RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/06/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Helena Zenedin Marchioro

Prevalência de doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI) e de anticorpos anti-Hsp70 em vitiligo não segmentar

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:Prof. Dr.HélioAmanteMiot
Coorientador: Prof. Dr. Caio César Silva de Castro

Botucatu

2022

Helena Zenedin Marchioro

Prevalência de doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI) e de anticorpos anti-Hsp70 em vitiligo não segmentar

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Amante Miot

Coorientador: Prof. Dr. Caio César Silva de Castro

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Marchioro, Helena Zenedin.
Prevalência de doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI) e de anticorpos anti-Hsp70 em vitiligo não segmentar / Helena Zenedin Marchioro. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Hélio Amante Miot
Coorientador: Caio Cesar Silva de Castro
Capes: 40101029

1. Vitiligo. 2. Perda auditiva neurossensorial. 3. Autoimunidade. 4. Labirintos (Ouvidos).

Palavras-chave: Autoimunidade; Hsp70; Ouvido interno; Perda auditiva neurossensorial; Vitiligo.

Trabalho realizado no ambulatório de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Curitiba, PR.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA 6

AGRADECIMENTOS 7

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS 8

RESUMO 9

REVISÃO DA LITERATURA 10

OBJETIVOS 24

ARTIGO CIENTÍFICO. 25

CONCLUSÕES 40

PERSPECTIVAS 41

APÊNDICES 42

APÊNDICE 1. Ensaio ELISA Anticorpo Anti-Hsp70: curva-padrão 42

APÊNDICE 2. Ensaio ELISA anticorpo anti-Hsp70 – controle 43

APÊNDICE 3. Lista de drogas potencialmente ototóxicas 44

ANEXOS 45

ANEXO 1. Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos 45

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 48

ANEXO 3. Formulário de Dados Clínicos e Demográficos 50

ANEXO 4. *Vitiligo Extent Score (VES)* 51

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO. 52

Artigo submetido ao Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 52

Artigo submetido aos Anais Brasileiros de Dermatologia 56

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Isabella e Lucca, por seu amor incondicional, que me dá forças para seguir adiante.

Ao meu marido Fabiano, meu grande amor, quem sempre me apoiou em minhas decisões e me encorajou a enfrentar essa jornada.

Aos meus pais Maurício e Valéria, por quem tenho imensa admiração, e que me deram a base para ser a mulher, mãe e profissional que me tornei.

Às minhas irmãs Cárile e Dáfni por serem fonte de inspiração para mim a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial

Ao Dr Caio César Silva de Castro, por acreditar em mim após anos de formada, por me acolher novamente na Santa Casa e me dar a oportunidade de realizar esse trabalho. Pelo apoio durante todo esse projeto.

Ao Dr Hélio Amante Miot por me dar essa incrível oportunidade de ser meu orientador, por ser um exemplo de pesquisador e profissional. Por ser criterioso e muito atento a cada detalhe.

Agracedimento

Aos pacientes, por contribuírem com a pesquisa, por acreditarem nos frutos que viriam dela e de uma forma altruísta cederem seu tempo e amostras de seu sangue.

Às fonoaudiólogas Aline S. T. Chiesorin e Elaine W. Bindi pelo empenho em realizar todas as audiometrias dessa pesquisa.

Ao dr Ney Alencar por me permitir realizar essa pesquisa dentro do Serviço de dermatologia da Santa Casa de Curitiba.

À dra Larissa Alvarenga, por me acolher no seu laboratório da UFPR e me poupar viagens a Botucatu.

À dra Isabella G. Jiacomini, por me receber tão bem no laboratório da UFPR e me auxiliar em todos os meus processos na bancada, e à toda a equipe do laboratório que me auxiliou de formas diversas.

Aos residentes do Hospital Santa Casa de Curitiba, por me ajudarem a captar pacientes, a coletar os dados epidemiológicos. Sem essa ajuda, todo o trabalho ficaria mais difícil.

À Juliane Pereira, secretária do serviço de dermatologia da Santa Casa, por toda a ajuda nos momentos em que precisei.

Às funcionárias do ambulatório de dermatologia da Santa Casa por toda a ajuda, especialmente à Eliane.

À funcionária Vânia Soler, por me ajudar inúmeras vezes, por tornar menor a distância entre mim e as burocracias inerentes à pós graduação.

À banca da qualificação, dra Luciana Abbade e dr Roberto Gomes Tarlé, pelo tempo despendido na leitura e participação da banca, além das oportunas considerações para o texto.

À banca da defesa, dra Anna Carolina Miola e dra Daniela Antelo, por aceitarem doar seu precioso tempo e conhecimento à minha formação.

Ao Fundo de apoio à Dermatologia (FUNADERM), pelo fomento à pesquisa e por entender que este estudo contribuiria para a dermatologia.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- CEP – Comitê de Ética e Pesquisa;
- DAMP – *Damage Associated Molecular Pattern* / Padrão Molecular Associado a Danos;
- dB – Decibel;
- DC – *Dendritic Cells* / Células Dendríticas;
- DIMOI – Doença Imunomediada do Ouvido Interno;
- dp – Desvio Padrão;
- FAN – Fator Antinuclear;
- Glu – *Glutatione* / Glutationa;
- GWAS – *Genome Wide Association Stud* / Estudo de Associação Genômica Ampla;
- HLA – *Human Leucocyte Antigen* / Antígeno Leucocitário Humano;
- Hsp70 – *Heat Shock Protein 70* / Proteína de Choque Térmico 70;
- Hz – Hertz;
- IC – Intervalo de Confiança;
- IFN – *Interferon*;
- IL – Interleucina / *Interleukin;*
- IMIED – *Immuno-mediated Inner Ear Disease* / Doença Imunomediada do Ouvido Interno;
- JAK-STAT – *Janus kinase/signal transducers and transcription activators*
- IMC – Índice de Massa Corporea;
- MHC – *Major Histocompatibility Complex* / Complexo de Histocompatibilidade Maior;
- Nb-UVB – *Narrow Band Ultraviolet B* / UVB de Banda Estreita;
- NK – *Natural Killer;*
- NLRP-1 – *Nuclear Localization Leucine-Rich-Repeat Protein1*;
- NSV – *Non-segmental Vitiligo* / Vitiligo Não Segmentar;
- OS – *Oxidative Stress* / Estresse Oxidativo;
- PANS – Perda Auditiva Neurossensorial;
- ROS – *Reactive Oxygen Species* / Espécies Reativas de Oxigênio;
- SOD – *Superoxide Dismutase* / Superóxido Dismutase;
- SNHL – *Sensorineural Hearing Loss* / Perda Auditiva Neurosensorial;
- TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- TNF – *Tumor Necrosis Factor* / Fator de Necrose Tumoral;
- Tregs – Células T reguladoras;
- TRM – Tissue Resident Memory Cells / *Células Teciduais Residentes de Memória;*
- UPR – *Unfolded Protein Response* / Resposta à Proteína Mal Enovelada;
- UVR – *Ultraviolet Radiation* / Radiação Ultravioleta;
- VES – *Vitiligo Extent Score;*
- VNS – Vitiligo não Segmentar;

RESUMO

Fundamentos: A perda auditiva neurossensorial (PANS) é comum em indivíduos com vitiligo não segmentar (VNS). Até o momento, a patogênese desse processo não foi investigada. A concomitância de doenças autoimunes no VNS justifica explorar a doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI), como a etiologia de PANS em VNS. O anticorpo anti-HSP70 é um marcador sorológico de DIMOI, podendo auxiliar no diagnóstico precoce dessa doença.

Objetivos: Avaliar a prevalência de DIMOI e de anticorpos anti-Hsp70 em indivíduos com VNS.

Métodos: Estudo transversal, envolvendo adultos, de ambos os sexos, com VNS, submetidos a audiometria e dosagem sérica de anticorpos anti-Hsp70. Não foram incluídos portadores de câncer, imunossuprimidos ou portadores de doenças reumatológicas em atividade.

Resultados: Foram avaliados 112 indivíduos adultos com VNS. PANS bilateral foi encontrada em 28 (25,0%; IC95% 17,9–32,1%) participantes, sendo que 17 (15,2%; IC95% 9,8–20,5%) apresentavam PANS não explicada por outra causa, como diabetes, infecção e drogas ototóxicas. A prevalência do anticorpo anti-Hsp70 foi de 26,8% (IC95% 19,6-33,9%). Foram identificados seis participantes (5,4%; IC95% 2,7–8,0%) com critérios para DIMOI. Pacientes com DIMOI apresentaram idade mediana mais tardia do início do vitiligo (46 vs. 32 anos; p=0,04), menor extensão do vitiligo (VES 0,4 vs. 1,8; p=0,027), e níveis maiores de anti-Hsp70 (221 vs. 85 ng/mL; p<0,01).

Conclusões: DIMOI e anticorpos anti-Hsp70 são prevalentes em adultos com VNS.

Palavras-chave: Autoimunidade; Perda Auditiva Neurossensorial; Vitiligo; Hsp70; Ouvido interno.

REVISÃO DA LITERATURA

Artigo original publicado nos Anais Brasileiros de Dermatologia

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a prevalência de doença imunomediada do ouvido interno e anticorpos anti-HSP70 em adultos com vitiligo não segmentar

Objetivos secundários

Avaliar os resultados de audiometria em adultos com vitiligo não segmentar.

Avaliar a correlação clínica de anticorpos anti-HSP70 e de DIMOI com vitiligo não segmentar.

Resumo

Fundamentos: A perda auditiva neurossensorial (PANS) é comum em indivíduos com vitiligo não segmentar (VNS). Até o momento, a patogênese desse processo não foi investigada. A concomitância de doenças autoimunes no VNS justifica explorar a doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI),como a etiologia de PANS em VNS. O anticorpo anti-HSP70 é um marcador sorológico de DIMOI, podendoauxiliar no diagnóstico precoce dessa doença.

Objetivo: Avaliar a prevalência de DIMOI e de anticorpos anti-Hsp70 em indivíduos com VNS.

Métodos: Estudo transversal, envolvendo adultos, de ambos os sexos, com VNS, submetidos a audiometria e dosagem sérica de anticorpos anti-Hsp70. Não foram incluídos portadores de câncer, imunossuprimidos ou portadores de doenças reumatológicas em atividade.

Resultados: Foram avaliados 112 indivíduos adultos com VNS. PANS bilateral foi encontrada em 28 (25,0%; IC95% 17,9–32,1%) participantes, sendo que 17 (15,2%; IC95% 9,8–20,5%) apresentavam PANS não explicada por outra causa, como diabetes, infecção e drogas ototóxicas. A prevalência do anticorpo anti-Hsp70 foi de 26,8% (IC95% 19,6-33,9%). Foram identificados seis participantes (5,4%; IC95% 2,7–8,0%) com critérios para DIMOI. Pacientes com DIMOI apresentaram idade mediana mais tardia do início do vitiligo (46 vs. 32 anos; p=0,04), menor extensão do vitiligo (VES 0,4 vs. 1,8; p=0,027), e níveis maiores de anti-Hsp70 (221 vs. 85 ng/mL; p<0,01).

Limitações do estudo: Estudo incluiu apenas adultos, não avaliou longitudinalmente os pacientes com PANS, excluídos portadores de doenças reumatológicas ativas, o que pode subestimar a prevalência de DIMOI.

Conclusões: DIMOI e anticorpos anti-Hsp70 são prevalentes em adultos com VNS.

Palavras-chave: Autoimunidade; Perda Auditiva Neurossensorial; Vitiligo; Hsp70; Ouvido interno.

Abstract

Background: *Sensorineural hearing loss (SNHL) is associated with non-segmental vitiligo (NSV). To date, the pathogenesis of this association has not been explored. The concomitance of autoimmune disease in vitiligo patients justifies the investigation of immune-mediated inner ear disease (IMIED) as a cause of SNHL in NSV. The anti-Hsp70 antibody is a serological marker of IMIED, and it might help on the early diagnosis of this disease.*

Objective: *To evaluate the prevalence of IMIED and anti-Hsp70 antibody in NSV patients.*

Methods: *Cross-sectional study involving NSV adult patients of both genders, who were evaluated through audiometry and serological dosage of anti-Hsp70 antibody. There were not included individuals with diagnosis of cancer, immunosuppressed or those with autoimmune rheumatological disease.*

Results: *One hundred and twelve individuals were evaluated. Bilateral SNHL was found in 28 (25.0%; 95%CI 17.9–32.1%) patients. Among those, 17 (15.2%; 95%CI 9.8–20.5%) had SNHL that could not be explained by other causes, as diabetes, infection, noise exposition or ototoxic drugs. The prevalence of anti-Hsp70 antibody was 26.8% (95%CI 9.8–20.5%). Six patients (5.4% CI95% 2.7–8.0%) had diagnostic criteria for IMIED. Patients with IMIED had latter median age of onset of vitiligo (46 vs. 32 years old; p=0.04), lesser disease extent (VES 0.4 vs. 1.8; p=0.03), and higher levels of anti-Hsp70 antibodies (221 vs. 85 ng/ml; p <0.01).*

Limitations*: Lack of follow-up and audiometric recovery after corticotherapy. Exclusion of individuals with autoimmune rheumatologic diseases, which could underestimate the prevalence of IMIED in this sample.*

Conclusion: *IMIED and anti-Hsp70 antibodies are prevalent in NSV adult patients*

Keywords: *vitiligo, Hsp70, sensorineural hearing loss, autoimmunity, inner ear*

Melanoma Res. 2018;31(3):448-450. doi:10.1111/pcmr.12681

4. Marchioro HZ, Silva de Castro CC, Fava V, et al.. Update on vitiligo pathogenesis. *An Bras Dermatol*. 2022;97(3).
5. Seneschal J, Boniface K, D'Arino A, et al. An update on Vitiligo pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34(2):236-243. doi:10.1111/PCMR.12949
6. Mosenson JA, Zloza A, Klarquist J, et al. Hsp70 is a critical component of the immune response leading to vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(1):88. doi:10.1111/J.1755-148X.2011.00916.X
7. Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2005;23(2):105-161. doi:10.1080/10590500500234970
8. Ma SH, Ang MD, Chang YT, Dai YX. Association between vitiligo and hearing loss. *J Am Acad Dermatol*. 2021;85(6):1465-1472. doi:10.1016/j.jaad.2020.12.029
9. Lien KH, Ger TY, Chi CC. Association of vitiligo with high-frequency sensorineural hearing loss: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022;36(3):373-379. doi:10.1111/JDV.17815
10. Guimarães SF. *Epidemiologia Da Perda Auditiva Em Adultos Trabalhadores.* Universidade Federal da Bahia; 2009. Accessed April 9, 2022. https://repositorio.ufba.br/handle/ri/10892
11. Isaacson B. Hearing loss. *Med Clin North Am*. 2010;94(5):973-988. doi:10.1016/J.MCNA.2010.05.003
12. Ciorba A, Corazzi V, Bianchini C, et al. Autoimmune inner ear disease (AIED): A diagnostic challenge. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018;32:2058738418808680. doi:10.1177/2058738418808680
13. García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R, Millán I, et al. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol*. 2003;117(10):775-779. doi:10.1258/002221503770716188
14. Tebo AE, Szankasi P, Hillman TA, et al. Antibody reactivity to heat shock protein 70 and inner ear-specific proteins in patients with idiopathic sensorineural hearing loss. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(3):427-432. doi:10.1111/J.1365-2249.2006.03227.X
15. Tarlé RG, do Nascimento LM, Mira MT, et al. Vitiligo--part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89(3):461-470. doi:10.1590/ABD1806-4841.20142573
16. Liu CW, Huang YC. Vitiligo and autoantibodies: a systematic review and meta-analysis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2018;16(7):845-853. doi:10.1111/DDG.13574
17. van Geel N, Lommerts J, Bekkenk M, et al. Development and Validation of the Vitiligo Extent Score (VES): an International Collaborative Initiative. *J Invest Dermatol*. 2016;136(5):978-984. doi:10.1016/j.jid.2015.12.040
18. Hegenberg L. *Doença: Um Estudo Filosófico*. Editora FIOCRUZ; 1998. doi:10.7476/9788575412589
19. Silman S, Silverman C. Basic Audiologic Testing. In: *Auditory Diagnosis: Principles and Applications*. ; 1997:44-52.
20. Miot HA. Assessing normality of data in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras*. 2017;16(2):88-91. doi:10.1590/1677-5449.041117

21. Miot HA. Correlation analysis in clinical and experimental studies. *J Vasc Bras*. 2018;17(4):275-279.Miola AC, Miot HA. P-value and effect-size in clinical and experimental studies. *J Vasc Bras*. 2021;20. doi:10.1590/1677-5449.210038
22. Miot HA. Sample size in clinical and experimental. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2011;10(4):275-278. doi:10.1590/s1677-54492011000400001
23. Hootman JM, Helmick CG, Barbour KE, et al. Updated Projected Prevalence of Self- Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015- 2040. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(7):1582-1587. doi:10.1002/ART.39692
24. Sharma L, Bhawan R, Jain RK. Hypoacusis in vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2004;70(3):162-164. Accessed May 23, 2022. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17642597/
25. Rahimi H, Mozafari N, Bastaninejad S, et al. Hearing status in patients with vitiligo. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2019;12:445-450. doi:10.2147/CCID.S201012
26. Gross M, Eliashar R, Ben-Yaakov A, et al. Prevalence and clinical significance of anticardiolipin, anti-beta2-glycoprotein-1, and anti-heat shock protein-70 autoantibodies in sudden sensorineural hearing loss. *Audiol Neurootol*. 2008;13(4):231-238. doi:10.1159/000115432
27. Bonaguri C, Orsoni J, Russo A, et al. Cogan's syndrome: anti-Hsp70 antibodies are a serological marker in the typical form. *Isr Med Assoc J*. 2014;16(5):285-288.
28. van Beelen ESA, van der Valk WH, de Groot JCMJ, et al. Migration and fate of vestibular melanocytes during the development of the human inner ear. *Dev Neurobiol*. 2020;80(11-12):411-432. doi:10.1002/DNEU.22786
29. Conlee JW, Bennett ML, Creel DJ. Differential effects of gentamicin on the distribution of cochlear function in albino and pigmented guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 1995;115(3):367-374. doi:10.3109/00016489509139331
30. Lavezzo MM, Sakata VM, Morita C, et al. Vogt-Koyanagi-Harada disease: review of a rare autoimmune disease targeting antigens of melanocytes. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11(1). doi:10.1186/S13023-016-0412-4
31. Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, et al. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat*. 2010;31(4):391-406. doi:10.1002/HUMU.21211
32. Ralli M, D'Aguanno V, di Stadio A, et al. Audiovestibular Symptoms in Systemic Autoimmune Diseases. *J Immunol Res*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/5798103
33. Das S, Bakshi SS, Seepana R. Demystifying autoimmune inner ear disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019;276(12):3267-3274. doi:10.1007/S00405-019-05681-5
34. Breslin NK, Varadarajan V v., Sobel ES, et al. Autoimmune inner ear disease: A systematic review of management. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2020;5(6):1217. doi:10.1002/LIO2.508

CONCLUSÕES

A prevalência de DIMOI em adultos com VNS se mostrou expressivamente elevada. Além disso, a prevalência de anticorpos anti-Hsp70 nessa população também se mostrou aumentada, quando comparada com a expectativa para a população geral. A audiometria é um exame não invasivo que pode identificar PANS em pacientes com VNS, permitindo a identificação e tratamento da DIMOI, precocemente.