



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

"BUSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI-MELANINA
FUADORES DE COMPLEMENTO EN PACIENTES
CON VITILIGO."
POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.

TESIS PROFESIONAL

MARIA CLARA RAMIREZ TRISTAN

SAN LUIS POTOSÍ S. L. P.

1982



T
RL790
R3
C.1



1080075703



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**“ BUSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI-MELANINA
FIJADORES DE COMPLEMENTO EN PACIENTES
CON VITILIGO.”**

POR INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA CLARA RAMIREZ TRISTAN

SAN LUIS POTOSI S. L. P.



1 9 8 2

T
26790
23



A DIOS.

EN QUIEN ME SOSTENIDO ESPIRITUALMENTE TANTAS
VECES PARA PODER SEGUIR SUPERANDOME.Y QUE SIN
CONOCERLO SIENTO SU PRESENCIA CERCA DE MI.

Con mi agradecimiento muy especial al
Dr. BENJAMIN MONCADA G. y a la Dra.
GARMEN LOREDO L. por su valiosa colaboración.

Con cariño a mis amigos:
Q.F.B. SARA PATRICIA DELGADO P.
Dra . Ma. de LOURDES BARANDA.
Dr. ROBERTO GONZALEZ A.
Q.F.B. ALEJANDRO SALAZAR N.
Q.F.B. JOSE LUIS HERNANDEZ M.

Para mis amigas: LUTIS, LUCILA, AIDA, LUCIA.B., GUADALUPE y SILVIA.

A LA ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

A LA UNIVERSIDAD

A MIS MAESTROS

A MIS SINODALES:

Q.F.B. JESUS GAMA Y SILVA.

Dra. FLORISA ALANIS de AZUARA.

Q.F.B. REMEDIOS PEREZ ZAMORA.

Q.F.B. LUCIA MENDOZA TRONCOSO.

Q.F.B. LEONOR PINEDA.

A MI MADRE.

POR LA CONFIANZA QUE SIEMPRE DEPOSITO EN MI.
Y EL APOYO QUE SIEMPRE ME OFRECIO PARA PODER
SALIR ADELANTE. CON PROFUNDO CARIÑO RESPETO
Y ADMIRACION POR SER LO MEJOR QUE TENGO EN
ESTA VIDA.

SRA. MARIA GUADALUPE TRISTAN V.de RAMIREZ

A LA MEMORIA DE MI PADRE (+)

A mis queridos hermanos:
ISMAEL. Que con su ejemplo
me ha impulsado a
seguir siempre adelante.

ROGELIO.

RAFAEL.

FERNANDO.

GERARDO.

Ma. DOLORES.

GRACIELA.

LUPITA.

YESIKA JOVANI.

Por la confianza que siempre de
positaron en mi.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de la Escuela de Medicina de la U.A.S.L.P., bajo la dirección del Dr. Benjamín Moncada González, a quien agradezco profundamente su asesoría.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODO

RESULTADOS

RESUMEN Y CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

I.- I N T R O D U C C I O N .

INTRODUCCION

El término Vitiligo deriva de la palabra latina "Vitellus" que significa ternera; se usó primero por el médico romano Celso 200 años D.C. y se refiere a manchas características de la enfermedad, se asemejan a las manchas blancas de la ternera (1,10).

Clínicamente el Vitiligo consiste de manchas blancas lechosas con despigmentación que pueden ser redondas, ovales o irregulares. Las lesiones pueden variar de tamaño, son usualmente bilaterales, pero no necesariamente simétricas. Los sitios más comúnmente afectados son:

- a) Areas descubiertas del cuerpo (cara, parte superior del pecho, parte dorsal de las manos);
- b) Pliegues del cuerpo (axilas e ingles);
- c) Areas alrededor de los orificios (ojos, nariz, boca, ombligo, vulva, ano, pezones y pene);
- d) Areas propensas a traumas (codos y rodillas);
- e) Regiones pilosas;
- f) Areas distribuidas segmentariamente, inervadas por una misma rama nerviosa (dermatómero) (12), como se muestra en la Fig. 1.

Otras veces el signo inicial de la enfermedad puede ser encanecimiento prematuro y puede preceder a las manchas en la piel por tiempo variable de meses hasta años.

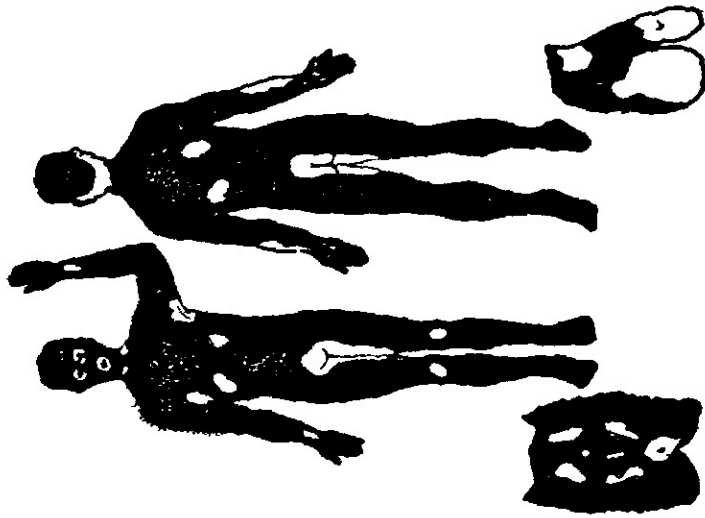


Fig I.- Patrón Típico de la Distribución del Vitiligo
(Fitzpatrick TB, Walker SA: Dermatologic Differenc
tial Diagnosis. Chicago, Year Book 1962).

El Vitiligo afecta a todas las razas, y ambos sexos parecen ser igualmente vulnerables (1), aunque se ha observado que es más frecuente en la mujer y en personas entre 10 y 40 años; pueden encontrarse en niños y ancianos (17). La incidencia general es alrededor del 1% (1,2,42) presentando una variación entre 0.14 y 8.8% para la población mundial (3,10,31).

En nuestro medio se observa entre un 5 y 8% en relación a todas las enfermedades de la piel. Este padecimiento consiste en la presencia de manchas acrómicas en partes expuestas y no expuestas de la piel, pero si causan síntomas psicológicos, y que habitualmente condicionan ciertos trastornos serios en la persona que las padece, es de evolución variable la más de las veces crónica (7) y el motivo de la consulta suele ser problema estético y pntofobia del paciente.

Se han postulado varias teorías sobre la etiología de la enfermedad, sobresaliendo entre ellas por su mayor probabilidad las que se refieren al desgaste de los melanocitos y a interacción neurohumoral. Obviamente si se comprobara su etiología se podría enfocar el tratamiento específico en cada caso.

Esta enfermedad es muchas veces progresiva y el tratamiento es específico, es inseguro, pues se desconoce la etiología de la enfermedad.

El tratamiento consiste en provocar pigmentación cutánea mediante la administración de Psoralenos, sustancias fotosensibilizantes seguidas de la exposición a la luz solar, ó por medios artificiales con lámparas que emiten luz UV de onda larga tipo A (320-400 nm)

que es necesario para fotosensibilizar dichos pacientes (5,6,36). En el Cuadro I se encuentra el espectro electromagnético con la escala de luz UV.

Aunque lo anterior conduce a mejoría y a curación en muchos casos, otros no sufren alteración alguna y, aún más, por evolución natural de la enfermedad otros se agravan. Los distintos resultados obtenidos con el tratamiento indicado se explican probablemente si lo que conocemos actualmente como Vitiligo fuese más bien un conjunto de enfermedades. Hay ocasiones en que el defecto de pigmentación ocurre por desgaste de los melanocitos (2) y probablemente haya otras explicaciones como pudiera ser las interacciones anómalas neurohumorales). Obviamente en cada situación planteada, el tratamiento debe ser distinto (8).

TIPOS DE VITILIGO

El Vitiligo ha sido clasificado (1,3,10,31) de acuerdo a la extensión y distribución de las áreas involucradas en:

I. Localizado:

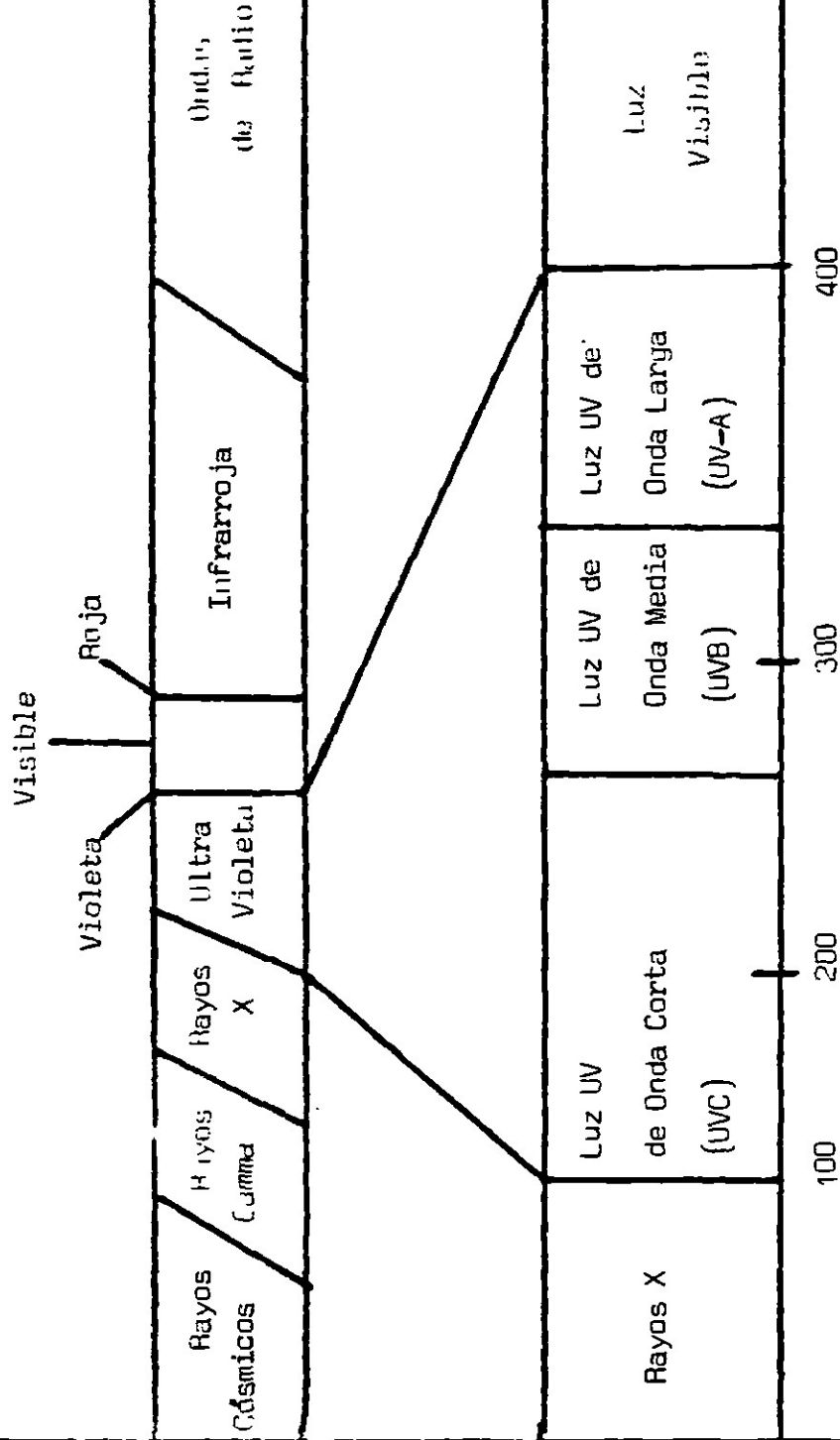
- a) Focal.- La despigmentación de la piel o del cabello está restringido a una sola área (Fig. 2);
- b) Segmental.- El patrón de la lesión puede ser lineal y parece corresponder a la distribución nerviosa del Dermatómero (Fig. 3);
- c) Area Mucosa.- A lo largo de la membrana mucosa (Fig. 4).

II. Generalizado:

- a) Acrofacial.- Partes distales de extremidades y cara (Fig. 5).

CUADRO I

ESPECTRO ELECTROMAGNETICO CON LA ESCALA DE LONGITUD DE ONDA EN NANOMETROS



Longitud de Onda en Nanómetros

III. Vulgar

Manchas dispersas sin un arreglo especial (Fig. 6).

IV. Univerasal

Despigmentación completa, o casi completa (Fig. 7).

HISTORIA DEL VITILIGO

Las lesiones del Vitiligo muestran una completa ausencia de melanocitos como se demostro con la reacción DOPA (10) precursor de melanina, observándose esta reacción negativa.

Por microscopia electrónica se ha confirmado la ausencia de melanocitos en áreas hipopigmentadas (13). Morohashi y col. (14) estudiaron los melanocitos de la periferia de las lesiones y reportaron que muchos melanocitos tenían señales de degeneración, tales como vacuolización de melanosomas o agregación grasa. Estos investigadores también buscaron las terminaciones nerviosas en las áreas pigmentadas e hipopigmentadas que rodeaban las lesiones y demostraron continuidad directa entre las células basales de Schwann y los melanocitos normales y anormales.

INICIO DE LA ENFERMEDAD

El Vitiligo puede iniciarse en cualquier etapa de la vida del hombre, desde la infancia hasta la vejez (31). El-Mofty reportó que el 50% de los casos de Vitiligo empiezan entre la segunda y la tercera década de la vida. Lerner reportó que aproximadamente el 50% de 200 pacientes estudiados se dieron cuenta de su enfermedad antes de los 10 años de edad.

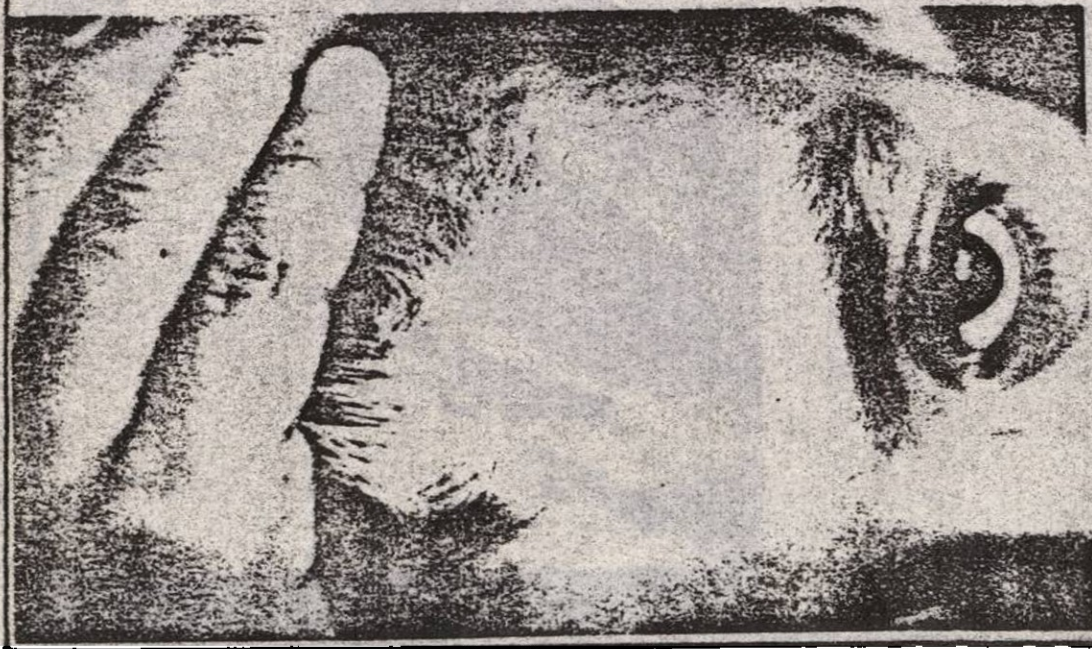


FIG. 2.— VITILIGO FOCAL

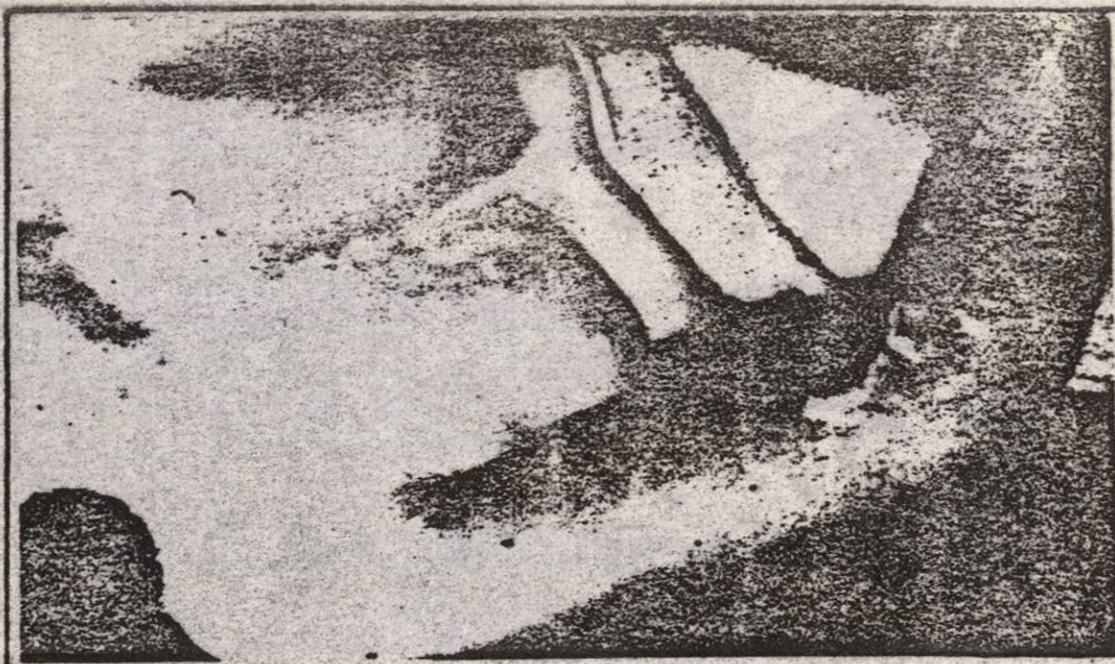


FIG. 3.— VITILIGO SEGMENTAL & UNILATERAL



Fig 4.- VITILIGO EN AREA MUCOSA DE LA BOCA.

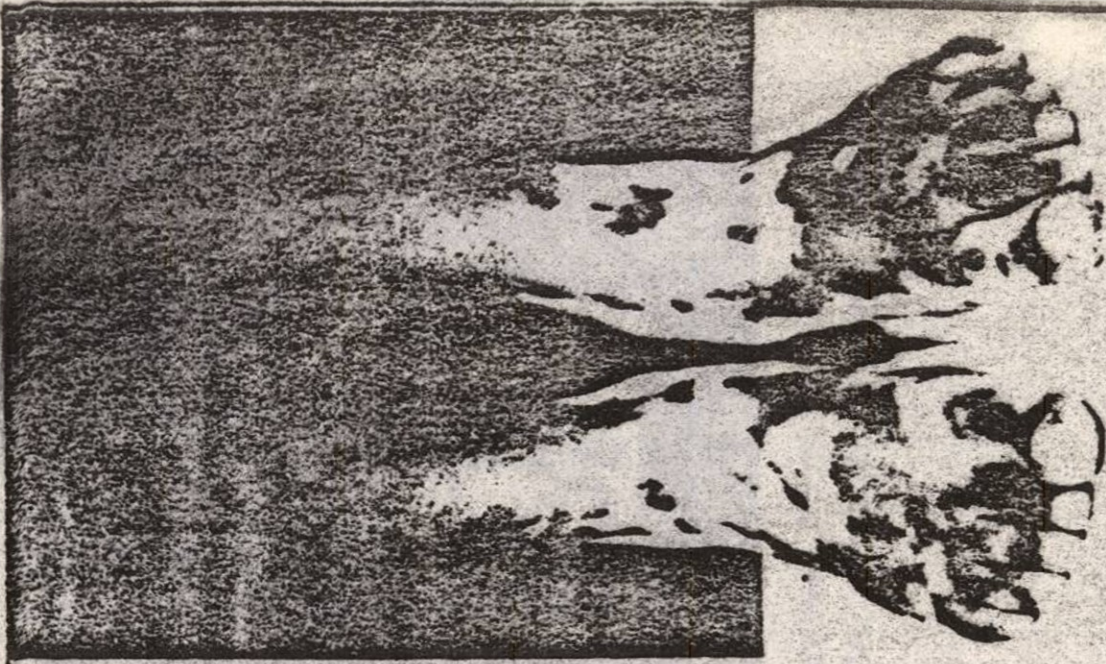


Fig 5.- VITILIGO ACROFACIAL 6
SIMETRICO.

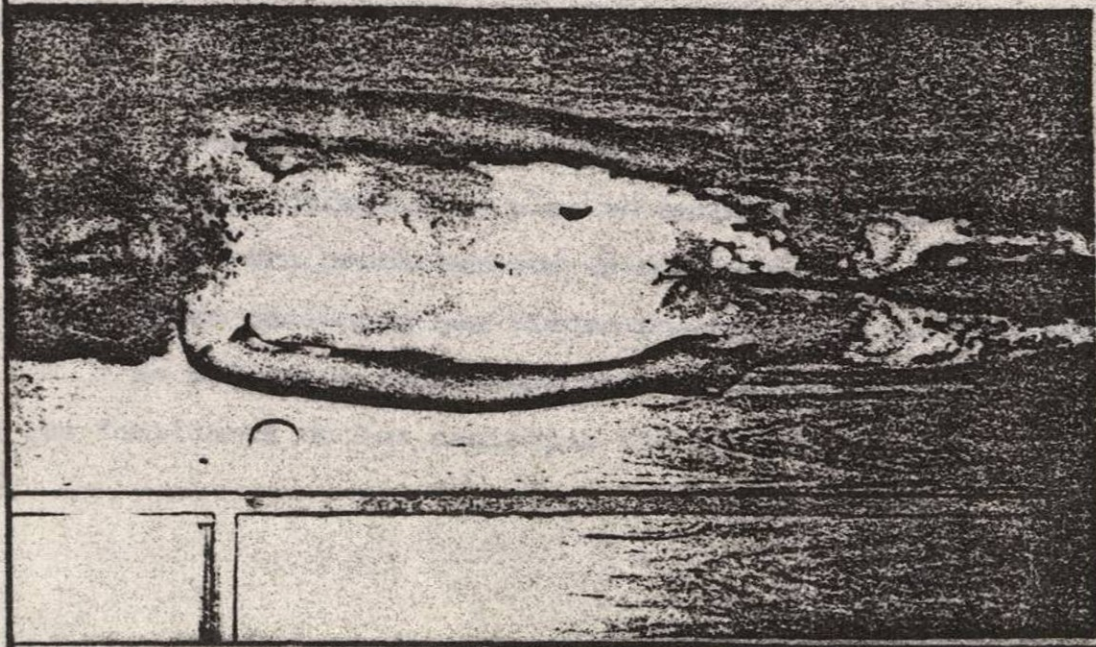


Fig 6.- VITILIGO VULGAR GENERALIZADO.

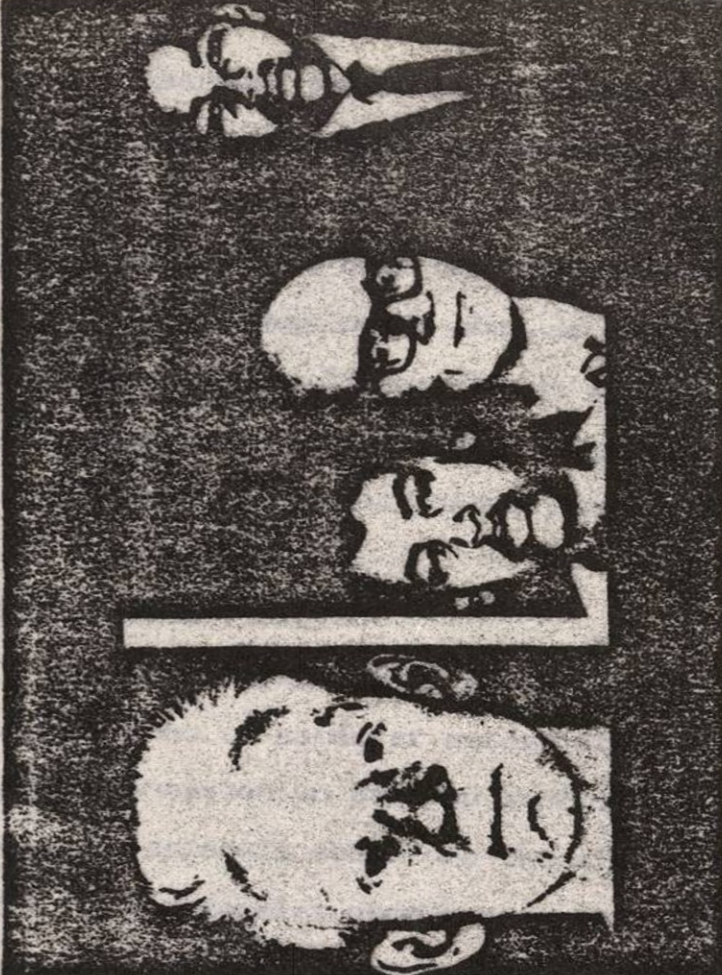


Fig 7.- VITILIGO UNIVERSAL ó TOTAL (foto 1) y
VITILIGO TOTAL más ALOPECIA AREATA (foto 2).

Aparecen áreas hipopigmentadas sobre la piel del sujeto normal, esto puede ocurrir espontáneamente o quizá debido a baños de sol o por trauma físico o emocional (35). Generalmente la pérdida de pigmento disminuye 1-2 años después de la aparición del Vitiligo (47).

Hasta hace pocos años se descartó la posibilidad de que el Vitiligo ocurriera únicamente en seres humanos encontrándose que también ocurre en muchos animales mamíferos como: chimpancés, elefantes, caballos, cerdos, cuervos, gatos y ratones (2).

ETIOLOGIA DEL VITILIGO

La causa del Vitiligo se desconoce (5,33); se cree que es heredado como un carácter autosómico dominante por lo que quizá los pacientes hereden un defecto genético enzimático o estructural (15) (46). Se especula sobre una transformación de los melanocitos en células no funcionales como responsables del Vitiligo, en éstas no hay melanina debido a que en los melanocitos afectados hay falta de actividad de tirosinasa (11). Se han encontrado pruebas que permiten sugerir que el Vitiligo es el resultado de algún trastorno inmunitario (15).

Lerner (2) reportó que hay probabilidades de que el Vitiligo sea de origen hereditario y en un estudio realizado por él, encontró que un 30% era probablemente un número mínimo para la frecuencia de vitiligo en pacientes que tienen una historia familiar de él.

En 545 casos reportados por El-Mofty, aproximadamente un 38% de los familiares de los pacientes tienen Vitiligo.

PATOGENESIS DEL VITILIGO

La patogenicidad del Vitiligo no ha sido completamente aclarada, sin embargo hay 3 diferentes tipos de Vitiligo, clasificados por etiología tratamiento y pronóstico:

- 1) Vitiligo Autoinmune, Progresivo, Idiopático.
- 2) Vitiligo Dermatológico o Segmental.
- 3) Vitiligo Químico o de Contacto.

Esta clasificación está basada en los descubrimientos Etiopatológicos e Inmunológicos. El Vitiligo es probablemente heredado como un carácter autosómico dominante y en todos estos tipos, quizá los pacientes hereden un defecto genético enzimático o estructural. (1,2,10,15).

Vitiligo Autoinmune.- Este tipo quizá aparezca como múltiples manchas blanquecinas más o menos distribuidas en forma simétrica y algunas de estas pueden confluir. El tiempo entre la localización entre las manchas de Vitiligo y la aparición de Vitiligo diseminado varía desde algunas semanas hasta años. El Vitiligo Autoinmune (4,22,44), quizá afecte la cara, el tronco y las extremidades. En raras ocasiones la enfermedad puede progresar a pérdida general del pigmento sobre la superficie de la piel. La evidencia de esta patogenesis es principalmente circunstancial debido a que ésta se basa en el incremento que ocurre del Vitiligo asociado con algunas Enf. Autoinmunes (3,10,20), las que se enumeran en el cuadro II.

CUADRO II

ENFERMEDADES AUTOINMUNES ASOCIADAS AL VITILIGO

Diabetes Mellitus (15,17,19).	Trombocitopenia Crónica (24).
Anemia Perniciosa (17,19,21).	Tiroiditis de Hashimoto (15).
Hipertiroidismo (16,19).	Uveitis (4).
Carcinoma Gástrico (19).	Oftalmia Simpática (14).
Enf. de Addison (2,15,19).	Melanoma (14).
Alopecia Areata (2,15,23).	Enf. Linfoproliferativa (14).
Esclerodermia (2)	Hipoparatiroidismo (25).
Morfea (2,14).	Candidiasis Mucocutánea (25).
Miastenia Gravis (22,23).	Psoriasis (1).
Artritis Reumatoide (22).	Síndrome de Down (26).

La asociación de 1 o 2 de estas Enf. Autoinmunes es posible (5).

Aún en la ausencia de manifestaciones clínicas de algunas enfermedades Autoinmunes asociadas, un marcado aumento de la presencia de anticuerpos contra células parietales gástricas, tiroi-des y suprarrenales han sido encontrados en pacientes con Vitiligo (10). Los pacientes con Vitiligo tienen Anticuerpos elevados en comparación con la población general (26,27). Uno de los problemas para aceptar una base Autoinmune del Vitiligo ha sido la ausencia de "Anticuerpos Antimelanocitos Circulantes". Langhof (36) y Col. reportaron haber encontrado "Anticuerpos Antimelanina Precipitantes" en el suero de la mayoría de 26 pacientes con Vitiligo. Sin embargo en 42 casos estudiados por Woolfson y Col (31) no se encontraron los anticuerpos precipitantes. En 1971 Dobmeir y Sams (32) no fueron capaces de encontrar "Anticuerpos Antimelanocitos" en 10 pacientes con Vitiligo usando Inmunofluorescencia Directa e Inmunofluorescencia Indirecta. En un estudio reciente realizado por Hertz y Col. (25) se evaluó el estudio de 2 pacientes con Vitiligo, Alopecia Areata y Candidiasis Mucocutánea buscando en estos pacientes Anticuerpos contra Células productoras de Melanina. Los resultados por Inmunofluorescencia Indirecta e Inmunofluorescencia Directa fueron negativos para los depósitos de Ig (Inmunoglobulinas) pero la Prueba de Fijación de Complemento demostró un factor sérico en ambos pacientes, este factor se unió intracelularmente a los melanocitos normales, células nerviosas y células del melanoma. La identificación de este factor demostró que se trataba de una IgG la cual activa la Vía Clásica del Complemento.

En 1979 Betterle y Col. (29) evaluaron el estado de 2 pacientes que tenían Múltiples Deficiencia Endocrinas buscando los Anticuerpos contra Células Productoras de Melanina por la Prueba de Fijación de Complemento por IFI, encontraron Anticuerpos en uno de los dos pacientes. Como en otras enfermedades autoinmunes se han hecho intentos para encontrar Antígenos HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) ligados al Vitiligo. En un reporte de 90 pacientes con Vitiligo comparado con 241 controles normales, no se encontró ningún marcador específico HLA ligado al Vitiligo (34, 37).

Vitiligo Dermatológico o Segmental.- Debido a que los melanocitos se originan en la cresta neural es lógico pensar que los factores neurales juegan un papel muy importante en la patogénesis del Vitiligo en casos en los cuales tiene una distribución dermatomérica (38, 39).

Clínicamente este tipo de Vitiligo aparece distribuido unilateralmente, hay la pérdida de color de una gran área o áreas aisladas que involucran una región específica inervada por una sola rama del trigémino facial y/o los nervios intercostales (Fig. 3).

Las áreas afectadas terminan bruscamente en las áreas medias del cuerpo usualmente su medida es máxima y la extensión y los remanentes estacionarios en ese lugar sin algún signo de provocación o extensión es un tipo relativamente raro representando solamente el 1% (15).

Koga (33) ha demostrado que en el Vitiligo distribuido dermatoméricamente hay un descenso en la sudoración y una elevación de la misma en la etapa tardía. En el Vitiligo de distribución no dermatomérica la actividad de los nervios simpáticos no tuvo ningún cambio (15).

Por microscopia electrónica se encontró que en algunas áreas Vitiliginosas había cambios degenerativos en la porción terminal del nervio periférico (41). Este descubrimiento proporciona una base morfológica para observaciones de los cambios de temperatura de la piel. Lerner (2) sostiene que la hipopigmentación es producida por el exceso de un agente neurotóxico liberado en la proximidad de un melanocito, este agente puede ser Norepinefrina o alguna otra Catecolamina, liberada en mayor cantidad en las terminaciones nerviosas periféricas.

Vitiligo Químico o de Contacto.- Vitiligo Químico es el nombre dado por la pérdida del pigmento en las manos de las gentes que trabajan con detergentes, germicidas o gomas que contienen Monobenzoato de Hidroquinona (2,15,30,31). Algunos compuestos como Monohidroxifenil y Dihidroxifenil tienen la propiedad de destruir los melanocitos. Una vez que el proceso de despigmentación se inicia, la pérdida del pigmento ocurre en algunas partes muy remotas al sitio inicial de contacto (15,30).

En la medida que los fenoles vinieron a tener un amplio uso desde 1867 cuando Lister (43) encontró la utilidad del Acido Carboxílico como antiseptico en Cirugía, estudios posteriores han demostrado que este Acido provoca despigmentación de la piel. El uso de desinfectantes químicos durante la última década del siglo XX se ha difundido su uso por métodos relativamente efectivos de control bacteriológico de nuestro medio.

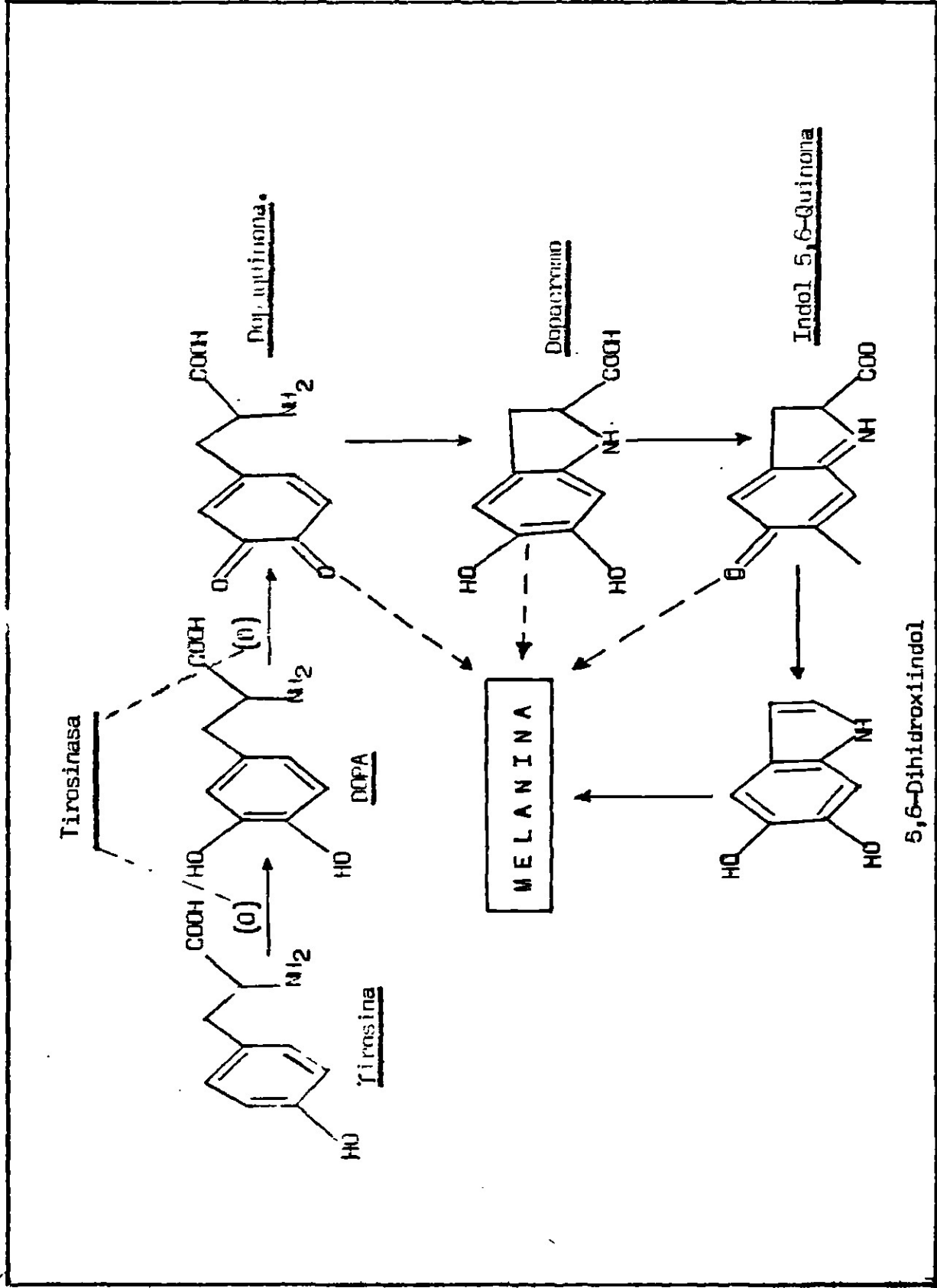
Los fenoles se han convertido en una ayuda casera popular como desinfectante y son ampliamente usados en Instituciones donde la primera etapa de la limpieza y desinfectación reduce favorable-

mente los costos laborales.

Los fenoles son resistentes a prolongados calentamientos y secados, dejan una película residual estable sobre las superficies tratadas, haciéndolas ideales para combatir la contaminación superficial causada por microorganismos. Desafortunadamente la adición de los fenoles a los detergentes los ha hecho más irritantes para las personas expuestas a ellos debido a su penetración a través de la piel.

Las Sustancias Químicas que produce despigmentación incluyen : Tióles, Catecoles, Quinonas, Mercaptoaminas, Compuestos Fenólicos, Derivados de Catecoles.

La pérdida de la pigmentación es el resultado de la inhibición de la Tirosinasa, enzima del interior de los melanocitos (2,43) necesaria para la producción de la melanina a partir de Tirosina y también a partir del efecto citotóxico, de los compuestos mencionados anteriormente (43). En la Fig. 9 se muestra la Química General de la vía metabólica de Tirosina a Melanina basada en los estudios de Hempel, Swan y Nicolaus group. (From [2], with permission.)



TRATAMIENTO

Para los pacientes con Vitiligo se dispone en la actualidad de cuatro posibilidades terapéuticas:

- 1.- Blanquear la piel que rodea las placas de Vitiligo con el fin de evanecer los bordes o, incluso, eliminar la totalidad de la pigmentación residual en los casos severos generalizados. Los bordes de las lesiones pueden disminuirse mediante la aplicación de Compuestos de Hidroquinona (Artra, Eldoquin, Novo-Dermoquinona). Para eliminar el pigmento permanente es necesario aplicar una crema de Monobenciléter de Hidroquinona (Benoquin). La aplicación de esta crema requiere de muchas precauciones ya que puede producir la despigmentación de áreas distantes de la zona tratada.
- 2.- Evitar completamente la exposición al sol, con lo que disminuye la intensidad de la pigmentación normal en individuos de piel clara y haciendo por consiguiente menos visible las placas de Vitiligo.
- 3.- Intentar la repigmentación cutánea mediante compuestos fotosensibilizantes habitualmente Psoralenos de uso tópico o sistémico. Como norma general, en los casos en ² que la piel afecta de Vitiligo tenga una extensión menor de 10 cm puede utilizarse Psoralen tópico; si la superficie afectada sobrepasa el 40% de la superficie corporal se empleara Psoralen por vía general complementándolo con la acción de la luz solar; si la superficie afectada es superior al 50% debe pensarse en la conveniencia de utilizar Monobenciléter de Hidroquinona. Es conveniente que los Psoralenos de aplicación tópica se apliquen al paciente en el consultorio con la exposición cronometrada subsiguiente a una lámpara de luz UV-A apropiada.

Los compuestos de Psoralen, que se encuentran al estado natural en distintas plantas, y que además se producen en forma sintética, actúan fundamentalmente aumentando la respuesta cutánea a la acción de los rayos solares o UV-A (320-400 nm), tanto si se aplican tópicamente como si se administran sistémicamente, por esta razón el tratamiento debe ser gradual.

La administración general se inicia con 30 mg de Trimetil-psoralen (Dermetrix) dos horas antes de la exposición por espacio de 20 a 30 min. a radiación solar o radiación UV-A, ambas exposiciones se aumentan 15 seg. por día, antes que alcance después de cada exposición un enrojecimiento que se inicia a las 8 hr. de haberse expuesto a la radiación solar o UV-A y que alcanza su máxima intensidad a las 24 o 36 hr. Si tras una hora y media de exposición a la radiación no se produce el enrojecimiento esperado, la cantidad de trimetil-psoralen administrado se puede aumentar gradualmente de 10 en 10 mg hasta totalizar 50 mg.

La repigmentación de inicia alrededor de los folículos pilosos, extendiéndose y confluyendo progresivamente. El tratamiento debe prolongarse durante un período comprendido entre 3 y 18 meses y, a menudo, durante varios años. Las lesiones de la cara y del cuello se repigmentan más fácilmente que las situadas a nivel de las prominencias óseas, como dorso de las manos, codos y rodillas. El tratamiento con Psoralen aumenta la tolerancia cutánea a los rayos solares y UV-A, gracias al aumento de la pigmentación de la capa córnea. En consecuencia puede resultar útil para aumentar la tolerancia a la acción de la radiación en los individuos de piel clara.

Cuando los psoralenos se aplican tópicamente (y únicamente sobre superficies pequeñas) da mejores resultados irradiar con luz negra (360 nm). La exposición, incluso por un corto espacio de tiempo, a la luz solar intensa puede determinar la formación de ampollas.

La aplicación de una solución tópica de methoxipsoralen al 1% (Dermox) debe hacerse del modo siguiente:

- a).- Inicialmente se aplicará cada cinco días y posteriormente con una frecuencia de 3 en 3 días.
- b).- El methoxipsoralen debe aplicarse con un algodón dejándolo secar por espacio de 1 a 2 min. y efectuar una nueva aplicación al cabo de ese tiempo.
- c).- Al cabo de dos horas se somete la misma área a la acción de la luz negra a 4 cm de distancia por espacio de 4 min. Puede utilizarse cualquier tipo de lámpara de luz de Wood, o pequeñas lámparas portátiles de luz negra (p.ej.,UVL-21, de UV Products, San Gabriel, California) o simplemente tubos fluorescentes de luz negra (p.ej.,F-40BL;GE).
- d).- La zona afecta debe lavarse con agua y jabón después del tratamiento.
- e).- Si no se consigue la aparición del eritema (primeras manifestaciones eritematosas a las 24 horas después de un eritema máximo a las 48 horas) debe aumentarse gradualmente la exposición de 2 en 2 min. en las siguientes exposiciones, hasta alcanzar la respuesta deseada.
- f).- Debe evitarse la exposición del área afectada a la luz solar

por espacio de las 12 horas siguientes. Si las lesiones tratadas están en parte descubiertas, deben cubrirse con una capa protectora de un filtro solar de Benzofenona (Uval). Los productos que contienen Benzofenona tienen un espectro de absorción amplio y protegen desde 250 a 360 nm, aunque por otro lado sólo ofrecen una protección parcial. Este tipo de preparados se desprende fácilmente de la superficie cutánea por lo que debe aplicarse frecuentemente.

g).- Las lesiones pueden disimularse con la aplicación de colorantes o cosméticos, tipo Covermack, que constituyen un excelente maquillaje, Neo-Dyoderm que contiene anilina y dioxiacetona o Walnut Stain Depelle.

4.- Otro tipo de tratamiento cuando la despigmentación es incipiente y no mayor del 10%, consiste en aplicación tópica de pomadas conteniendo glucocorticoides y al mismo tiempo administrar tranquilizantes por vía oral ya que se ha dado importancia al stress psicológico en la patogénesis del Vitiligo.

Los Psoralenos son compuestos furocumarinos de acción fototóxica que se encuentran al estado natural en muchas plantas incluyendo el "Ammimajus-linn" (planta de origen egipcio), la Umbellifere y la Bergamot. Además se produce en forma sintética, actúan fundamentalmente aumentando la respuesta de pigmentación a la acción de los rayos solares o luz UV-A, tanto si se aplican tópicamente como si se administran sistémicamente, por esta razón el tratamiento debe ser gradual.

Los Psoralenos más comúnmente empleados en nuestro estudio fueu

ron:

De aplicación Tópica:

Dermox (8 Metox-psoralen)

Locoid (Butirato de Hidrocortisona)

Meladinina (Metoxi-fureno, cumarino)

Cortarquin (Cortisona, alquitrán de hulla y quinoleina)

aplicado según se explicó anteriormente.

De uso Sistémico:

Dermetrix (Trimetil-psoralen)

II.- MATERIAL
Y
METODO

I.- MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Cortes de Tejido

a) Cortes de Nevo. Los nevos obtenidos para este trabajo se emplearon como fuente de células melánicas, por lo que la selección del nevo fue específica. Se obtuvo de pacientes con problemas de Nevos de Células Névicas (Lunares) que acudían al Servicio de Dermatología del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto de San Luis Potosí S.L.P.", La obtención de estos nevos se realizó mediante Técnica Quirúrgica especial los cuales después de su extracción se congelaban inmediatamente en Nitrogeno Líquido para ser transportado al Crióstato, el cual conserva constantemente una temperatura de -20°C que es la temperatura ideal para cortes de tejido. De estos tejidos se hicieron cortes congelados de 4 micras de grosor para facilitar la observación al microscopio de inmunofluorescencia.

b) Cortes de Hígado de Ratón. El hígado se obtuvo de un ratón previamente sacrificado, conservándose inmediatamente después a temperatura de -20°C en el Crióstato en donde posteriormente se efectúan los cortes de 4 micras de grosor; estos cortes se emplearon como fuente de Antígeno para la prueba control de la Técnica de Anticuerpos Fijadores de Complemento por IFI.

2.- Sueros

a) Sueros Problema. Se obtuvieron 25 muestras de suero problema de pacientes con Vitiligo, que se encontraban en tratamiento y bajo observación médica periódica en el Servicio de Dermatología del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" de San Luis Potosí S.L.P. Las 25 muestras fueron enviadas al Lab. de Inmunología de la Esc. de Medicina de San Luis Potosí.

Las muestras de suero fueron conservadas a temperatura de -20°C por un período no mayor de una semana bajo estrictas condiciones estériles.

b) Suero Fuente de Complemento Normal.

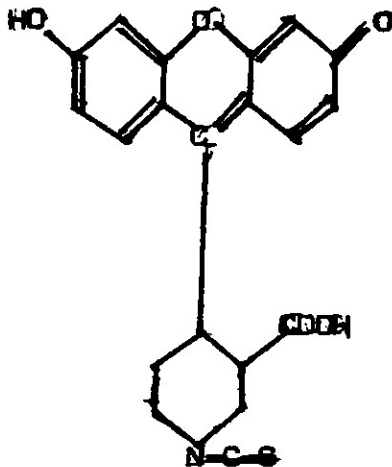
El suero se obtuvo de personas sanas empleándose el mismo día, debido a que el complemento se inactiva a las pocas horas de haberse extraído.

c) Sueros Controles. Se emplea suero

frente de complemento previamente inactivado en baño maría a 56°C además de suero positivo (1:100) de Anticuerpos Antinucleares de pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado Activo.

3.- Conjugados de Isotiocianato de Fluoresceína. Anti-IgG, Anti-C3. Las observaciones importantes de estos conjugados son las siguientes:

El Isotiocianato de Fluorescencia (ITCF) es uno de los fluorocromos más empleados en la actualidad por ser altamente específico, tiene un espectro de absorción máxima a 490 nm y emiten fluorescencia de color verde. La fórmula de este fluorocromo es:



El proceso de marcar o conjugar Anticuerpos con este fluorocromo implica la unión covalente de la fluoresceína con los residuos Epsilon-Amino de Lisina y los grupos Aminoterminales de la proteína (Anticuerpo). Estas uniones se llevan a cabo espontáneamente a un pH alcalino y en esta forma es como se produce la conjugación. Posteriormente se somete a diálisis contra OBS y así se elimina el ITCF no unido al anticuerpo. Una vez hecho esto, el conjugado está listo para su caracterización.

Las características principales de los conjugados son las siguientes:

- 1.- Especificidad.
- 2.- La relación Fluoresceína-Proteína (F/P).
- 3.- La relación Anticuerpo-Proteína (Ac/P).

ESPECIFICIDAD

Se refiere a la selectividad del sitio activo del anticuerpo producido, es decir hacia qué antígeno está dirigido este anticuerpo. De los conjugados mencionados anteriormente, las Anti-IgG, Anti-IgA, Anti-IgM están dirigidas en contra de las cadenas pesadas que son características de tipo de inmunoglobulinas (Gamma). El conjugado con actividad Anti-C3 se utiliza para detectar proteínas (Factor C3 del Complemento) depositadas en tejidos.

RELACION FLUORESCEINA-PROTEINA

La cantidad de fluoresceína y de proteína en un conjunto, es proporcionada usualmente por el fabricante. Dicha cantidad es del orden de mcg y el de proteína es de mg. La relación fluoresceína-proteína

(F/P) se obtiene simplemente dividiendo ambas cantidades. esta relación se puede expresar en peso/peso y en mol/mol, siendo este último más frecuente.

Es evidente que mientras mayor sea la relación, será más alto el contenido de fluoresceína en los anticuerpos y así durante la observación de estos al microscopio producirán una mayor fluorescencia y por esta razón es necesario utilizar siempre en una determinada prueba conjugados con similar relación F/P.

En base a la relación F/P, los conjugados se clasifican en:

Bajo _____	1.0 a 1.4 (molar)
Intermedio _____	1.8 a 2.5 (molar)
Alto _____	Mayor de 3 (molar)

RELACION ANTICUERPO-PROTEINA

La cantidad de anticuerpo es también usualmente proporcionada por el fabricante. La relación (Ac/P) indica la proporción de anticuerpos específicos en relación con el contenido total de proteínas que contiene el conjugado. Es acuerdo general el considerar aceptable un conjugado sólo si la relación es mayor de 0.1 (10% de Ac).

Mientras mayor sea la relación Ac/P será mayor la dilución que se usa para el conjugado. En general para Inmunofluorescencia Indirecta, se utiliza a 25-50 mcg/ml.

SELECCION DE CONJUGADOS

La selección de conjugados se hizo en base a su especificidad, relación F/P y cantidad de Ac, todas las cuales ya han sido descritas.

II.- EQUIPO DE LABORATORIO

- 1.- Microscopio de Inmunofluorescencia.
- 2.- Crióstato.
- 3.- Cámara Húmeda.
- 4.- Centrifuga.
- 5.- Termómetro.
- 6.- Potenciómetro.
- 7.- Gradillas.
- 8.- Otros (porta-objetos, cubre-objetos, pipetas, lápiz diamante, jarras Goplin, matraces volumétricos, vasos de precipitado y picetas).

Breve desarrollo de IF y la importancia del Microscopio de IF empleados en el desarrollo de Ac Fijadores de Complemento en el suero de pacientes con vitiligo por IFI.

La inmunofluorescencia se basa en la utilización de anticuerpos "Marcados" dirigidos en contra de la sustancia a detectar; así por ejemplo si se desea detectar un anticuerpo Anti-C3, como en el caso de la búsqueda de Ac fijadores de complemento en pacientes con vitiligo que se desea detectar, este componente del complemento en la unión dermo-epidérmica de una biopsia. El anticuerpo se marca uniendo a él una sustancia que produzca fluorescencia mediante un procedimiento llamado de conjugación. De este modo si observamos que al añadir un anticuerpo marcado con actividad Anti-C3 a una biopsia de piel (nevo) la unión dermo-epidérmica, esto significa que existen depósitos de C3 en ese sitio de la piel.

TEORIA DE LA FLUORESCENCIA

La luz es una forma de energía electro-magnética a la que se le denomina radiante. Los electrones que se encuentran en orbitales de enlace de moléculas orgánicas, pueden ser excitadas por este tipo de energía. Este proceso de excitación implica un salto de electrón (o electrones) a un estado de mayor energía, que en el caso de fluorescencia es casi siempre el denominado "de singulete excitado". La vida media de este estado es muy corta, volviéndose al estado fundamental mediante un proceso llamado de desactivación; este proceso puede llevarse a cabo por diversos mecanismos, uno de ellos es la emisión de fluorescencia y así hacer que esa molécula en particular fuera no fluorescente. En vista que esto es muy frecuente, son pocos los compuestos orgánicos que tienen la propiedad de emitir fluorescencia. Cada molécula en particular es excitada máximamente por una luz de cierta longitud de onda, denominándose a este espectro de absorción.

La fluorescencia tiene dos características notables, la primera de ellas es que desaparece casi al mismo tiempo que lo hace la radiación electromagnética excitadora y la segunda es que presenta el fenómeno de apagamiento; esto se refiere al hecho de que al someterse a la luz excitadora un compuesto fluorescente, éste va perdiendo progresivamente su capacidad de emitir fluorescencia, esto es debido a fenómenos complejos no bien conocidos, dos de ellos podrían ser el de autoexcitación que se produce al chocar las moléculas fluorescentes, desactivándose, sin emisión de fluorescencia y el de autoabsorción que se produce al absorber un compuesto fluorescente, la misma radiación que está emitiendo.

MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA

El microscopio de inmunofluorescencia que se empleó en el desarrollo de la técnica de anticuerpos fijadores de complemento en pacientes con vitiligo fue el "Microscopio de Inmunofluorescencia de Iluminación Vertical" llamado también de Epi-Iluminación (Fig.11) descrito en seguida:

Este microscopio difiere de un microscopio convencional en dos partes muy importantes que son:

- a) Fuente luminosa.
- b) Uso de filtros.

FUENTE DE LUZ

Este microscopio utiliza fuente luminosa de alta intensidad, y las lámparas usualmente empleadas son de Halógeno-Cuarzo. La fuente luminosa se encuentra entre los oculares y objetivos y a través de estos últimos llega al porta-objetos, implica además el uso de espejos dicróicos que tienen la propiedad de reflejar la luz excitadora y emitir la luz producida por el fluorocromo; en este caso los objetivos funcionan como condensador, prefiriéndose el uso de objetivos con alto N.A (apertura numérica) ya que mientras mayor es ésta es mejor la iluminación.

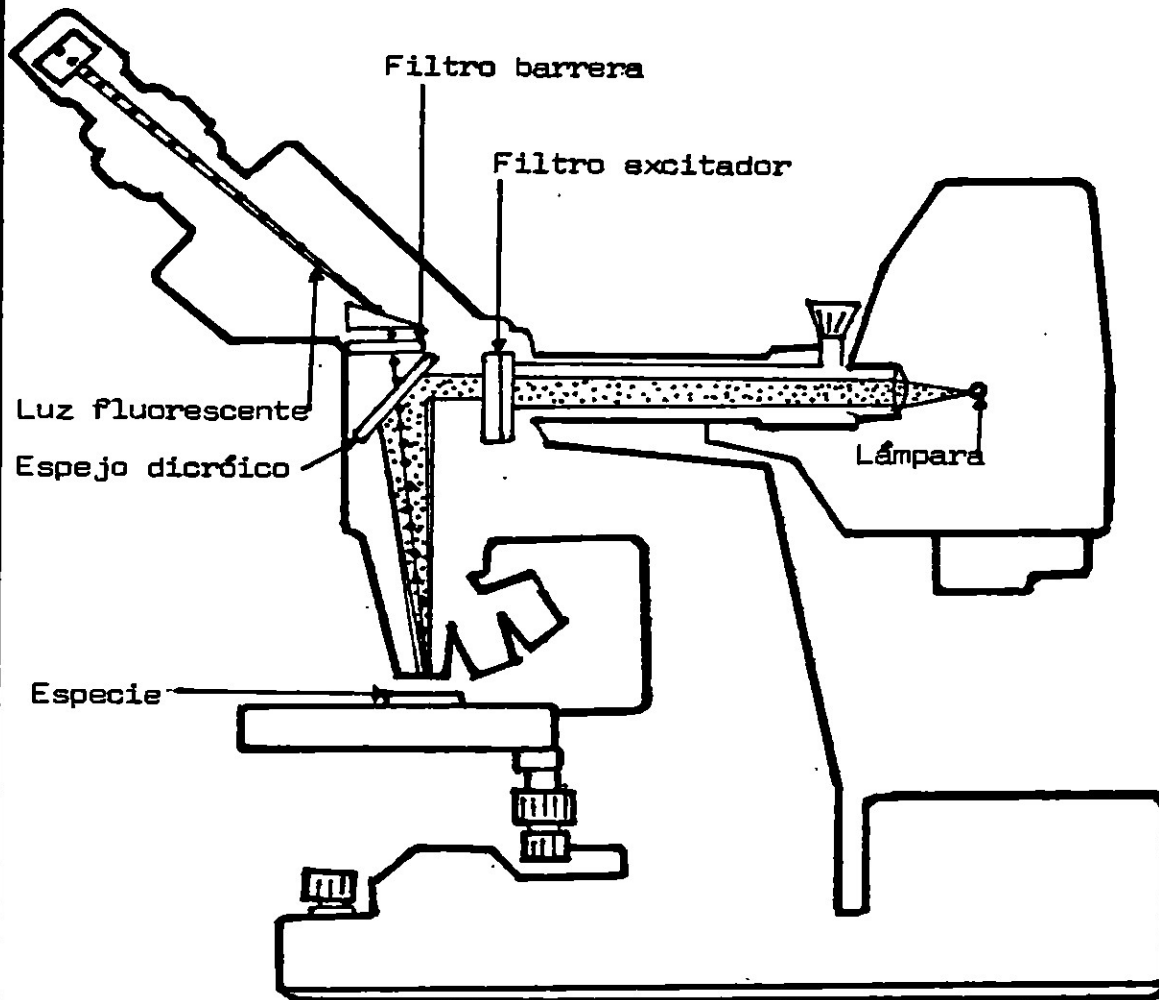
USO DE FILTROS

Son de dos clases:

- 1.- Filtros Excitadores.
- 2.- Filtros Barrera.

Los filtros excitadores se encuentran colocados entre los objetivos

Fig. 11 Muestra esquemática del microscopio de inmunofluorescencia con sistema de Epi-Iluminación.



y tienen la función de eliminar la luz indeseable, permitiendo el paso de la luz cuya longitud de onda sea la ideal para excitar al fluorocromo. Los filtros barrera se encuentran colocados entre el porta-objetos y los oculares y tiene la función de impedir el paso de la luz cuya longitud de onda no corresponda a la producida por la sustancia fluorescente y así facilitar su visualización.

Marca del Microscopio: AMERICAN OPTICAL (Spencer) con:

- 1.- Iluminador Vertical 2070H.
- 2.- Lámparas de Halógeno-Cuarzo.
- 3.- Filtros Excitadores BG-12.
- 4.- Filtros Barrera OG-515.
- 5.- Espejos Dicroícos.
- 6.- Longitud de Onda 500 nm.

PREPARACION DE SOL. BUFFER FOSFATOS (PBS):

Na Cl	_____	6.798 g
Na ₂ HPO ₄	_____	1.478 g
KH ₂ PO ₄	_____	0.430 g

Se colocan las sales anteriores en las cantidades señaladas, en 500 ml de agua destilada, se agita hasta disolver y se afora a 1000 ml. El pH deberá ser de 7.0.

PREPARACION DEL MEDIO DE MONTAJE:

Glicerol	_____	9 partes
PBS	_____	1 parte

Se realiza la mezcla anterior y se determina el pH que deberá ser de 7.0. Debido a la velocidad del medio no es posible hacerlo con potenciómetros convencionales y en la práctica se realiza con tiras reactivas comerciales.

TECNICA DE IFI CON FIJACION DE COMPLEMENTO

Gran parte de los anticuerpos activan ("fijan") al sistema complemento, actuando este sistema como amplificador de la respuesta inmune humoral. Así se sabe que un sólo complejo Ag-Ac puede fijar muchas moléculas de complemento. En ocasiones las técnicas de IFI convencionales no son capaces de detectar un anticuerpo, debido a que estos se encuentran en cantidades muy pequeñas. Si este anticuerpo es fijador de complemento, al unirse al antígeno provocará el depósito de factores de complemento en el sitio que se lleve a cabo la reacción Ag-Ac.

La IFHa aprovechado ese hecho y así sí es incapaz de detectar al anticuerpo, puede en cambio hacer evidentes las moléculas de complemento, ya que éstas se encuentran en mayor cantidad. Esto se hace mediante la técnica de IFI modificada. En Vitiligo se han detectado anticuerpos antimelanocitos sólo mediante esta técnica. El procedimiento que se emplea es el siguiente:

- 1.- Se inactiva el suero problema incubándolo a 56^o C por 30 min en baño maría.
- 2.- Se hacen las siguientes diluciones del suero problema: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
- 3.- Se preparan laminillas de cortes congelados de un nevo pigmentado.
- 4.- Se coloca cada una de las diluciones del suero sobre uno de los cortes y se incuban a temperatura ambiente durante 30 mins. en cámara húmeda. Se realizan además incubaciones con suero humano normal sin diluir y con un suero positivo a títulos altos para AAN. Estos sueros deben estar también inactivados.

- 5.- Eliminar el suero con un chorro débil de PBS y lavar posteriormente en jarras de Coplin con PBS durante 10 min.
- 6.- Eliminar el exceso de PBS con papel absorbente, evitando que los cortes se sequen.
- 7.- Cubrir los cortes con suero humano normal (fuente de complemento) e incubar durante 30 mins. a temp. ambiente en cámara húmeda.
- 8.- Repetir los pasos 5 y 6.
- 9.- Cubrir todos los cortes con conjugado anti-C3 e incubar igual que en 7.
- 10.- Repetir los pasos 5 y 6.
- 11.- Cubrir los cortes con laminillas cubre-objetos, colocando previamente una gota del medio de montaje.

Observar al microscopio de fluorescencia. Se considera positivo si existe tinción de las células melánicas.

El control llevado a cabo con un suero positivo para AAN sirve para probar que la técnica fue llevada a cabo correctamente. Este corte debe mostrar intensa fluorescencia de los núcleos (los AAN son usualmente fijadores de complemento).

El suero fuente de complemento se diluye 1:10 con una sol. de tris-buffer 0.15 M pH 7.0 a la que se le añade Ca y Mg ambos a una concentración de 0.0025 M.

La especificación de la reacción puede comprobarse utilizando como fuente de complemento un suero humano normal, pero ahora diluido en solución salina. Si existe tinción significa que esta no es específica ya que el suero diluido carece de iones (Ca y Mg) necesarios para la activación del complemento y así estos deben ser suplementados.

III.- RESULTADOS .

CUADRO III. RESULTADOS GENERALES DEL ESTUDIO CLINICO Y DE
LABORATORIO REALIZADO EN EL SUERO DE 25 PACIENTES
CON VITILIGO.

Núm.	Sexo	Edad	Tipo de Vitiligo	Duración	Tratamiento con UV-A	Evolución	Ac v.s Melano.	Duración del tratamiento
1	M	14	V	5 a.	Dermox	I	(-)	12 días
2	F	12	IV	9 a.	Dermox	III	(-)	13 meses
3	F	42	V	7 a.	Dermox	III	(-)	9 meses
4	M	14	I	1 a.	Dermatrix	I	(-)	7 días
5	F	16	IV	10 a.	Meladinina	III	(-)	8 meses
6	M	25	I	7 a.	Dermatrix	III	(-)	2 años
7	M	15	V	5 a.	Meladinina	III	(-)	9 meses
8	F	9	V	4 a.	Locoid	III	(-)	1 año
9	M	11	I	1 a.	Meladinina	II	(-)	10 meses
10	M	30	IV	14 a.	Cortarquin	I-II	(-)	8 meses
11	M	14	V	2 a.	Dermatrix	II	(-)	7 meses
12	M	53	V	2 a.	Vioformo	0-I	(-)	2 meses
13	F	6	V	1 a.	Dermox	III	(-)	11 meses
14	F	9	I	1 m.	Tridesillon	III	(-)	1 mes
15	F	47	V	5 m.	Dermatrix	III	(-)	2 meses
16	F	5	V	5 m.	Dermox	II	(-)	5 meses

CONTINUA TABLA III

Núm.	Sexo	Edad	Tipo de Vitiligo	Duración	Tratamiento con UV-A	Evolución	Ac v.s. Melano.	Duración del tratamiento.
17	F	27	V	23 a.	Meladinina	II	(-)	1 año
18	M	13	V	4 a.	Meladinina	II	(-)	2 años
19	M	14	V	6 a.	Meladinina Dermox	III	(-)	3 años
20	M	13	V	1 a.	Dermetrix	III	(-)	1 año
21	M	61	V	14 a.	Meladinina	II	(-)	1 año
22	M	35	V	2 a.	Meladinina	II	(-)	14 meses
23	M	17	I	4 a.	Meladinina	II	(-)	7 meses
24	F	23	V	11 a.	Meladinina	III	(-)	2 años
25	F	10	V	5 a.	Dermox Dermetrix	III	(-)	2 años

Tipos de Vitiligo.

- I.- Focal (I región).
- II.- Segmentario (Neural, Dermatómico).
- III.- Mucosas exclusivamente.
- IV.- Generalizado acrofacial.
- V.- Vulgar (generalizado).
- VI.- Universal (Albinos).

Evolución del tratamiento.

- 0.- Sin cambios favorables.
- I.- Recuperación de 0-25 % del pigmento.
- II.- Recuperación de 25-50% del pigmento.
- III.- Recuperación de 50-75 % del pigmento.
- IV. Recuperación del 100 % del pigmento.

El presente trabajo se realizó usando la técnica de Anticuerpos Fijadores de Complemento por IFI para la búsqueda de Ac Anti-Melanocitos en el suero de las 25 pacientes con Vitíligo y que según los expedientes clínicos previamente revisados no presentaban ninguna enfermedad autoinmune.

La prueba de Fijación de Complemento se efectuó por varios pasos secuenciales. Como se explica en la técnica de anticuerpos fijadores de complemento por IFI por medio de la cual se incubaron a temperatura de 37°C cortes de nevo con suero humano fresco previamente inactivado a 56°C, este suero se empleó como fuente de complemento y fluoresceinato anti C-3, anticuerpos fijadores de complemento unido al antígeno en el sustrato fijador de complemento y fueron observadas al microscopio de fluorescencia equipado con epi-iluminación. Los pacientes acudían a la clínica del Vitíligo del servicio de Dermatología del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" y recibían Psoralenos tópicos y/o por vía oral la radiación UV-A convencionales con grados variables de éxito en lo que se refiere a pigmentación. En ellos se buscaron anticuerpos antimelanocitos fijadores de complemento por IFI.

IV.- RESUMEN Y CONCLUSIONES .

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El propósito de éste trabajo es demostrar la presencia de Anticuerpos Fijadores de Complemento por la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en pacientes con Vitiligo, empleando como método de comparación Anticuerpos Antinucleares por IFI con patrón positivo. En Vitiligo se ha demostrado la presencia de dichos Anticuerpos Antimelanocitos Fijadores de Complemento por esta técnica que es específica y de alta sensibilidad, basándose en otras Investigaciones anteriores y según la revisión de la bibliografía.

El Vitiligo es aún una enfermedad cuya etiología y patogenia se desconoce por lo que se trata en forma conservadora con aplicación e ingestión de sustancias fotosensibilizantes y la exposición ulterior a rayos solares o a lámparas artificiales que emiten radiación UV-A (320-400 nm).

En algunos casos se ha reportado mejoría con la aplicación tópica de Esteroides aunado a la administración de tranquilizantes por vía sistémica.

Se han postulado varias teorías para la etiopatogenia de la despigmentación muchas veces progresiva que ocurre durante el curso de la enfermedad, sobresaliendo entre ellas la teoría del "desgaste", la "neurohumoral" y la de "contacto" por sustancias químicas que causan despigmentación.

A partir de la era en que se ha dado auge a la Inmunología se han estudiado bastantes enfermedades de origen Autoinmune (ver cuadro No. II) y se ha notado una asociación bastante frecuente de éstas enfermedades en el Vitiligo, lo que ha sido demostrado por otros

autores. En nuestro estudio no encontramos dichos anticuerpos, pero ésto no obsta para que en estudios futuros se logre dilucidar si efectivamente la despigmentación en pacientes con Vitiligo ocurre por daño mediado por complejos inmunes que activan complemento a nivel de Melanocitos, ya sea en pacientes que padecen solamente Vitiligo o en aquellos que sufren además de enfermedades de origen Autoinmune.

Por otra parte queda también la posibilidad de que sea una alteración genética a nivel enzimático o estructural en los Melanocitos y que trasmita en forma autosómica dominante con penetrancia variable ya que se han demostrado antecedentes positivos hasta en 30% de los familiares de pacientes con Vitiligo.

Esperamos que estudios posteriores sobre todo en éstas dos últimas disciplinas logren dilucidar la etiopatogenia del Vitiligo para poder establecer un tratamiento específico y esperamos que más efectivo.

V.- BIBLIOGRAFIA .

REFERENCIAS

- 1.- Mc Burney,MD:Vitiligo,Clinical Picture and Pathogenesis.Arch Intern Med 139:1295-1297, 1979.
- 2.- Lerner AB:The Etiology of Vitiligo and Gray Hair.Am J Med 51:141-147, 1971.
- 3.- Dobmeier LJ,Sams WM:Autoimmunity in Vitiligo.J Invest Dermatol 56:410, 1971.
- 4.- Betterle C,Peserico A,Bersani G:Vitiligo and Autoimmune Polyendocrine Deficiencies with Autoantibodies to Melanin-Producing Cells.Arch Dermatol 115:364, 1979.
- 5.- John A Parrish,MD;Thomas B Fitzpatrick,MD;Christopher Shea:Photochemotherapy of Vitiligo:Arch Dermatol 112:1531-1534, 1976.
- 6.- Surinder K Arora,MD:Factors Influencing Methoxsalen Phototoxicity in Vitiliginous Skin.Arch Dermatol 112:327-332, 1976.
- 7.- Amado Saul,MD:Psicodermatosis.Lecciones de Dermatología 9:226-229, 1979.
- 8.- Kenneth A.Arndt MD:Hiperpigmentación e Hipopigmentación.Manual de Terapéutica Dermatológica 15:91-104, 1976.
- 9.- Meyer FH,MD.Jawetz E,MD.Goldfien,MD:Aplicaciones de Dermatología.Manual de Farmacia Clínica 5:42-43, 1980.
- 10.-Fitzpatrick TB,Mihm MC:Abnormalidades of the melanin pigmentary system,in Fitzpatrick TB,Arndt KA,Clark WH,et al (eds).Dermatology in General Medicine.New York Mc Graw-Hill Book Co Inc 1971 pp 1591-1637.
- 11.-Anthony N.Domankos,MD:Tratado de Dermatología.1975 pp 1010.
- 12.-Graham,MD,Sylvia M,Tiffang,MD:Toxicity of melanin precursors. J. invest Dermatol 70:113-115, 1978.

- 13.- A.Monom, El-Mofty, MD: A Symptom Complex. J.Dermatol 19:237-244, 1980.
- 14.- Morohashi M, Hashimoto K, Goodman TF Jr et al: Ultrastructural studies of vitiligo, Vogt-Koyanagi Syndrome, and incontinentia pigmenti achromians Arch Dermatol 113:755-766, 1977.
- 15.- Zelickson AS, Mottaz JH, Epidermal dendritic cells. A quantitative study, Arch Dermatol 98:652, 1958.
- 16.- Riley PA. A Study of the distribution of epidermal cells in pigmented and unpigmented skin. J Invest Dermatol 48:28-38, 1967.
- 17.- Brown J Winkelmann RK, Wolff K. Langerhans cells in vitiligo. A qualitative study. J Invest Dermatol 49:386-390, 1967.
- 18.- Carter DM, Jegasothy BV. Alopecia areata and down syndrome. Arch Dermatol 112:1397-1399, 1976.
- 19.- Badar PI, Biegel A, Epinette WW, et al: Vitiligo and Dysgammaglobulinemia. A case report and family study. Clin Genet 7:62-76, 1975.
- 20.- Langhof H, Feuerstein M, Schabinski G. Melaninantikörperbildung bei vitiligo Hautarzt 16:209-212, 1965.
- 21.- Woolfson H, Finn OA, Mackie RM, et al: Serum anti-tumor antibodies and auto-antibodies in vitiligo. Br J Dermatol 92:395-400, 1971.
- 22.- Hertz KC, Gazze LA, Kirkpatrick CH, et al: Autoimmune vitiligo detection of antibodies in melanin-producing cells. N Engl J Med. 297:634-637, 1977.
- 23.- Retornaz G, Betuel H, Ortonne JO, et al: HL-A antigens and vitiligo. Br J Dermatol 95:173-175, 1979.
- 24.- Betterle C, Del Prete GF, Perserico A, et al: Autoantibodies in vitiligo. Arch Dermatol 112:1328, 1976.

- 25.- Sidney Barsky MD, DP Knapp MD; Mark Levine MD; Shelly Schuller-Goldman MD. Vitiligo in a blank population. Arch Dermatol, 115: 225, 1979.
- 26.- Koga M. Vitiligo. A new clasification and therapy. Br J Dermatol 97:255-261, 1977.
- 27.- Scholtz JR, Williamson C:Vitiligo in (apparent) dermatol distribution. Arch Dermatol 64:366-369, 1951.
- 28.- Ochi Y, De Groot LJ: Vitiligo in Graves'disease. Ann Intern Med 71:935-940, 1969.
- 29.- Canco-Turner ML, Lerner AB.Physiologic changes in vitiligo. Arch Dermatol. 91:390;396, 1965.
- 30.- Kahn G;Despigmentation caused by phenolic detergent germicides. Arch Dermatol 102:177;187, 1970.
- 31.- Lerner AB,Nordlund MD:Vitiligo. What is it? Is it important? JAMA.239:1183-1187, 1978.
- 32.- Monroe MD;Vitiligo associated with regional enteritis. Arch Dermatol 112:833-834, 1976.
- 33.- Thomas T. Provost and Thomas B. Thomasi Jr.Evidence for comple-ment activation via the alternate pathway in skin diseases I.J Invest Dermatol 52:1779-1787, 1973.
- 34.- Sweet RD.Vitiligo as a K bner phenomenon. BJ. Dermatol. 99:223-224, 1978.
- 35.- Thomas R, Watters MD, Lerner AB,Nordluand MDVitiligo, Chronic Thrombocytopenia, and Autoimmune Hemolytic Anemia. Arch Dermatol. 114:1366-1367, 1978.
- 36.- Paslin MD;More on vitiligo and Matingnant Melanoma. Arch Dermatol 116, 1980.
- 37.- Cooke HB,Claire Bennett MD, Staughton. Melanoma specific protein:Ocurrence in the orine of patient with halo naevus and vitil

- ligo. Lancet Sep 6, 1980.
- 38.- Nordlund MD, Albert MD, Forget MD, Lerner AB. Halo Nevi and the vogt-Koyanagi haranda syndrome. Arch Dermatol 116:690-692, 1980.
- 39.- Goudie Hearther MD, Ferguson-Smith. Unstable mutations in vitiligo, organspecific autoimmune diseases and multiple endocrine adenomal peptic ulcer syndrome. Lancet 285-287, Aug 9, 1980.
- 40.- Jette Howitz, Michael Schwartz. Vitiligo achloridria and pernicious anemia. Lancet. 1331-1334, Jun 26, 1971.
- 41.- Grunnet MD, Jette Howitz MD, Reymann, M. Schwartz MD. Vitiligo and pernicious anemia. Arch Dermatol 101:82-85, 1970.
- 42.- Toby Mathias MD, Howard I. et al. Perioral Leukoderma simulating vitiligo form use of a toothpaste containing cinnamic aldehyde. Arch Dermatol 116:1172-1173, 1980.
- 43.- Lerner AB, Nordlund MD, Albert MD. Pigment cells of the eyes in people with vitiligo. New J Med Jan 27, 1977.
- 44.- Howitz MD, Brodthagen MD, Michael Schwartz MD, Thomsen MD. Prevalence of vitiligo. Arch Dermatol 113:47-52, 1977.
- 45.- Burch MD, Rowel MD, Jackson MD. Unstable mutations in vitiligo. Lancet sep 6, 1980.


FRANCISCO ZARCO S. DE C.V.
COL. ALAMITOS
SAN LUIS POTOSI, S. L. P.
TEL. 4-17-93

T
R
R
C