ and CD4+CD25+ of T-Helper Cells in Non-Segmental Vitiligo. *J Dermatol.* 2002;29(2):68–73.
157. Basak PY, Adiloglu AK, Koc IG, Tas T, Akkaya VB. Evaluation of activatory and inhibitory natural killer cell receptors in non-segmental vitiligo: a flow cytometric study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(8):970–6.
158. De Panfilis G, Caruso A, Sansoni P, Pasolini G, Semenza D, Torresani C. Identification of Fas-L expressing apoptotic T lymphocytes in normal human peripheral blood: In vivo suicide. *Am J Pathol* 2001;158:387–391.
159. Abdel-Naser MB, Ludwig WD, Gollnick H OC. Nonsegmental vitiligo: decrease of the CD45RA+ T-cell subset and evidence for peripheral T-cell activation. *Int J Dermatol.* 1992;31:321–6.
160. Abreu AC, Duarte GG, Miranda JY, Ramos DG, Ramos CG, Ramos MG. Immunological Parameters Associated With Vitiligo Treatments: A Literature Review Based on Clinical Studies. *Autoimmune Dis.* 2015; 2015:196537
161. Halder RM, Walters CS, Johnson BA, Chakrabarti SG, Kenney JA Jr. Aberrations in T lymphocytes and natural killer cells in vitiligo: a flow cytometric study. *J Am Acad Dermatol.* 1986;14(5 Pt 1):733–7.
162. Soubiran P, Benzaken S, Bellet C, Lacour JP, Ortonne JP. Vitiligo: peripheral T-cell subset imbalance as defined by monoclonal antibodies. *Br J Dermatol.* 1985;113(Suppl 28):124–7.

163. Le Gal FA, Avril MF, Bosq J, Lefebvre P, Deschemin JC, Andrieu M et al. Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(6):1464–70.
164. Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelem E, Brazzelli V et al. Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan-A/MART1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: the role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(2):326–32.
165. Yang L, Wei Y, Sun Y, Shi W, Yang J, Zhu L, Li M. Interferon-gamma Inhibits Melanogenesis and Induces Apoptosis in Melanocytes: A Pivotal Role of CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(6):664–70.
166. van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Pals S, Weening J, Das P. Autoimmune Melanocyte Destruction in Vitiligo. *Lab Invest.* 2001;81(8):1061–7.
167. 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):940–6.
168. Maeda Y, Nishikawa H, Sugiyama D, Ha D, Hamaguchi M, Saito T et al. Detection of self-reactive CD8⁺ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science.* 2014;346(6216):1536–40.
169. Hegab DS AM. Decreased Circulating T Regulatory Cells in Egyptian Patients with Nonsegmental Vitiligo: Correlation with Disease Activity. *Dermatol Res Pr.* 2015;
170. Zhang H, Kong H, Zeng X, Guo L, Sun X, He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med.* 2014;12(1):125.
171. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ double-negative T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):739–48.
172. Hillhouse EE, Lesage S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J Autoimmun.* 2013;40:58–65.
173. Tarbox JA, Keppel MP, Topcagic N, Mackin C, Ben Abdallah M, Baszis KW et

- al. Elevated Double Negative T Cells in Pediatric Autoimmunity. *J Clin Immunol* 2014; 34(5):594–99.
174. D'Aquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol*. 2011;82(4):333–40.
175. Yano S, Nakamura K, Okochi H, Tamaki K. Analysis of the expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on the peripheral blood and cutaneous lymphocytes of alopecia areata patients. *Acta Derm Venereol* 2002; 82(2):82-5.
176. Sigmundsdottir H, Gudjonsson JE, Jonsdottir I, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol* 2001;126(2):365-9.
177. van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, Tigges B, Westerhof W, Das P. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest*. 2000;80(8):1299–309.
178. Zhang B-X, Lin M, Qi X-Y, Zhang R-X, Wei Z-D, Zhu J, et al. Characterization of circulating CD8+T cells expressing skin homing and cytotoxic molecules in active non-segmental vitiligo. *Eur J Dermatol*. 2013;23(3):331–8.
179. Mahmoud F, Abul H, al-Saleh Q, Haines D, Burleson J, Morgan G. Peripheral T-cell activation in non-segmental vitiligo. *J Dermatol*. 1998;25(10):637–40.
180. Wu J, Zhou M, Wan Y, Xu A. CD8+ T cells from vitiligo perilesional margins induce autologous melanocyte apoptosis. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):237–41.
181. Pérez-Andrés M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(Suppl 1):S47–60.
182. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138+ and CD138- plasma cells. *Haematologica*. 2010;95(6):1016–20.
183. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: Characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127(1):14–25.

184. Henriques A, Nunes R, Loureiro G, Martinho A, Pais M, Segorbe-Luís A, et al. Alterations on peripheral blood B cell subsets induced by allergic rhinitis. *Inflamm Res.* 2015;64(3-4):145–9.
185. Czarnowicki T, González J, Bonifacio KM, Shemer A. Diverse activation and differentiation of multiple B-cell subsets in patients with atopic dermatitis but not in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137(1):118-29.
186. Lin X, Tian H, Xianmin M. Possible roles of B lymphocyte activating factor of the tumour necrosis factor family in vitiligo autoimmunity. *Med Hypotheses.* 2011;76(3):339–42.
187. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology.* 2009;126(4):458–65.
188. Hann SK, Park YK, Chung KY, Kim HI, Im S, Won JH. Peripheral blood lymphocyte imbalance in Koreans with active vitiligo. *Int J Dermatol.* 1993;32(4):286–9.
189. Evans JH, Horowitz A, Mehrabi M, Wise EL, Pease JE, Riley EM, et al. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1924–33.
190. Yeh S, Li Z, Sen HN, Lim WK, Gill F, Perkins K et al. Scleritis and multiple systemic autoimmune manifestations in chronic natural killer cell lymphocytosis associated with elevated TCR alpha/beta+CD3+CD4-CD8- double-negative T cells. *Br J Ophthalmol.* 2010, 94(6):748-52.
191. Yuan X, Cheng G and Malek TR. The importance of regulatory T-cell heterogeneity in maintaining self-tolerance. *Immunol Rev.* 2014;259(1):103–14.
192. Koreck A, Surányi A, Szöny BJ, Farkas A, Bata-Csörgö Z, Kemény L, et al. CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(1):176–82.
193. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Derek N, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116(16):e74-80.
194. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Massei F, Biver P, Consolini R. Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol.* 2012;24(6):347–56.

195. Raker VK, Domogalla MP, Steinbrink K. Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol.* 2015;6:569.
196. Huang X, Dorta-Estremera S, Yao Y, Shen N, Cao W. Predominant role of plasmacytoid dendritic cells in stimulating systemic autoimmunity. *Front Immunol* 2015;6:526.
197. 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):179–83.
198. Burbano C, Vasquez G, Rojas M. Modulatory effects of CD14+CD16++ monocytes on CD14++CD16- monocytes: A possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(12):3371–81.
199. Ziegler-Heitbrock L. The CD14 CD16 blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;81(3):584–92.
200. Liu B, Dhanda A, Hirani S, Williams EL, Sen HN, Martínez Estrada F et al. Monocytes are enriched by glucocorticoid treatment and are functionally attenuated in driving effector T cell responses. *J Immunol.* 2015;194(11):5150–60.
201. Traunecker E, Gardner R, Fonseca JE, Polido-Pereira J, Seitz M, Villiger PM et al. Blocking of LFA-1 enhances expansion of Th17 cells induced by human CD14(+) CD16(++) nonclassical monocytes. *Eur J Immunol.* 2015;45(5):1414–25.
202. Pommier A, Audemard A, Durand A, Lengagne R, Delpoux A, Martin B, et al. Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(32):13085–90.
203. Kawakami T, Hashimoto T. Disease severity indexes and treatment evaluation criteria in vitiligo. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011:4–7.
204. Bhatnagar A, Kanwar AJ, Parsad D, De D. Psoralen and ultraviolet A and narrow-band ultraviolet B in inducing stability in vitiligo, assessed by vitiligo disease activity score: An open prospective comparative study. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;21:1381–5.
205. Labrador Horillo M, Martínez Lostao L. Componentes del sistema inmune. En Labrador Horillo M, Martínez Lostao L. Compendio iconográfico de inmunología. MRA Ediciones 2005. p42 y 86.

206. Rustemeyer T, van Hoogstraten IMW, von Blomerg BME, Gibbs S and Scheper RJ. Mechanism of irritant and allergic contact dermatitis. En: *Johansen JD, Frosch PJ, and Lepoittevin JP, editors. Contact Dermatitis. Fifth Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p.57.*
207. Spritz RA. Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. *J Dermatol.* 2013;40(5):310-8

