



**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. Hélio Amante Miot
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 neurosensorial.
3. Autoimunidade. 4. Labirintos (Ouvidos).

Palavras-chave: Autoimunidade; Hsp70; Ouvido interno; Perda auditiva neurosensorial; 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. <i>Vitiligo Extent Score (VES)</i>	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. Giacomini, 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 – *Glutathione* / Glutathione;
- 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 Neurosensorial;
- 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



Anais Brasileiros de Dermatologia

www.anaisdedermatologia.org.br



REVIEW

Update on the pathogenesis of vitiligo[☆]

Helena Zenedin Marchioro ^a, Caio César Silva de Castro ^b,
Vinicius Medeiros Fava ^c, Paula Hitomi Sakiyama ^d, Gerson Dellatorre ^a,
Hélio Amante Miot ^{e,*}

^a Medical Residency in Dermatology, Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, Curitiba, PR, Brazil

^b Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

^d Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brazil

^e Department of Dermatology, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

Received 16 August 2021; accepted 21 September 2021

KEYWORDS

Autoimmunity;
Oxidative stress;
Pigmentation;
Vitiligo

Abstract Vitiligo is a complex disease whose pathogenesis results from the interaction of genetic components, metabolic factors linked to cellular oxidative stress, melanocyte adhesion to the epithelium, and immunity (innate and adaptive), which culminate in aggression against melanocytes. In vitiligo, melanocytes are more sensitive to oxidative damage, leading to the increased expression of proinflammatory proteins such as HSP70. The lower expression of epithelial adhesion molecules, such as DDR1 and E-cadherin, facilitates damage to melanocytes and exposure of antigens that favor autoimmunity. Activation of the type 1-IFN pathway perpetuates the direct action of CD8⁺ cells against melanocytes, facilitated by regulatory T-cell dysfunction. The identification of several genes involved in these processes sets the stage for disease development and maintenance. However, the relationship of vitiligo with environmental factors, psychological stress, comorbidities, and the elements that define individual susceptibility to the disease are a challenge to the integration of theories related to its pathogenesis.

© 2022 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Vitiligo is a chronic, acquired dyschromia that promotes autoimmune aggression against melanocytes, resulting in

hypochromic or achromic macules and patches on the skin and mucous membranes, with possible involvement of hair follicles, in different extensions of the skin, which may accompany systemic manifestations (e.g., sensorineural deafness, uveitis, thyroiditis). Its pathogenesis is multifactorial; however, the exact mechanisms that integrate the individual genetic susceptibility, melanocyte auto aggression, and failure of immune tolerance mechanisms are still not fully elucidated.

[☆] Study conducted at the Department of Dermatology, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail: helio.a.miot@unesp.br (H.A. Miot).

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.09.008>

0365-0596/© 2022 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The prevalence of vitiligo is quite variable around the world, being more frequent in Africa (0.4%), Europe (0.4%), and Oceania (1.2%), than in North America (0.2%) and Asia (0.1%).¹ In Brazil, its prevalence varies between 0.46%–0.68% of the population, with no discrepancy between the sexes or racial groups. The mean age of disease onset ranges from 20 to 30 years of age, although it can affect children and the elderly. Vitiligo still accounts for 1.4% to 1.9% of dermatological consultations and up to 3.5% of dermatological consultations in children.^{2,3}

Although it does not show specific skin symptoms or imply a serious health risk, vitiligo patients are impacted in their quality of life since the disease is associated with a strong stigma that compromises social and professional relationships, self-esteem, and dress codes; with women, adolescents, and patients with psychiatric disorders being the most affected groups.⁴

There is currently no definitive cure for vitiligo; however, several treatments have shown favorable results, achieving some degree of repigmentation in over 80% of cases.⁵ The recent advance in the understanding of its pathogenesis has promoted new therapeutic alternatives, which allude to a more hopeful future for patients.

Vitiligo genetics

Vitiligo is a complex disease in which the risk attributed to the genetic component is estimated at 75% to 83%, whereas environmental factors would comprehend the remaining 20%. Studies of familial grouping, studies in twins, and segregation analyses characterize it as a multifactorial disease with a polygenic inheritance pattern. Because of this, the individual contribution of each genetic variant to susceptibility is relatively low.^{6,7}

Vitiligo susceptibility mapping by linkage analysis

The mapping of genetic risk factors for vitiligo was performed by linkage analysis followed by positional cloning. Linkage analysis assesses the nonrandom segregation of chromosomal regions among affected individuals in families with vitiligo. Seven loci have been linked to vitiligo susceptibility, of which four were observed in European populations and three in Chinese populations. One locus on chromosome 17p13 was the first genomic region linked to vitiligo associated with autoimmune diseases.⁸ And the positional cloning of the 17p13 region identified the *NLRP1* gene as the likely source of the vitiligo linkage signal.^{9,10}

Chromosome 22q12 has been associated with the pathogenesis of vitiligo,^{8,11} with the variants that regulate *XBP1* gene expression being the risk factor indicated in the 22q12 region.¹² *XBP1* is a transcription factor that regulates the expression of the HLA class II gene, being involved in cellular response to stress and often associated with autoimmune diseases. In Asian and South American individuals, a link between the MHC region on chromosome 6p21 and vitiligo has been observed.^{6,11}

HLA class I and II-related genes have been implicated in the pathogenesis of vitiligo.^{13,14} Fine mapping of HLA by imputation identified amino acid alterations at residues 135 and 45–46 for HLA-DQB1 and HLA-B, respectively, as strong

risk factors for vitiligo in the Chinese population.¹⁵ Moreover, a promoter variant that increases HLA-A*02:01 expression has been associated with common vitiligo.¹⁶

Three loci, at 1p31.3 – p32.2, 7q21.11, and 8p12, have been linked to vitiligo susceptibility in Europeans and one in Asian populations at 4q13-q21.^{17–19} Of these, *FOXD3* has been suggested as the causal gene candidate for 1p31.3 – p32.2 and *PDGFRA* for 4q13-q21, while no candidate gene has been suggested for the two remaining loci.

In addition to these, HLA-A*33, HLA-Aw*31, HLA-DR4, HLA-DR7, and HLA-DQB1*0303, among others, have been identified as risk factors for vitiligo in different samples.^{20,21} On the other hand, there are studies that correlate HLA-A*09 and HLA-Aw*19 with a lower risk for the disease.²¹

In Brazil, a study with patients from the southeast region demonstrated an association of HLA-A*02 and HLA-DRB1*07 with susceptibility to vitiligo.²⁰ HLA-A*02 is also associated with risk in populations from China, India, Slovakia, and Northern Germany. Similarly, HLA-DRB1*07 has been identified in samples from China, India, Slovakia, Italy, Morocco, Turkey, and Oman.²⁰

Additionally, in Brazil, HLA-DQB1*06 has been correlated with susceptibility to vitiligo (common, acrofacial and mixed), while HLA-A*32 has been correlated with the localized form (focal and segmental). However, these findings differ from other descriptions in the literature, suggesting that HLA-DQB1*06 and HLA-A*32 are specifically associated with the Brazilian population.²⁰

Genome-wide association study and vitiligo prediction

GWAS (Genome-Wide Association Study) tests a dense set of variants located throughout the human genome for association with a phenotype of interest using both case controls and families. To date, five GWAS have been performed for vitiligo in European and Asian populations.^{22–26} Together, they have identified more than 50 loci associated with risk of vitiligo. Most of the loci identified by GWAS were detected in Europeans, suggesting a specific ethnicity effect or differences in study design or power. However, seven of the non-MHC loci were associated with vitiligo in subjects of different ethnicities.

The observation of risk effects in independent populations strengthens the global contribution of genes in the pathophysiology of vitiligo. One of these seven multiethnic vitiligo risk factors includes the *PTPN22* gene, which encodes a protein tyrosine phosphatase involved in T-cell signaling. Interestingly, *PTPN22* variants have been associated with several diseases related to the immune system, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Crohn's disease, which characterizes it as a pleiotropic gene for autoimmune diseases.^{27,28}

The *IKZF4* gene, associated with vitiligo in European and Chinese individuals, exerts a FOXP3-mediated gene silencing on T regulatory cells (Tregs).²⁹ The *FOXP3* gene located on the X chromosome was also a risk factor for vitiligo in several ethnicities.

Combined, these associations highlight the key players in the contribution of T-cells to the pathogenesis of vitiligo. Other candidate loci for vitiligo in several ethnicities include *FASLG*, a member of the TNF superfamily, and *GZMB*, a protease, both of which point to a role of dysregulated apop-

Table 1 Main genes and histocompatibility antigens (HLA) involved in the pathogenesis of vitiligo.

Gene	Expression
NLRP1	+
XBP1	+
FOXD3	+
PDGFRA	+
PTPN22	+
IKZF4	+
FOXP3	+
DDR1	-
HLA	Risk
HLA-A*02	↑
HLA-Aw*31	↑
HLA-A*32	↑
HLA-A*33	↑
HLA-A*09	↓
HLA-Aw*19	↓
HLA-DQB1*06	↑
HLA-DQB1*0303	↑
HLA-DR4	↑
HLA-DRB1*07	↑
HLA-DR7	↑

tosis in vitiligo. Another significant non-HLA association with vitiligo found in Europeans was observed for the *TYR* gene, which regulates melanin biosynthesis in melanocytes.²⁶

The translational aspect of the GWAS findings goes beyond the description of the mechanisms associated with the disease pathogenesis. The cumulative frequency of vitiligo risk alleles can be used to calculate the probability, using a polygenic risk score, that an individual will become a case. Using autosomal risk variants of vitiligo described by GWAS, the predictive power of the polygenic risk score was found to be 71%, which is among the highest values found for complex diseases.³⁰

Candidate gene approaches are conceptually based on a mechanistic hypothesis. Autoimmunity, melanocyte adhesion, and metabolic dysfunction have been suggested as contributing to the etiology of vitiligo, and several genes based on the above mechanisms have been tested.³¹ Noteworthy examples include the *DDR1* gene, which encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor that is the main adhesion protein of melanocytes to the basement membrane and has been shown to be downregulated in vitiligo in comparison to unaffected skin.^{32,33} *DDR1* forms a complex with E-cadherin (encoded by *CDH1*), which is important for the maintenance of the epithelial structure. Variants close to the *CDH1* gene have been associated with vitiligo in Brazilian individuals, linking defects in melanocyte adhesion to the pathogenesis of vitiligo.³⁴ Melanocyte damage due to excessive oxidative stress is another well-established candidate mechanism for vitiligo. The accumulation of reactive oxygen species in the epidermis can inhibit the *BCHE* enzymatic activity.³⁵ Variants that control the enzymatic activity of the *BCHE* gene have been associated with vitiligo in independent samples of the Brazilian population.³⁶

The main genetic changes linked to vitiligo are summarized in Table 1.



Figure 1 Segmental vitiligo on the flank of a dark-skinned patient. Achromic macula, with zosteriform distribution; the periphery of the lesion shows a leukomelanoderma band, with several follicular repigmentation points – Source: authors' file.

Morphofunctional changes

In addition to the significant reduction in melanin and melanocytes, the skin with vitiligo shows morphological changes both in the epithelium and in the upper dermis, which supports the hypothesis that other elements contribute to disease development, in addition to melanocyte susceptibility to oxidative and immunological damage.

Histopathologically, less pigmentation in the basal layer is observed in up to 78% of the epidermis with vitiligo, and some inflammatory infiltrate is identified in up to 48% of cases. In vitiligo cases with active disease, histopathology may show a lichenoid interface dermatitis pattern, demonstrating the focus of self-aggression located in the basal layer.³⁷ T-lymphocytes (CD3+), especially the cytotoxic phenotypes (CD8+), are the predominant cells (65.4%) in the infiltrate, which is more evident in perilesional skin with perivascular and periannexal distribution. For this reason, perilesional skin is considered the area with the highest inflammatory activity in vitiligo (Figs. 1 and 2).³⁸

Screening of melanin pigmentation using Fontana-Masson staining identified residual melanin in 16% of vitiligo cases, and in 12% of cases, melanocytes were identified in the lesions, demonstrating that total destruction of melanocytes may not occur in the affected area.³⁸

On electron microscopy, abnormal melanogenesis was identified in active vitiligo; melanocytes from the control skin and perilesional area of stable vitiligo lesions showed long, thin dendrites with a moderate number of melanosomes, in contrast to the melanocyte dendrites from the perilesional area of active vitiligo: retractable with few melanosomes.³⁹ Langerhans cells are increased in the epidermis, the basement membrane is thickened, and degenerative alterations (e.g., cytoplasmic vacuolization) in basal melanocytes and keratinocytes are evidenced during disease activity.

The role of the remaining melanocytes in the basal layer in the repigmentation process of vitiligo is still unclear, espe-

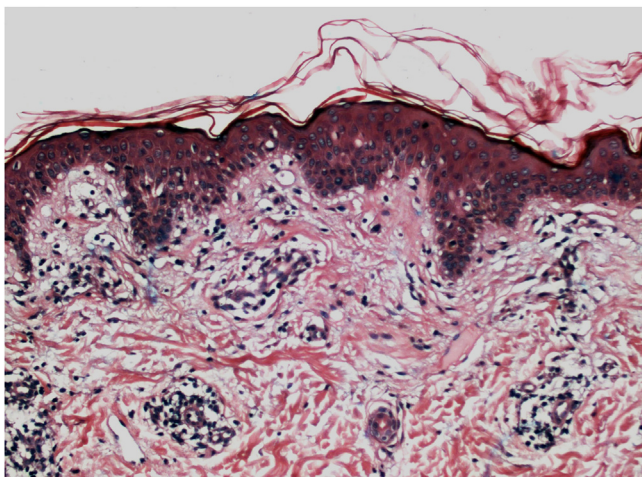


Figure 2 Active vitiligo. Histopathology: perivascular lymphocytic infiltrate, with epidermal aggression and basal layer vacuolar degeneration foci (Hematoxylin & eosin, $\times 40$). Picture is a courtesy of Dr. Lismary Mosque.

cially because melanogenesis is compromised in the lesions. However, the maintenance of hair follicle pigmentation in an affected area indicates good prognosis since the migration of melanocytes from the outer follicular sheath can be evidenced by the identification of perifollicular repigmentation after phototherapy (Fig. 1).

The main source of repigmentation in vitiligo is the melanoblasts of the hair outer root sheath, when not attacked by CD8⁺ T-cells. After stimulation with phototherapy, these melanoblasts migrate, differentiate into melanocytes, and proliferate into the epidermis, probably through the upregulation of the stem cell-associated gene, *GLI1*.⁴⁰

The stratum corneum and viable epidermis of vitiligo lesions are increased in thickness compared to non-lesional skin.⁴¹ The lesional epithelium also has larger corneocytes, likely to compensate for the decreased expression of cornification components and, therefore, they result in a thicker stratum corneum in vitiligo lesions. A possible explanation for this fact may be the reduced expression of D3 gangliosides, which favors keratinocyte apoptosis in patients with vitiligo. This potentially induces a compensatory mechanism of epidermal thickening to protect the affected skin against ultraviolet radiation (UVR).

However, previous optical and electron microscopy studies have demonstrated degenerative changes in keratinocytes in both affected and unaffected skin of patients with vitiligo,⁴² suggesting that the entire epithelium of patients with vitiligo is susceptible to and suffers from the pathogenic pressures of the disease.

In common vitiligo, there is a decrease in the epithelial cones of the dermal-epidermal junction. Similarly, a difference in architecture was identified in patients with segmental and nonsegmental types of vitiligo. In the segmental type, there is a notable increase in epithelial cones; acanthosis is observed in the nonsegmental type when compared with the skin of controls without vitiligo.³⁷

Adhesion defects between cell components of the epidermis have also been implicated in the pathogenesis of vitiligo.

E-cadherin is a protein that assists in anchoring between keratinocytes, and its low expression has been identified in melanocytes in vitiligo.⁴³ It was also demonstrated in the dermis, p53-positive cells in non-lesional areas, and this reactivity was higher in vitiligo lesions than in controls.

The reduction of melanocytes in vitiligo was also related to a defect in cell adhesion but not directly to apoptosis. Furthermore, cytokines such as IFN γ and TNF α induce melanocyte detachment and decrease the distribution of E-cadherin in melanocytes. However, the combination of the two cytokines was able to downregulate the expression of the *CDH1* gene that encodes E-cadherin and also reduced the expression of the genes associated with adhesion deficit, *DDR1* and *CCN3*. Furthermore, MMP-9 is elevated in the skin and plasma of patients with common vitiligo, being produced in keratinocytes by the stimulation of TNF α and IFN γ and associated with E-cadherin cleavage.⁴⁴

The DKK1 protein, which reduces melanogenesis and certain somatic functions of melanocytes, is overexpressed by lesional fibroblasts in vitiligo.⁴⁵ Similarly, there is a greater expression of fibronectin, a key protein in intercellular communication by binding to integrins, in the dermis of patients with vitiligo compared with healthy controls.⁴³ Additionally, elastin is reduced in lesional dermis, but collagen fibers show no difference when compared to unaffected skin.⁴⁶

Oxidative changes

Cutaneous melanocytes, located in the organ with the greatest interface with the external environment and, consequently, the most exposed to ultraviolet radiation and pollutants, are particularly vulnerable to excessive production of reactive oxygen species (ROS). The concentration of these substances is even higher than in other adjacent cells, such as keratinocytes and fibroblasts. This is due, in part, to their specialized function of producing melanin (which generates by-products such as O₂⁻ and H₂O₂) and inflammation due to excessive photo exposure.^{47,48}

In the hair follicle, the outer sheath melanocytes are responsible for intense melanin synthesis. There is evidence that the production of ROS in these melanocytes favors white hairs during the aging process, which is also accompanied by loss of protective antioxidant mechanisms, generating an alteration in the oxidative/antioxidative balance (redox status). In an *in vitro* model of oxidative stress, glutamine (a precursor amino acid of the antioxidant molecule glutathione) was shown to be able to reduce melanocyte apoptosis. In addition to triggering apoptosis, ROS also has the potential to reduce melanogenesis, as demonstrated by *in vitro* tests following exposure of melanocytes to H₂O₂.⁴⁸⁻⁵¹

The theory of vitiligo development due to oxidative stress (OS) suggests that ROS production would be induced by multiple intrinsic factors (such as inflammation and protein synthesis), as well as extrinsic ones, such as exposure to ultraviolet radiation pollutants, and phenolic compounds. In parallel, a failure in the antioxidant mechanism would occur, disrupting cell homeostasis and culminating in cell damage.⁵²

Melanocytes cultured from unaffected areas in patients with vitiligo have a greater susceptibility to oxidative stress than from controls without vitiligo, demonstrating an overall susceptibility of the patient with vitiligo to oxidative damage.⁵³

There is an increase in the superoxide dismutase enzyme (responsible for degrading the O_2^- radical into H_2O_2 and O_2), an increase in lipid peroxidation (secondary to OS), in addition to a reduction in the catalase enzyme (which converts H_2O_2 into H_2O and O_2) in vitiligo. However, when compared to other inflammatory diseases such as psoriasis and lichen planus, such alterations are also reported, suggesting that the OS pathway is not disease-specific. In contrast, when non-lesional skin is assessed, there are more oxidative pathway alterations in the skin of patients with vitiligo than of patients with other inflammatory skin diseases, suggesting that the depigmented areas are a phenotypically altered part of skin subjected to oxi-reducing imbalance.⁵⁴

In addition to having a lower systemic antioxidant capacity (glutathione peroxidase reduction) when compared to individuals without vitiligo,⁵⁵ there are differences in the serum levels of superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) between patients with common and localized vitiligo, also assuming a difference in the systemic antioxidant status according to disease severity.⁵⁶ Polymorphisms of *FOXO3A*, a gene with an important role in OS regulation, are also found in patients with active vitiligo.⁵⁷

Treatment with narrowband UVB, in turn, is able to balance the redox status in patients with vitiligo, as demonstrated by the significant reduction in serum malondialdehyde (MDA) levels and an increase in glutathione peroxidase in patients treated by this phototherapy method.⁵⁸

It is hypothesized that OS inflicts cell damage by inducing apoptosis in melanocytes, as well as other cell death mechanisms, such as ferroptosis and phagoptosis.⁵² Clinical and biochemical studies suggest that the overexpression of the *TRPM2* gene (transient receptor potential cation channel subfamily M member 2) and the CGRP (calcitonin gene-related peptide) peptide are related to OS-sensitive calcium channels in perilesional melanocytes in vitiligo. In these cases, H_2O_2 would induce the demethylation of the promoter region of the *TRPM2* gene and increase its expression in melanocytes, promoting the calcium influx into the cytoplasm, and promoting its apoptosis.⁵⁹

In a study with murine melanocytes, the natural process of autophagy, in which cells degrade their organelles and damaged proteins to maintain their homeostasis, was also shown to be impaired when excessive ROS accumulation occurs.⁶⁰ In vitiligo, melanocytes and fibroblasts are more sensitive to OS-induced autophagy, which reduces their potential to control melanogenesis.⁶¹

OS can also trigger changes in the melanocyte endoplasmic reticulum, culminating in the accumulation of defective proteins, stimulating a cell stress phenomenon called "unfolded protein response" (UPR).⁶² Moreover, energy requirements for protein production (such as melanin) alone generate ROS through mitochondrial metabolism. These two pathways seem to be overactivated in the melanocytes of patients with vitiligo, suggesting that these cells tolerate less the demand for melanin production than those of healthy individuals.⁶³ Even healthy melanocytes undergo

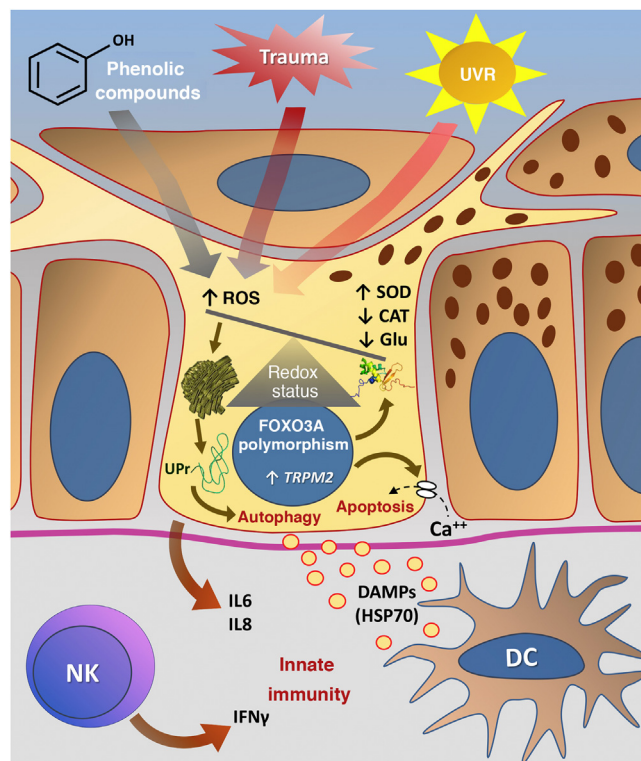


Figure 3 Representation of Oxidative Stress (OS) and activation of innate immunity in vitiligo. The effects of ultraviolet radiation (UVR), phenolic compounds and trauma (Köbner) increase the production of reactive oxygen species (ROS). In parallel, genetic predisposition (such as mutations in the *FOXO3A* gene) lead to the inefficiency of antioxidant mechanisms, observed by an increase in the superoxide dismutase (SOD) enzyme, reduction in catalase (CAT) and glutathione (Glu), causing an imbalance in the redox status. OS also causes an accumulation of defective proteins in the endoplasmic reticulum, resulting in a phenomenon called the response to unfolded proteins (UPr), contributing to the process of autophagy leading to the production of proinflammatory interleukins (IL6 and IL8). The increased expression of *TRPM2* (transient receptor potential cation channel subfamily M member 2), also induced by OS, promotes an influx of calcium into the melanocyte, culminating in its apoptosis. The OS promotes the release of DAMPs (damage-associated molecular patterns), especially HSP70, which initiate the innate response from the activation of dendritic cells (DC) and the participation of NK cells (natural killer) – Source: the authors.

cell stress when exposed to certain phenolic compounds such as hydroquinone monobenzyl ether, inducing the production of IL6 and IL8.^{63,64}

Despite the extensive use of antioxidants by patients with vitiligo who seek therapeutic alternatives, the role of this pathogenic mechanism and the application of this knowledge in clinical practice remain controversial. The lack of a consistent response to systemic antioxidants suggests that OS may not play a central role in disease pathogenesis, which raises the need for studies to identify the real role of the mechanism in this complex disease.⁵⁴

Fig. 3 summarizes the possible pathways of damage to melanocytes due to OS in vitiligo.

In vitiligo, OS also participates in the Köbner phenomenon, although its etiology is probably multifactorial. After epithelial trauma, inflammatory mediators lead to an increase in OS, inducing cell death, a process that is also favored by melanocyte adhesion defects. Additionally, epithelial trauma promotes the release of IFN α , which increases the expression of CXCL10, favoring the migration of circulating lymphocytes.⁶⁵

Immunological changes

Innate immunity

Evidence for the participation of the innate immune system in the pathogenesis of vitiligo is very consistent, with the latter being considered the link between oxidative stress and the adaptive immune response.⁶⁶ First, dendritic cells, macrophages, and NK (natural killer) cells are found in the lesional and perilesional skin of patients with vitiligo, characterizing an activation of the innate immune response.⁶⁷

Activated NK cells (CD56+ / granzyme B+) and IFN γ -producing cells have been identified in the blood and non-lesional skin of patients with vitiligo.⁶⁸ Moreover, there is an increase in proinflammatory cytokines, characteristic of innate immunity, in both serum and skin of patients with vitiligo, such as IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, IL12, IL15, and TNF α .⁶⁹ These elements indicate a global activation of the body innate immunity, transcending the affected areas.

The oxidative stress that occurs in the melanocyte, as mentioned before, is possibly the autoimmunity trigger in vitiligo.⁶³ The communication between the melanocyte and the innate immune system seems to occur through the secretion of exosomes, which contain melanocyte-specific antigens, miRNAs, heat shock proteins, and DAMPs (damage-associated molecular patterns).⁶⁴ These exosomes deliver autoantigens to dendritic cells, which undergo maturation into antigen-presenting cells.⁷⁰

The DAMP with the highest evidence of association with vitiligo to date is HSP70 (heat shock protein 70).⁶⁶ HSP70 is a protein from the intracellular chaperone family whose function is to prevent the incorrect folding of other proteins and their aggregation. Whereas some HSPs facilitate the folding of newly formed proteins, others are particularly induced during physiological stress to manage the extra burden of stress-induced protein misfolding, thus preserving cell viability.⁷¹ Although HSPs are intracellular proteins, it has been observed that, under stress situations, they can be secreted by the cell. In the extracellular environment, the identification of these proteins by cells of the immune system results in signal transduction that leads to the release of proinflammatory cytokines, such as IFN α . *In vitro* studies have demonstrated the expression of HSP70 Lox-1 receptors on the surface of dendritic cells in vitiligo. The same study showed that HSP70 induces the maturation and activation of dendritic cells (CD80+).^{71,72}

The induced HSP70 is present in lesional and perilesional skin in vitiligo. Studies in animal models have demonstrated the relationship between induced HSP70 and the recruitment and activation of inflammatory dendritic cells in vitiligo. Furthermore, in rats, HSP70 has been shown not only to be necessary but sufficient to accelerate skin

depigmentation.⁷³ Finally, a study that introduced a mutant HSP70, in which only one amino acid was altered in its structure, showed that it was able to promote skin repigmentation by binding to dendritic cells and inactivating them and, consequently, inhibiting the subsequent T-cell response. This HSP70 molecule with an amino acid change is considered a potential treatment for vitiligo and is expected to be studied in clinical trials.⁷⁴

NLRP-1 (nuclear localization leucine-rich-repeat protein 1) is another component of innate immunity identified in vitiligo. Variants of the DNA sequence in the NALP1 region are associated with the risk for several epidemiologically associated autoimmune and autoinflammatory diseases, including common vitiligo.⁹ NLRP-1 is a key regulator of the innate immune response. By recognizing the DAMPs, this receptor activates the inflammasome, which, through the caspase-1 pathway, induces the processing of pro-IL1 β into active IL1 β , as well as its secretion into the extracellular environment, where it perpetuates the inflammatory response.⁷⁵ IL1 β plays a key role in the polarization of T cells towards Th17.⁷⁶ The perilesional skin of vitiligo, where the disease is most active, shows an increase in IL1 β , suggesting that this pathway is also involved in vitiligo progression.⁷⁷ Therefore, IL1 β inhibition can also be seen as a potential therapeutic target in vitiligo.

Adaptive immunity

The activation of innate immunity triggered by damage to melanocytes affected by oxidative stress promotes cytokine secretion and antigen presentation, resulting in the adaptive immune system activation, in which autoreactive T-cells amplify damage to melanocytes in vitiligo-affected skin.

In this context, cytotoxic T-lymphocytes (CD8+) are the main cells implicated in disease pathogenesis.⁷⁸ However, although antibodies reactive against melanocytes (e.g., anti-MelanA, anti-MCHR1, anti-tyrosinase, anti-gp100, and anti-tyrosine hydroxylase) have elevated serum titers in patients with vitiligo, they do not correlate with disease activity.⁷⁹ Nevertheless, the literature is controversial, and the exact role of anti-melanocyte antibodies in vitiligo remains unclear.

The type I IFN pathway is a key point for the start of the vitiligo immune response. The IFN-I signature characterizes an early and transient event in its progression and a link between the innate and adaptive immune response.⁶⁵ Studies have shown that IFN α , produced mainly by plasmacytoid dendritic cells (pDCs), stimulates the production of chemokines, such as CXCL9 and CXCL10, by keratinocytes, leading to the recruitment of T-cells expressing their receptor: CXCR3.^{65,72} Furthermore, HSP70 potentially contributes to skin inflammation by activating pDCs and increasing IFN α secretion.⁷²

Cytotoxic CD8+ T-cells are necessary and sufficient for the destruction of melanocytes, acting as an effector arm of autoimmunity.⁷⁸ The lesions are caused by effector CD8+ T-lymphocytes in the initial or active phase of the disease and by recirculating and resident memory CD8+ T (TEM) lymphocytes in the stable phase. The mechanism of aggression is based on the production of inflammatory cytokines such as TNF α and IFN γ , in addition to the release of granzymes and

perforins, which cause direct damage to melanocytes.^{78,80} In the lymphocytic infiltrate of the periphery of the depigmented areas, CD8+ T-lymphocytes predominate, and this finding correlates with disease activity.⁸¹

Melanocyte-specific antigens recognized by CD8+ T-cells, such as MelanA, tyrosinase, gp100, and tyrosinase-related proteins 1 and 2, are detected in greater numbers in the peripheral blood of patients with vitiligo when compared to controls.⁸² The perilesional skin also expresses higher levels of CD8+ T lymphocytes against melanocyte antigens in comparison to normal skin.⁷⁸ These autoreactive cells are able to destroy melanocytes *in vitro*⁸¹ in addition to inducing apoptosis of keratinocytes and melanocytes in a pattern similar to the disease.⁷⁸

IFN γ , and the genes it induces, encode the CXCR3 chemokine receptor and its ligands CXCL9 and CXCL10, which are critical for the activation of CD8+ T cells, and are found to be increased in the skin and blood of patients with vitiligo.^{83,84} CXCL9 promotes the global recruitment of autoreactive T-cells but with no effector action, whereas CXCL10 is required for disease progression and maintenance.⁸⁵ Moreover, the neutralization of CXCL10 in animal models prevents the appearance of new lesions and induces the repigmentation of established areas,⁸⁵ identifying the therapeutic potential of IFN γ /CXCL10/CXCR3 axis inhibition.⁸⁶ Keratinocytes are the main sources of these cytokines, and CXCL9 and CXCL10 measurements are potential biomarkers of disease activity.⁸⁴

The Janus kinase/signal transducers and transcription activators (JAK/STAT) pathway participate in the immunopathogenesis of vitiligo through its interaction with IFN γ . IFN γ /CXCL10 signaling starts with the binding of IFN γ to its heterodimeric receptor, which stimulates the JAK/STAT pathway and leads to STAT1 activation. Subsequently, STAT1 translocation to the nucleus and subsequent binding to the IFN γ -induced gene promoter region such as CXCL10 occur. There are four members of the JAK protein family, including JAK1, JAK2, JAK3, and tyrosine kinase 2 (TYK2). JAK1 and JAK2 are directly involved in IFN γ signaling. In this context, some studies have used several JAK inhibitors as a repigmentation strategy.⁸⁷

Vitiligo recurrence is a common phenomenon, often occurring in the same affected site prior to treatment. This pattern of recurrence suggests the role of autoimmune memory in the maintenance of the condition, characterized by the presence of memory CD8+ T Cells in both the epidermis and dermis, which act as sentinels for the recruitment of T-effector memory cells from the circulation.⁸⁰ TRMs are long-lived lymphocytes that develop after the start of a T-cell-mediated immune response.

Based on the demonstration that TRMs require IL15 for their differentiation, the interruption of the IL15 pathway using an anti-CD122 antibody caused reversal of depigmentation in mice with stable vitiligo. In that trial, short-term treatment with anti-CD122 inhibited IFN- γ production by TRMs, and long-term use depleted these cells from the lesions.⁸⁸ Additional IL15 functions have also been mapped in other studies. One study showed that IL15 causes the expression of NKG2D in memory CD8+ T Cells in skin with vitiligo, triggering the production of IFN γ and TNF α .⁸⁹ Additionally, oxidative stress has been shown to induce IL15 transpresentation in keratinocytes, contributing to the activation of

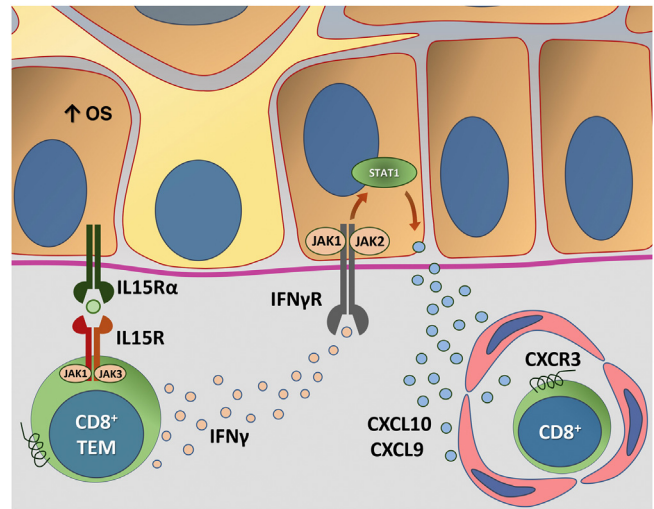


Figure 4 Representation of Interleukin (IL)-15 transpresentation in keratinocytes induced by oxidative stress (OS) and the interaction of interferon gamma (IFN γ) with the Janus kinase/signal transducers and transcription activators (JAK/STAT) pathway. The OS promotes the transpresentation of IL-15 in keratinocytes through the binding of IL-15 to the heterodimeric IL-15 receptor (IL15R) on memory CD8+ T lymphocytes, consisting of CD122 and CD132, and to the IL-15 α receptor (IL15R α) on keratinocytes (CD215). This process potentiates the activation of memory CD8+ T Cells and the production of inflammatory cytokines, such as IFN γ , via JAK/STAT signaling (JAK1-STAT3 and JAK3-STAT5). The IFN γ /STAT1/CXCL10 axis conducts the autoimmune destruction of melanocytes. IFN γ signals through the IFN γ receptor (IFN γ R) to stimulate JAK1/JAK2 and activate STAT1. The activation induces the production of CXCL9 and CXCL10, which signals through the CXCR3 receptor for the recruitment of more autoreactive CD8+ T cells – Source: the authors.

memory CD8+ T Cells through the activation of the JAK/STAT pathway (JAK1-STAT3 and JAK3-STAT5).⁹⁰ Thus, blocking IL15 signaling seems to be promising in the search for new treatments.

Fig. 4 details the IL15 transpresentation in keratinocytes induced by oxidative stress and the interaction of IFN γ with the JAK/STAT pathway.

CD4+ T-regulatory cells (Tregs) act to maintain tolerance to their own tissues by suppressing the activity of T-effector cells. In vitiligo, there is a Treg dysfunction, although it is not known exactly whether due to the inability to migrate to the skin, decreased numbers, or activity suppression.⁹¹ In animal models of vitiligo, there is control of disease progression and repigmentation of lesions with the re-establishment of the Treg population.⁹²

Alterations of the adaptive immune system are demonstrated in both segmental and nonsegmental vitiligo, despite different reactivity patterns. In nonsegmental vitiligo, systemic immune activation occurs, whereas in the segmental type, there is only a localized cytotoxic reaction, probably due to melanocyte mosaicism.⁹³ Tregs are unaffected in the peripheral blood of segmental vitiligo when compared to controls. On the other hand, Tregs are reduced in non-segmental vitiligo and associated with other autoimmune

Table 2 Main autoimmune and auto-inflammatory diseases associated with vitiligo.

Autoimmune or auto-inflammatory disease

Alopecia areata
 Pernicious anemia
 Rheumatoid arthritis
 Atopic dermatitis
 Dermatomyositis
 Type 1 Diabetes Mellitus
 Addison's disease
 Crohn's disease
 Graves' disease
 Systemic scleroderma
 Multiple sclerosis
 Systemic lupus erythematosus
 Psoriasis
 Ulcerative colitis
 Sjogren's Syndrome
 Hashimoto's Thyroiditis

comorbidities, less frequent in segmental vitiligo. Moreover, the antibody response against melanocyte-specific antigens occurs only in nonsegmental vitiligo.

The higher frequency of autoimmune comorbidities in patients with nonsegmental vitiligo and also in their relatives reinforces the idea of vitiligo as a phenotypic representation of a systemic autoimmune imbalance. Comorbidities vary widely with the studied population and depend on sex, age, ethnicity, and vitiligo subtype. Table 2 lists the main autoimmune and autoinflammatory diseases described in vitiligo, with autoimmune thyroidites being the most frequent and well-established ones. Also noteworthy are ocular and auditory abnormalities due to the presence of melanocytes in the uvea and cochlea.^{3,94}

The development of vitiligo and halo nevus in patients with melanoma is a well-described phenomenon, probably due to auto aggression to melanocytes induced by tumor antigens. However, this occurs in 10% to 25% of patients treated with checkpoint inhibitors (e.g., nivolumab, pembrolizumab), a new class of medication for metastatic melanoma. These clinical lesions are indistinguishable from the common vitiligo, and the phenomenon is called leukoderma or vitiligo-like lesions; however, there is some doubt as to whether their origin is due to direct cytotoxicity to melanocytes or the development of autoimmunity (vitiligo) in predisposed patients.⁹⁵

Fig. 5 outlines the main changes in adaptive immunity involved in vitiligo.

The exact mechanism by which topical therapies with corticosteroids and calcineurin inhibitors affect the disease pathogenesis has yet to be fully elucidated, but it is believed that they reduce the lymphocytic infiltrate and $TNF\alpha$ expression. In trauma-induced injuries (Köbner), treatment with topical corticosteroids and tacrolimus reduced the underlying inflammatory infiltrate.⁹⁶

Phototherapy, in addition to stabilizing the redox balance, suppresses the inflammatory response, promoting T-cell apoptosis, decreasing inflammatory cytokines, increasing IL10 (with regulatory T-cell induction), reducing

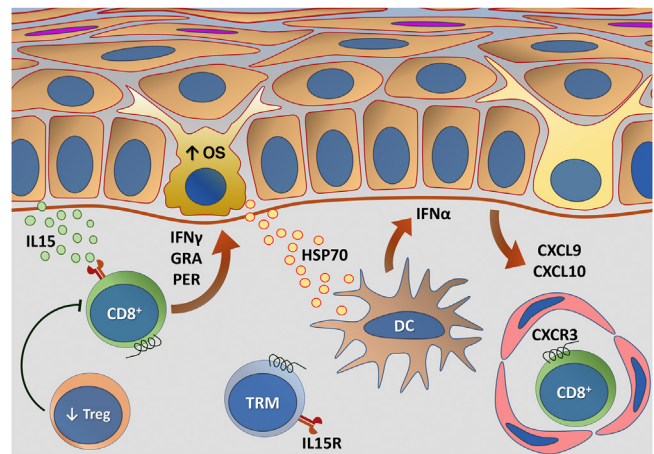


Figure 5 Representation of alterations related to adaptive immunity in vitiligo. Melanocytes affected by oxidative stress (OS) trigger the activation of innate immunity through the secretion of exosomes, which contain damage-associated molecular patterns (DAMPs), especially heat shock protein 70 (HSP70). HSP70 stimulates the secretion of $IFN\alpha$ by dendritic cells in the initial phase of disease progression, which induces the production of chemokines CXCL9 and CXCL10 by keratinocytes and the recruitment of T-cells expressing the CXCR3 receptor. CXCL10 has an effector action, while CXCL9 acts on the global recruitment of autoreactive CD8+ T-cells. Effector CD8+ T-cells are responsible for the destruction of melanocytes through the production of interferon gamma ($IFN\gamma$), release of granzymes and perforins, facilitated by T-regulatory (Treg) cell dysfunction. CD8+ tissue-resident memory T cells (TRM) develop after the onset of the T-cell-mediated immune response and are implicated in disease maintenance, being retained in the tissue due to IL15 transpresentation by keratinocytes – Source: the authors.

JAK1 expression, and depleting the Langerhans cells of the epidermis.⁹⁷

Vitiligo induced by chemical agents

Chemical-associated vitiligo, also called leukoderma, has been described especially in rubber industry workers in contact with phenolic compounds. The first identified agent was hydroquinone monobenzyl ether (monobenzene), which induces cell death without activating the caspase cascade or DNA fragmentation.⁹⁸

Rhododendrol, another phenolic compound used in skin lightening treatments responsible for an outbreak of leukoderma in Japan, promotes cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism.⁹⁹

Hair dyes have also been implicated in the appearance of leukoderma, and one of the main suspects is paraphenylenediamine. However, the causal mechanism by which benzene derivatives cause depigmentation has yet to be elucidated.¹⁰⁰

Chemical leukoderma, however, does not share the autoimmunity changes (e.g., anti-TYRP1 antibody) as it occurs in vitiligo, despite promoting direct damage to melanocytes.¹⁰¹

Table 3 Main emerging therapies and therapeutic targets in vitiligo.

Class / Drug	Therapeutic target/ Action mechanism
Mutant HSP70 protein	Innate immunity inhibition – reduced dendritic cell activation
HSP70iQ435A	
Tyrosine kinase inhibitors	Adaptive immunity – alteration in cytokine/chemokine signaling (IFN γ , CXCL10, IL15)
Tofacitinibe (JAK1/3)	
Ruxolitinibe (JAK1/2)	
Cerdulatinib (SYK/JAK 1/2/3)	
ATI-50002 (JAK1/3)	
PF-06651600 (JAK3)	
PF-06700841 (TYK2/JAK1)	
Anti-IL15 Biologicals	Adaptive immunity – blocking of IL15 signaling
Anti-CD122 mAb	
AMG 714 (Anti-IL15 mAb)	

HSP70, heat shock protein 70; JAK, Janus kinase; SYK, spleen tyrosine kinase; TYK, tyrosine kinase; IFN γ , interferon gamma; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody.

Neural theory

The neural theory of vitiligo is based on the clinical observation of lesion distribution: on dermatomes in the segmental type and symmetrical in nonsegmental vitiligo, alluding to the neuroimmunological influence in vitiligo. There are also anecdotal cases of vitiligo appearing in delimited areas after nerve injury.¹⁰² Finally, extreme psychological stress is a factor classically associated with the development of vitiligo and other autoimmune diseases; although the pathophysiological mechanism involved in this context is not fully elucidated, whether dependent on the change in the oxidative state, the modification of the immune tolerance system, or the participation of neurokinins.¹⁰³

In vitiligo, neuropeptide Y is increased in lesional skin and the perilesional area.¹⁰⁴ Substance P is increased in the skin of stable vitiligo when compared to unstable disease, suggesting that it is associated with vitiligo stability.¹⁰⁵

Extreme physical or psychological stress increases the synthesis of catecholamines and requires the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which interferes with the immune system regulation. In the acute stress phase, neutrophilia occurs, and there is an increase in NK cells in the plasma, in addition to proinflammatory cytokine imbalance, with an increase in IL6, resulting from the secretion of cortisol and catecholamines, modulating the immune response and the development of autoimmune and autoimmune-inflammatory diseases.¹⁰⁶

Emerging therapies

The three emerging vitiligo therapeutic classes that are at the most advanced stage of development and are associated with the most important pathogenic pathways are the tyrosine kinase inhibitors (e.g., JAK1, JAK2, JAK3, TYK2), anti-IL15, and mutant HSP70.^{74,88,107} Table 3 shows the emerging drugs according to their pathophysiological target.

Conclusion and future research

The understanding of the pathogenesis of vitiligo develops in parallel with the knowledge of the genetic regulation of the phenomena linked to OS and the cutaneous immune response.

The epigenetic control of the gene expression linked to these phenomena can be an integrator of these processes since environmental and dietary factors, behavioral response patterns to stress, and the increasing exposure to industrialized compounds are intensely present in modern life, especially air pollution and aromatic compounds.^{108,109}

The regulation of pathways related to transport vesicles (exosomes) between keratinocytes, melanocytes, and inflammatory cells constitutes another factor that should elucidate the interaction between the cell damage process, melanogenesis, and the immune response in vitiligo.¹¹⁰

The role of intestinal dysbiosis in inflammation modulation, OS, and autoimmunity may disclose susceptibility profiles and the clinical expression of vitiligo, as increased intestinal permeability favors the activation of innate immunity and promotes systemic inflammatory stimulation.¹¹¹

Finally, the importance of hypovitaminosis D, a modern epidemic, in the immune response regulation, as well as the effect of its supplementation as an adjunct to treatment, must be explored since patients with vitiligo have lower levels of vitamin D.¹¹²

In conclusion, the pathogenesis of vitiligo results from an interaction of elements (multifactorial), which suggests a genetic susceptibility basis, affected by environmental factors, oxidative stress, psychological factors, and patterns of autoimmune response. The integration of these theories is the main challenge in the construction of pathophysiological models.

Financial support

None declared.

Authors' contributions

Helena Zenedin Marchioro: Approval of the final version of the manuscript; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Caio César Silva de Castro: Approval of the final version of the manuscript; design and planning of the study; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Vinicius Medeiros Fava: Approval of the final version of the manuscript; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Paula Hitomi Sakiyama: Approval of the final version of the manuscript; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Gerson Dellatorre: Approval of the final version of the manuscript; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Hélio Amante Miot: Approval of the final version of the manuscript; design and planning of the study; drafting and editing of the manuscript; critical review of the literature; critical review of the manuscript.

Conflicts of interest

Dr. Caio Castro: Advisory Board – Abbvie, Sun Pharma and Aché. Dr. Hélio Miot: Advisory Board – L'Oréal; Merz.

References

- Zhang Y, Cai Y, Shi M, Jiang S, Cui S, Wu Y, et al. The prevalence of vitiligo: a meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11:e0163806.
- Castro CCS, Miot HA. Prevalence of vitiligo in Brazil—a population survey. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31:448–50.
- Castro CCS, Nascimento LLM, Olandoski M, Mira MT. A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population. *J Dermatol Sci*. 2012;65:63–7.
- Boza JC, Giongo N, Machado P, Horn R, Fabbrin A, Cestari T. Quality of life impairment in children and adults with vitiligo: a cross-sectional study based on dermatology-specific and disease-specific quality of life instruments. *Dermatology*. 2016;232:619–25.
- Dellatorre G, Antelo DAP, Bedrikow RB, Cestari TF, Follador I, Ramos DG, et al. Consensus on the treatment of vitiligo — Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol*. 2020;95:70–82.
- Arcos-Burgos M, Parodi E, Salgar M, Bedoya E, Builes J, Jaramillo D, et al. Vitiligo: complex segregation and linkage disequilibrium analyses with respect to microsatellite loci spanning the HLA. *Hum Genet*. 2002;110:334–42.
- Zhang XJ, Liu JB, Gui JP, Li M, Xiong QG, Wu HB, et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51:383–90.
- Spritz RA, Gowan K, Bennett DC, Fain PR. Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AIS2) and 8 (AIS3), confirmation of SLEV1 on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diathesis. *Am J Hum Genet*. 2004;74:188–91.
- 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;356:1216–25.
- Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2558–62.
- Liang Y, Yang S, Zhou Y, Gui J, Ren Y, Chen J, et al. Evidence for two susceptibility loci on chromosomes 22q12 and 6p21-p22 in Chinese generalized vitiligo families. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2552–7.
- Birlea SA, 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.
- Singh A, Sharma P, Kar HK, Sharma VK, Tembhre MK, Gupta S, et al. HLA alleles and amino-acid signatures of the peptide-binding pockets of HLA molecules in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2012;132:124–34.
- 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 Dermatol Venereol*. 2007;21:205–13.
- Yang C, Wu J, Zhang X, Wen L, Sun J, Cheng Y, et al. Fine-mapping analysis of the MHC region for vitiligo based on a new Han-MHC reference panel. *Gene*. 2018;648:76–81.
- Hayashi M, Jin Y, Yorgov D, Santorico SA, Hagman J, Ferrara TM, et al. Autoimmune vitiligo is associated with gain-of-function by a transcriptional regulator that elevates expression of HLA-A*02:01 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:1357–62.
- Chen JJ, Huang W, Gui JP, Yang S, Zhou FS, Xiong QG, et al. A novel linkage to generalized vitiligo on 4q13-q21 identified in a genome-wide linkage analysis of Chinese families. *Am J Hum Genet*. 2005;76:1057–65.
- Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, Talbert J, Uhlhorn, Taylor M, et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. *Hum Mol Genet*. 2002;11:661–7.
- Fain PR, Gowan K, LaBerge GS, Alkhateeb A, Stetler GL, Talbert J, et al. A genome-wide screen for generalized vitiligo: confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1560–4.
- Ramire LD, Marcos EV, Godoy DA, de Souza-Santana FC. Association of class I and II HLA alleles and haplotypes with susceptibility to vitiligo: a study of patients with vitiligo from southeast Brazil. *Int J Dermatol*. 2016;55:e347–55.
- Li Z, Ren J, Niu X, Xu Q, Wang X, Liu Y, et al. Meta-analysis of the association between vitiligo and human leukocyte antigen-A. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5412806.
- Jin Y, Andersen G, Yorgov D, Ferrara TM, Ben S, Brownson KM, et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nat Genet*. 2016;48:1418–24.
- Quan C, Ren YQ, Xiang LH, Sun LD, Xu AE, Gao H, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nat Genet*. 2010;42:614–8.
- Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Ferrara TM, Bem S, Riccardi SL, et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat Genet*. 2012;44:676–80.
- Tang XF, Zhang Z, Hu DY, Xu AE, Zhou HS, Sun LD, et al. Association analyses identify three susceptibility Loci for vitiligo in the Chinese Han population. *J Invest Dermatol*. 2013;133:403–10.
- 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.
- Chung SA, Criswell LA. PTPN22: its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007;40:582–90.
- Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43:1066–73.
- Pan F, Yu H, Dang EV, Barbi J, Pan X, Grosso JF, et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science*. 2009;325:1142–6.
- Roberts GHL, Paul S, Yorgov D, Santorico SA, Spritz RA. Family clustering of autoimmune vitiligo results principally from polygenic inheritance of common risk alleles. *Am J Hum Genet*. 2019;105:364–72.
- Tarlé RG, Nascimento LM, Mira MT, Castro CCS. Vitiligo—part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89:461–70.
- Ricard AS, Pain C, Daubos A, Ezzedine K, Lamrissi-Garcia I, Bibeyran A, et al. Study of CCN3 (NOV) and DDR1 in normal melanocytes and vitiligo skin. *Exp Dermatol*. 2012;21:411–6.
- Reichert-Faria A, Jung JE, Moreschi Neto V, Castro CCS, Mira MT, Noronha L. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in vitiligo skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27:1057–9.
- Tarlé RG, Castro CCS, do Nascimento LM, Mira MT. Polymorphism of the E-cadherin gene CDH1 is associated with susceptibility to vitiligo. *Exp Dermatol*. 2015;24:300–2.
- Schallreuter KU, Gibbons NCJ, Zothner C, Elwary SM, Rokos H, Wood JM. Butyrylcholinesterase is present in the human epidermis and is regulated by H2O2: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349:931–8.

36. Nascimento LM, Castro CCS, Fava VM, Werneck RI, Mira MT. Genetic and biochemical evidence implicates the butyrylcholinesterase gene BCHE in vitiligo pathogenesis. *Exp Dermatol*. 2015;24:976–8.
37. Montes LF, Abulafia J, Wilborn WH, Hyde BM, Montes CM. Value of histopathology in vitiligo. *Int J Dermatol*. 2003;42:57–61.
38. Kim YC, Kim YJ, Kang HY, Sohn S, Lee ES. Histopathologic features in vitiligo. *Am J Dermatopathol*. 2008;30:112–6.
39. Xiong XX, Ding GZ, Zhao WE, Li X, Ling YT, Sun Li, et al. Differences in the melanosome distribution within the epidermal melanin units and its association with the impairing background of leukoderma in vitiligo and halo nevi: a retrospective study. *Arch Dermatol Res*. 2017;309:323–33.
40. Goldstein NB, Koster MI, Jones KL, Gao B, Hoaglin LG, Robinson SE, et al. Repigmentation of human vitiligo skin by NBUVB is controlled by transcription of GLI1 and activation of the beta-catenin pathway in the hair follicle bulge stem cells. *J Invest Dermatol*. 2018;138:657–68.
41. Gniadecka M, Wulf HC, Mortensen NN, Poulsen T. Photoprotection in vitiligo and normal skin. A quantitative assessment of the role of stratum corneum, viable epidermis and pigmentation. *Acta Derm Venereol*. 1996;76:429–32.
42. Bhawan J, Bhutani LK. Keratinocyte damage in vitiligo. *J Cutan Pathol*. 1983;10:207–12.
43. Kovacs D, Bastonini E, Ottaviani M, Cota C, Miglino E, Dell'Anna ML, et al. Vitiligo skin: exploring the dermal compartment. *J Invest Dermatol*. 2018;138:394–404.
44. Boukhedouni N, Martins C, Darrigade AS, Drullion C, Rambert J, Barrault C, et al. Type-1 cytokines regulate MMP-9 production and E-cadherin disruption to promote melanocyte loss in vitiligo. *JCI Insight*. 2020;5:e133772.
45. Rani S, Chauhan R, Parsad D, Kumar R. Effect of Dickkopf1 on the senescence of melanocytes: in vitro study. *Arch Dermatol Res*. 2018;310:343–50.
46. Hirobe T, Enami H, Nakayama A. Elastin fiber but not collagen fiber is decreased dramatically in the dermis of vitiligo patients. *Int J Dermatol*. 2020;59:e369–72.
47. Denat L, Kadekaro AL, Marrot L, Leachman SA, Abdel-Malek ZA. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *J Invest Dermatol*. 2014;134:1512–8.
48. Jenkins NC, Grossman D. Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *Biomed Res Int*. 2013;2013:908797.
49. Jiang L, Guo Z, Kong Y, Liang J, Wang Y, Wang K. Protective effects of glutamine on human melanocyte oxidative stress model. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2018;84:269–74.
50. Arck PC, Overall R, Spatz K, Liezman C, Handjiski B, Kalpp BE, et al. Towards a "free radical theory of graying": melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage. *FASEB J*. 2006;20:1567–9.
51. Jimenez-Cervantes C, Martinez-Esparza M, Perez C, Daum N, Solano F, Garcia-Borron JC. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J Cell Sci*. 2001;114:2335–44.
52. Wu X, Yang Y, Xiang L, Zhang C. The fate of melanocyte: mechanisms of cell death in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2021;34:256–67.
53. Maresca V, Roccella M, Roccella F, Camera E, Del Porto G, Passi S, et al. Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1997;109:310–3.
54. Speeckaert R, Dugardin J, Lambert J, Lapeere H, Verghae E, Speeckaert MM, et al. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32:1089–98.
55. Zedan H, Abdel-Motaleb AA, Kassem NM, Hafeez HA, Hussein MR. Low glutathione peroxidase activity levels in patients with vitiligo. *J Cutan Med Surg*. 2015;19:144–8.
56. Akoglu G, Emre S, Metin A, Akbas A, Yorulmaz A, Isikoglu A, et al. Evaluation of total oxidant and antioxidant status in localized and generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38:701–6.
57. Turkcu UO, Tekin NS, Edgunlu TG, Celik SK, Oner S. The association of FOXO3A gene polymorphisms with serum FOXO3A levels and oxidative stress markers in vitiligo patients. *Gene*. 2014;536:129–34.
58. Karsli N, Akcali C, Ozgoztasi O, Kirtak N, Inaloz S. Role of oxidative stress in the pathogenesis of vitiligo with special emphasis on the antioxidant action of narrowband ultraviolet B phototherapy. *J Int Med Res*. 2014;42:799–805.
59. Kang P, Zhang W, Chen X, Yi X, Song P, Chang Y, et al. TRPM2 mediates mitochondria-dependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2018;126:259–68.
60. Zhang CF, Gruber F, Ni C, Mildner M, Koenig U, Karner S, et al. Suppression of autophagy dysregulates the antioxidant response and causes premature senescence of melanocytes. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1348–57.
61. He Y, Li S, Zhang W, Dai W, Cui T, Wang G, et al. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H2O2-induced oxidative stress in vitiligo. *Sci Rep*. 2017;7:42394.
62. Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE, Group VW. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77:1–13.
63. Toosi S, Orlow SJ, Manga P. Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of IL6 and IL8. *J Invest Dermatol*. 2012;132:2601–9.
64. Boorn JG, Picavet DI, Swieten PF, Veen HA, Konijnenberg D, Veelen PA, et al. Skin-depigmenting agent monobenzone induces potent T-cell autoimmunity toward pigmented cells by tyrosinase haptentation and melanosome autophagy. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1240–51.
65. 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.
66. Harris JE. Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo. *Immunol Rev*. 2016;269:11–25.
67. 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:e51040.
68. Tulic MK, Cavazza E, Cheli Y, Jacquelin A, Luci C, Cardot-Leccia, et al. Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo. *Nat Commun*. 2019;10:2178.
69. Gholijani N, Yazdani MR, Dastgheib L. Predominant role of innate proinflammatory cytokines in vitiligo disease. *Arch Dermatol Res*. 2020;312:123–31.
70. Kroll TM, Bommasamy H, Boissy RE, Hernandez C, Nickoloff BJ, Mestrlil R, et al. 4-Tertiary butyl phenol exposure sensitizes human melanocytes to dendritic cell-mediated killing: relevance to vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2005;124:798–806.
71. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat shock proteins as immunomodulators. *Molecules*. 2018;23:2846.
72. Jacquemin C, Rambert J, Guillet S, Thiola D, Boukhedouni N, Doutré M-S, et al. Heat shock protein 70 potentiates interferon alpha production by plasmacytoid dendritic cells: relevance for cutaneous lupus and vitiligo pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2017;177:1367–75.
73. Mosenson JA, Zloza A, Klarquist J, Barfuss AJ, Guevara-Patino JA, Poole IC. HSP70i is a critical component of the immune

- response leading to vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:88–98.
74. Mosenson JA, Zloza A, Nieland JD, Garrent-Mayer E, Eby JM, Huelsmann EJ, et al. Mutant HSP70 reverses autoimmune depigmentation in vitiligo. *Sci Transl Med.* 2013;5:174ra28.
 75. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:2952–6.
 76. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117:3720–32.
 77. Marie J, Kovacs D, Pain C, Jouary T, Cota C, Vergier B, et al. Inflammasome activation and vitiligo/nonsegmental vitiligo progression. *Br J Dermatol.* 2014;170:816–23.
 78. Boorn JG, Konijnenberg D, Delleman TAM, Veen JPW, Bos JD, Melief CJM, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2220–32.
 79. Kroon MW, Kemp EH, Wind BS, Krebbers G, Bos JD, Gawkrödger DJ, et al. Melanocyte antigen-specific antibodies cannot be used as markers for recent disease activity in patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27:1172–5.
 80. Riding RL, Harris JE. The role of memory CD8⁺ T cells in vitiligo. *J Immunol.* 2019;203:11–9.
 81. Wankowicz-Kalinska A, Wijngaard RMJGJ, Tigges BJ, Westerhof W, Ogg GS, Crundolo V, et al. Immunopolarization of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest.* 2003;83:683–95.
 82. Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme 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;117:326–32.
 83. Harris JE, Harris TH, Weninger W, Wherry EJ, Hunter CA, Turka LA. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8(+) T-cell accumulation in the skin. *J Invest Dermatol.* 2012;132:1869–76.
 84. Wang XX, Wang QQ, Wu JQ, Jiang M, Chen L, Zhang CF, et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br J Dermatol.* 2016;174:1318–26.
 85. Rashighi M, Agarwal P, Richmond JM, Harris TH, Dresser K, Su MW, et al. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci Transl Med.* 2014;6:223ra23.
 86. Richmond JM, Masterjohn E, Chu R, Tedstone J, Youd ME, Harris JE. CXCR3 depleting antibodies prevent and reverse vitiligo in mice. *J Invest Dermatol.* 2017;137:982–5.
 87. Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo: mechanisms of pathogenesis and treatment. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:621–48.
 88. Richmond JM, Strassner JP, Zapata Jr L, Garg M, Riding RL, Refat MA, et al. Antibody blockade of IL-15 signaling has the potential to durably reverse vitiligo. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaam7710.
 89. Jacquemin C, Martins C, Lucchese F, Thiolat D, Taieb A, Seneschal J, et al. NKG2D defines a subset of skin effector memory CD8 T cells with proinflammatory functions in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2020;140:1143–53.
 90. Chen X, Guo W, Chang Y, Chen J, Kang P, Yi X, et al. Oxidative stress-induced IL-15 trans-presentation in keratinocytes contributes to CD8(+) T cells activation via JAK-STAT pathway in vitiligo. *Free Radic Biol Med.* 2019;139:80–91.
 91. Ahmed MB, Zarea I, Rekik R, Elbeldi-Ferchiou A, Kourda N, Hmida NB, et al. Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:99–109.
 92. Mukhatayev Z, Dellacecca ER, Cosgrove C, Shivde R, Jaisankar D, Pontarolo-Maag K, et al. Antigen specificity enhances disease control by Tregs in vitiligo. *Front Immunol.* 2020;11:581433.
 93. Willemsen M, Post NF, Uden NOP, Narayan VS, Chielie S, Kemp EH, et al. Immunophenotypic analysis reveals differences in circulating immune cells in peripheral blood of segmental and nonsegmental vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2022;142:876–83.
 94. Dahir AM, Thomsen SF. Comorbidities in vitiligo: comprehensive review. *Int J Dermatol.* 2018;57:1157–64.
 95. Failla CM, Carbone ML, Fortes C, Pagnanelli G, D'Atri S. Melanoma and vitiligo: in good company. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5731.
 96. Geel N, Speeckaert R, Mollet I, Schepper S, Wolf J, Tjin EPM, et al. In vivo vitiligo induction and therapy model: double-blind, randomized clinical trial. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:57–65.
 97. Hart PH, Norval M, Byrne SN, Rhodes LE. Exposure to ultraviolet radiation in the modulation of human diseases. *Annu Rev Pathol.* 2019;14:55–81.
 98. Hariharan V, Klarquist J, Reust MJ, Koshoffer A, Mckee MD, Boisse RE, et al. Monobenzyl ether of hydroquinone and 4-tertiary butyl phenol activate markedly different physiological responses in melanocytes: relevance to skin depigmentation. *J Invest Dermatol.* 2010;130:211–20.
 99. Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, et al. Rhododendrol-induced leukoderma update II: Pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanism-based treatments in comparison with vitiligo. *J Dermatol.* 2021;48:969–78.
 100. Harris JE. Chemical-induced vitiligo. *Dermatol Clin.* 2017;35:151–61.
 101. Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oisio N, et al. Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2019;95:80–3.
 102. Al'Abadie MS, Senior HJ, Bleehen SS, Gawkrödger DJ. Neuropeptide and neuronal marker studies in vitiligo. *Br J Dermatol.* 1994;131:160–5.
 103. Simons RE, Zevy DL, Jafferany M. Psychodermatology of vitiligo: psychological impact and consequences. *Dermatol Ther.* 2020;33:e13418.
 104. Lazarova R, Hristakieva E, Lazarov N, Shani J. Vitiligo-related neuropeptides in nerve fibers of the skin. *Arch Physiol Biochem.* 2000;108:262–7.
 105. Falabella R, Barona MI, Echeverri IC, Alzate A. Substance P may play a part during depigmentation in vitiligo. A pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17:355–6.
 106. Song H, Fang F, Tomasson G, Arnberg FK, Mataix-Cols D, Cruz LF, et al. Association of stress-related disorders with subsequent autoimmune disease. *JAMA.* 2018;319:2388–400.
 107. Craiglow BG, King BA. Tofacitinib citrate for the treatment of vitiligo: a pathogenesis-directed therapy. *JAMA Dermatol.* 2015;151:1110–2.
 108. Agrawal D, Shajil EM, Marfatia YS, Begum R. Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda. *Pigment Cell Res.* 2004;17:289–94.
 109. Vaish U, Kumar AA, Varshney S, Ghosh S, Sengupta S, Sood C, et al. Micro RNAs upregulated in Vitiligo skin play an important role in its etiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk. *Sci Rep.* 2019;9:10079.
 110. Wong PM, Yang Lil, Yang Lin, Wu H, Li W, Ma X, et al. New insight into the role of exosomes in vitiligo. *Autoimmun Ver.* 2020;19:102664.

111. Bziouche H, Sjodin KS, West CE, Khemis A, Rocchi S, Passeron T, et al. Analysis of matched skin and gut microbiome of patients with vitiligo reveals deep skin dysbiosis: link with mitochondrial and immune changes. *J Invest Dermatol*. 2021;141:2280–90.
112. Varikasuvu SR, Aloori S, Varshney S, Bhongir AV. Decreased circulatory levels of Vitamin D in Vitiligo: a meta-analysis. *An Bras Dermatol*. 2021;96:284–94.

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.

ARTIGO CIENTÍFICO

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

Title: *Prevalence of immune-mediated inner ear disease and anti-Hsp70 antibodies in non-segmental vitiligo.*

Autores:

Helena Zenedin Marchioro

Dermatologista, MD, Preceptora da Residência de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: helenamarchioro@yahoo.com.br

ORCID: 0000-0002-2756-053X

Abreviatura: Marchioro, H.Z.

Caio Cesar Silva de Castro

Professor Adjunto de Dermatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: caio.castro@pucpr.br

ORCID: 0000-0001-9767-5765

Abreviatura: Silva de Castro, C.C.

Aline Salete Turatti Chiesorin

Fonoaudióloga do Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: aline_fono@yahoo.com.br

Abreviatura: Chiesorin, A.S.T.

Elaine Cristina Weiss Bindi

Fonoaudióloga do Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: nani_weiss@hotmail.com

Abreviatura: Bindi, E.C.W.

Isabella Gizzi Jiacomini

Biomédica. Doutora em Patologia pela Universidade Federal do Paraná. Curitiba (PR), Brasil.

E-mail: bela.jiacomini@gmail.com

ORCID: 0000-0002-8367-8524

Abreviatura: Jiacomini, I.G.

Hélio Amante Miot

Dermatologista, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Email: heliomiot@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2596-9294

Abreviatura: Miot, H.A.

Correspondência

Helena Zenedin Marchioro

Dermatologista pela Sociedade Brasileira de Dermatologia. Preceptora da Residência de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Curitiba.

Rua André de Barros, 226, sala 1211. Centro. Curitiba, PR, Brasil

Email: helenamarchioro@yahoo.com.br

Fone: (41) 3222-0842

Local de desenvolvimento do estudo

Departamento de Dermatologia da Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

Conflitos de interesse

Marchioro, H.Z.: Janssen – advisory board

Silva de Castro, C.C.: Ache – speaker, advisory board; Sun pharma – advisory board; Abbvie – advisory board; Pfizer – clinical trial

Chiesorin, A.S.T.: nenhum

Bindi, E.C.W.: nenhum

Jiacomini, I.G.: nenhum

Miot, H.A.: advisory board – Merz e L'Oréal;

Os autores declaram não haver conflitos de interesse envolvendo esse trabalho.

Financiamento: FUNADERM (2020).

Resumo

Fundamentos: A perda auditiva neurosensorial (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.

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 Neurosensorial; 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

Introdução

Vitiligo é doença sistêmica imunomediada, caracterizada clinicamente por manchas despigmentadas na pele e mucosas que podem se distribuir de maneira limitada (forma segmentar), ou apresentarem-se de forma não segmentar (VNS), como ocorre no vitiligo generalizado.¹ Acomete cerca de 0,6% da população brasileira e corresponde a 1,6% dos atendimentos dermatológicos no Brasil.^{2,3}

A patogênese do vitiligo é multifatorial, envolvendo predisposição genética, estresse oxidativo, defeitos na adesão entre as células da epiderme, além da agressão imune de padrão inato e adaptativo, que culminam na morte do melanócito mediada por linfócitos T citotóxicos.^{4,5} A proteína de choque térmico 70 (*heat shock protein 70* ou Hsp70) é entendida como um dos elos entre a imunidade inata e a adaptativa, uma vez que ela é induzida pelo estresse oxidativo, sendo secretada pelo melanócito nessa situação. Hsp70 promove a ativação das células apresentadoras de antígenos, sendo estas responsáveis por induzir a resposta imune adaptativa.⁶ A presença de melanócitos extracutâneos nas meninges, úvea e na cóclea, pode justificar o envolvimento desses órgãos durante a atividade do vitiligo, levando a quadros de uveíte, ou sintomas neurológicos.⁷

Indivíduos com VNS apresentam aumento de perda auditiva quando comparados à população geral, chance de 1,75 a 6,81 vezes maior, sendo essa hipoacusia de padrão neurossensorial e de alta frequência (≥ 2000 Hz).^{8,9} Uma pesquisa de base populacional em brasileiros mostrou que a prevalência de perda auditiva na população adulta é de 16,5%, sendo a perda auditiva neurossensorial (PANS) a mais frequente, e que pode ser decorrente de exposição ocupacional a ruído, causas infecciosas, metabólicas, uso de drogas ototóxicas, trauma, envelhecimento, além de autoimunidade.^{10,11}

A doença imunomediada do ouvido interno (DIMOI) é uma enfermidade de etiologia autoimune, cuja prevalência estimada é de 0,015% da população, mas que provavelmente seja subdiagnosticada. Acomete principalmente mulheres, entre a quarta e a sexta décadas de vida, costuma acompanhar doenças autoimunes sistêmicas, e se caracteriza por um quadro de perda auditiva neurossensorial progressiva, sendo bilateral em mais de 80% dos casos na sua evolução.¹² O diagnóstico da DIMOI implica certa dificuldade e, até o momento, não existem critérios universalmente aceitos. É considerado um diagnóstico de exclusão, quando há um quadro clínico típico, associado a exames laboratoriais sugestivos e resposta clínica positiva a corticosteroides ou outros imunossuppressores.¹² García-Berrocal e colaboradores propuseram critérios diagnósticos, que podem ser apreciados no quadro 1.¹³ Dentre os exames laboratoriais utilizados, a presença do anticorpo anti-Hsp70 (anticorpo anti-cóclea) é considerado um dos marcadores sorológicos para o diagnóstico de DIMOI.¹⁴ É importante salientar que o diagnóstico precoce da DIMOI e a introdução do tratamento podem prevenir a perda auditiva irreversível.

Vitiligo é associado a diversas doenças autoimunes sistêmicas, como as tireoidopatias, alopecia areata, anemia perniciosa, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes *mellitus*; assim como com alta ocorrência de diversos autoanticorpos.^{15,16} Porém, até o momento, a prevalência de DIMOI e de anticorpos anti-Hsp70 em vitiligo não foram investigados de forma adequada.

Portanto, os objetivos principais dessa pesquisa são: avaliar a prevalência de DIMOI e de anticorpos anti-Hsp70 em indivíduos adultos com vitiligo não segmentar. Já os objetivos secundários são: avaliar os resultados de audiometria e a correlação dos anticorpos anti-HSP70 (positividade e níveis séricos) com as variáveis clínicas.

Quadro 1. Critérios diagnósticos para DIMOI. O diagnóstico é estabelecido quando presentes três critérios maiores, ou dois critérios maiores e dois critérios menores.¹³

Critérios maiores	Critérios menores
Envolvimento neurossensorial bilateral	Envolvimento neurossensorial unilateral
Presença de doença autoimune sistêmica	Indivíduo jovem/ meia idade (frequentemente mulher)
Altos níveis de fator antinuclear (FAN)	Anticorpos anti-HSP70 presentes
Níveis reduzidos de células T naïve (CD4RA)	Resposta positiva a corticosteroides (taxa de melhora <80%)
Resposta positiva a corticosteroides (taxa de melhora >80%)	

MÉTODOS

Estudo do tipo transversal, no qual foram incluídos voluntários adultos, de ambos os sexos, com diagnóstico de VNS, provenientes do ambulatório de dermatologia do Hospital Santa Casa, além de pacientes atendidos no consultório particular dos autores, na cidade de Curitiba (PR), Brasil. O período de recrutamento foi de novembro de 2020 a fevereiro de 2022. O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos da instituição (parecer número 4.333.389 – Anexo 1).

Não foram incluídas pessoas com idade menor que 18 ou maior que 64 anos; vitiligo do tipo segmentar; portadores de doenças autoimunes reumatológicas; uso de corticosteroides sistêmicos, imunossupressores ou imunobiológicos nos últimos três meses; e histórico de câncer de órgão sólido há menos de cinco anos. Idosos não foram incluídos pelo alto risco de apresentarem perda auditiva relacionada à idade, o que seria um fator de confusão. Vitiligo segmentar tem uma fisiopatologia um tanto diversa, ainda mal entendida, tendo menor associação com outras doenças autoimunes. Tanto as doenças autoimunes reumatológicas quanto vários tipos de câncer podem cursar com aumento de anticorpos anti-Hsp70. Já o uso de imunossupressores teoricamente poderia reduzir os níveis dos anticorpos de maneira inespecífica.

Após assinarem termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo2), os voluntários responderam a um questionário com dados clínicos e epidemiológicos (Anexo 3) e, em seguida, foram examinados para determinação da extensão da doença, através da ferramenta VES (*Vitiligo Extent Score*) (Anexo4), pela pesquisadora principal (HJM).¹⁷ Atividade da doença foi determinada através dos seguintes critérios: doença em progressão – surgimento de novas manchas acrómicas nos últimos 12 meses; estabilidade – sem surgimento de manchas novas e também sem repigmentação das manchas existentes por pelo menos 12 meses; e regressão – manchas acrómicas de vitiligo em fase de repigmentação no momento do recrutamento. Essa classificação foi baseada em auto-relato.

Todos os participantes foram submetidos à coleta de 10 ml de sangue periférico. Foi utilizado sistema de coleta a vácuo, além de tubo com ativador de coágulo e gel separador. Após repousar por 30 min, as amostras foram centrifugadas para separação do soro (centrífuga Hermle Z326K, velocidade de 5000 rpm por 10 min), sendo este armazenado em tubos de plástico sem aditivos e congelado para posterior análise.

Para a dosagem dos anticorpos anti-Hsp70 no soro, foi utilizado o método ELISA (kit ELISA anti-Hsp70 IgG/A/M human, ADI-EKS-750, Enzo Life Sciences, Nova Iorque, EUA) sob diluição de 1:1000. A curva padrão foi

executada em duplicata, paralelamente ao ensaio com soro dos voluntários (Apêndice 1). Foi realizado um pré-teste com o soro de 24 voluntários sadios para determinação de valores normais na população, definidos como os valores dentro de dois desvios-padrão a partir da média (i.e. $\leq 148,8$ ng/mL – Apêndice 2).¹⁸ Os voluntários sadios eram indivíduos adultos, que não apresentavam vitiligo ou qualquer outra doença otológica, nem doenças autoimunes sistêmicas, assim como não utilizavam nenhum tipo de medicação sistêmica que pudesse causar supressão imunológica. Essa etapa da pesquisa foi realizada no laboratório de Imunoquímica, do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Além disso, todos os participantes realizaram exame de audiometria vocal, tonal e imitanciometria (audiômetro Amplivox 260 e imitanciómetro Amplivox 202), que foi executado por duas fonoaudiólogas colaboradoras da pesquisa (ASTC e ECWB). Foi realizada inspeção do meato auditivo em todos os participantes. A avaliação audiológica foi realizada no Hospital Santa Casa de Curitiba. Para definição audiométrica de perda auditiva, foram utilizados os critérios diagnósticos de Silman e Silverman: Perda auditiva condutiva – limiares de via óssea menores ou iguais a 15 dB NA e limiares de via aérea maiores que 25 dB NA, com gap aéreo-ósseo maior ou igual a 15 dB; perda auditiva sensorineural – limiares de via óssea maiores do que 15 dB NA e limiares de via aérea maiores que 25 dB NA, com gap aéreo-ósseo de até 10 dB; perda auditiva mista – limiares de via óssea maiores do que 15 dB NA e limiares de via aérea maiores que 25 dB NA, com gap aéreo-ósseo maior ou igual a 15 dB.¹⁹

Para o diagnóstico de DIMOI, consideramos os critérios diagnósticos de Garcia-Berrocal, desde que não houvesse nenhuma outra causa comumente associada a PANS, como: idade acima de 60 anos, exposição ocupacional a ruído, *diabetes mellitus*, uso de drogas ototóxicas (Apêndice 3), infecções otológicas de repetição, histórico de cirurgia otológica ou de rompimento da membrana timpânica, meningite prévia, histórico de trauma otológico.¹³

As variáveis qualitativas foram representadas pelos seus percentuais, e seus intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram calculados a partir de reamostragem com 5.000 simulações (*bootstrap*) com correção de viés acelerado. As variáveis quantitativas foram representadas pelas médias e desvios-padrão, sendo comparadas entre os subgrupos pelos testes t de Student ou Kruskal-Wallis, de acordo com a normalidade e homoscedasticidade da amostra.²⁰ A correlação entre a extensão da doença (VES), idade de início, tempo de evolução e os níveis de anticorpo anti-Hsp70 foi explorada pelo coeficiente de Spearman.²¹

Os dados foram tabulados em MSEXcel 2013, e analisados no software IBM SPSS 25v. Considerou-se significativo p-valor $< 0,05$.²²

O tamanho amostral foi dimensionado tendo em base a expectativa de até 7,5% de prevalência de anticorpos anti-Hsp70 em pacientes com VNS, sendo considerado um erro alfa de 5% e poder de 80%, totalizando a necessidade de até 107 pacientes.²³

RESULTADOS

Foram incluídos 123 pacientes com diagnóstico de VNS. Foram excluídos posteriormente 11 indivíduos, sendo: quatro devido a uso de imunossupressor, dois com doença reumatológica, e cinco que não completaram as duas etapas da pesquisa.

Um total de 112 pacientes com diagnóstico de VNS concluíram as duas etapas previstas – audiometria e dosagem sérica de anticorpos anti-Hsp70. Os principais dados clínicos e demográficos desses indivíduos estão

na tabela 1. Destaquem-se a inclusão de participantes de ambos os sexos, com diferentes faixas etárias, múltiplas comorbidades, diferentes tempos de evolução da doença, alta taxa de vitiligo em progressão e de sintomas otológicos.

Os resultados das audiometrias e dos anticorpos anti-Hsp70 estão dispostos na tabela 2. PANS foi identificada em 38 indivíduos, sendo que PANS unilateral ocorreu em 10 participantes (8,9%) e bilateral em 28 (25,0%; IC 95% 17,9 a 32,1%); sendo que 17 participantes (15,2%; IC95% 9,8 a 20,5%) apresentavam quadro de PANS bilateral que não poderia ser explicada por outra causa (exposição laboral a ruído, infecção, doenças metabólicas, uso de drogas ototóxicas ou trauma).

Os níveis séricos dos anticorpos anti-Hsp70 variaram de 0,0 a 438,0 ng/ml na amostra. Anticorpos anti-Hsp70 foram positivos em 30 pacientes (26,8%; IC95% 19,6 a 33,9%). Já no subgrupo de pacientes com PANS de etiologia inexplicada, a positividade do anticorpo anti-HSP70 foi de 35,3% ($n = 6$). Estes seis indivíduos que apresentaram PANS de origem inexplicada e anticorpos anti-HSP70 positivos corresponderam a 5,4% (IC95% 2,7 a 8,0%) da amostra, e preencheram critérios diagnósticos de DIMOI. Para o diagnóstico de DIMOI, os critérios considerados foram: dois maiores (PANS bilateral e presença de doença sistêmica autoimune – vitiligo não segmentar) mais dois menores (indivíduos jovens ou de meia idade e anticorpos anti-Hsp70 positivos).

Ainda, os valores medianos dos anticorpos anti-HSP70 séricos dos pacientes com DIMOI foram maiores que os demais pacientes com vitiligo (Figura 1): 220,9 vs. 85,1 ng/ml ($p = 0,001$). Também houve maior média de idade de início do vitiligo entre os pacientes com DIMOI: 46 vs. 32, anos ($p = 0,039$) (Figura 2); porém, menor extensão mediana da doença: VES 0,4 vs. 1,8 ($p = 0,027$) (Figura 3). Nem os títulos, nem a positividade dos anticorpos se correlacionaram com a extensão da doença (VES), tempo de evolução do vitiligo, ou sua atividade ($p > 0,1$).

Quando questionados, dos seis pacientes diagnosticados com DIMOI, apenas quatro referiram hipoacusia, metade referiu vertigem e metade zumbido.

Entre os 10 participantes em que foi identificada PANS unilateral, 80% referiam hipoacusia, 70% zumbido, 40% vertigem, e 40% apresentavam níveis elevados de anti-Hsp70, sendo que todos estes anti-Hsp70 positivos queixavam de zumbido.

Todos os participantes identificados com anormalidades na audiometria foram encaminhados para seguimento otorrinolaringológico.

Tabela 1. Principais dados clínicos e demográficos dos participantes (*n* = 112).

Variáveis	Valores	
Sexo, n (%)		
Feminino	76	67,9%
Masculino	36	32,1%
Idade, anos (média, dp)	47,8	11,1
Fototipo		
I e II	27	24,1%
III	51	45,5%
IV e V	34	30,4%
Escolaridade, n (%)		
Sem estudo	3	2,7%
Fundamental	25	22,3%
Médio	38	33,9%
Superior	46	41,1%
Grau de obesidade, n (%)		
Hipotrófico (IMC < 19 kg/m ²)	2	1,8%
Eutrófico (IMC entre 19 e 25 kg/m ²)	36	32,1%
Sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m ²)	51	39,8%
Obesidade (IMC > 30 kg/m ²)	24	21,4%
Idade de início do vitiligo, anos (média, dp)	33,0	16,5
Tratamentos prévios, n (%)		
Corticosteroide tópico	47	42,0%
Inibidor de calcineurina	85	75,9%
Corticosteroide sistêmico	22	19,6%
Metotrexato	6	5,4%
Fototerapia PUVA	29	25,9%
Fototerapia UVB banda estreita	28	25,0%
Outros	10	8,9%
Tratamento atual, n (%)		
Corticosteroide tópico	13	11,6%
Inibidor de calcineurina	49	43,8%
Corticosteroide sistêmico	2	1,8%
Fototerapia PUVA	17	15,2%
Fototerapia UVB banda estreita	19	17,
Outros	7	6,3%
Comorbidades referidas, n (%)		
Hipertensão arterial	24	21,4%
Diabetes	10	8,9%
Tireoidopatias	31	27,7%
Depressão	20	17,9%
Ansiedade	30	26,8%
Dislipidemia	11	9,8%
VES (mediana, P ₂₅ –P ₇₅)	1,7	0,6–4,1
Atividade da doença, n (%)		
Progressiva	83	74,1%
Estável	15	13,4%
Em regressão	14	12,5%
Sintomas otológicos, n (%)		
Hipoacusia	43	38,4%
Vertigem	36	32,1%
Zumbido	38	33,9%

IMC: Índice de Massa Corpórea; dp: desvio-padrão; VES: *Vitiligo Extent Score*;

Tabela 2. Resultados das audiometrias e dos anticorpos anti-Hsp70 dos participantes ($n = 112$).

Variáveis	Valores	
Audiometrias, geral (n = 112), n (%)		
Normal	67	59,8%
PANS unilateral	10	8,9%
PANS bilateral	28	25,0%
Perda auditiva mista	7	6,3%
PANS bilateral, n (%) - etiologia (n = 28)		
Ocupacional	3	2,7%
Infecciosa	2	1,8%
Metabólica	4	3,6%
Drogas ototóxicas	2	1,8%
Não esclarecida	17	15,2%
Anticorpos anti-Hsp70, geral (n = 112), n (%)		
Positivo (>148,8 ng/mL)	30	26,8%
Negativo	82	73,2%
Anticorpos anti-Hsp70, subgrupo PANS bilateral de etiologia inexplicada (n = 17), n (%)		
Positivo (>148,8 ng/mL)	6	35,3%
Negativo	11	64,7%

*PANS = perda auditiva neurosensorial

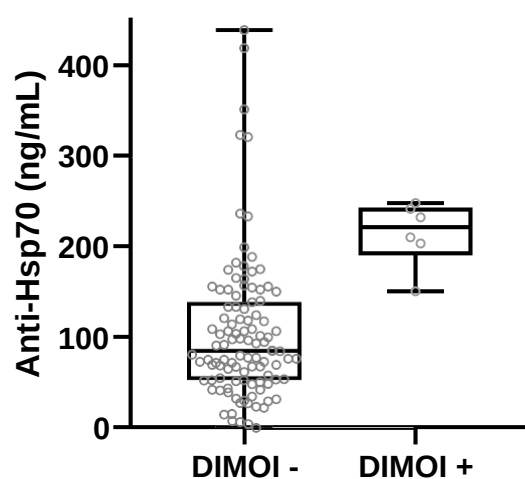


Figura 1. Níveis séricos dos anticorpos anti-Hsp70 em participantes com e sem critérios para DIMOI ($n = 112$; $p = 0,001$).

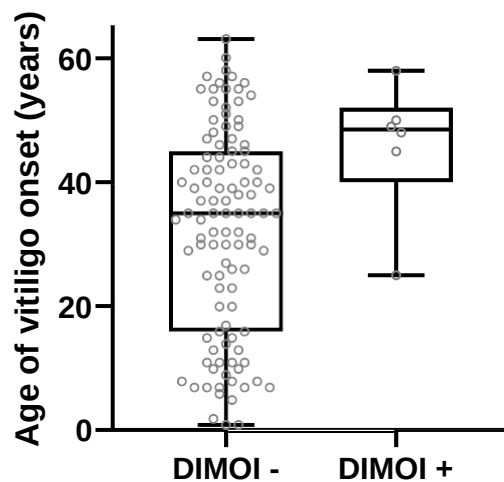


Figura 2. Idade de início da doença em participantes com e sem critérios para DIMOI ($n = 112$; $p = 0,039$).

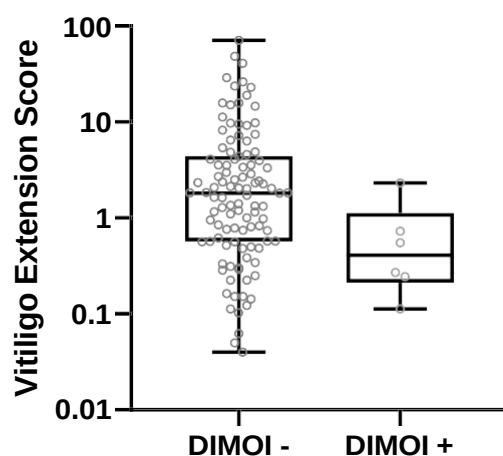


Figura 3. Extensão (*Vitiligo Extent Score*) da doença em participantes com e sem critérios para DIMOI ($n = 112$; $p = 0,027$).

DISCUSSÃO

A associação entre VNS e PANS é bem definida, subsidiando seu caráter de doença sistêmica.⁹ Entretanto, a etiologia do quadro audiológico não foi investigada nesses pacientes, além da maior parte dos estudos incluir idosos na amostra, o que pode inflacionar sua prevalência. Neste estudo original, corroboramos o achado de alta prevalência de PANS em pacientes brasileiros com vitiligo, e identificamos pela primeira vez uma alta frequência de DIMOI.

A prevalência de perda auditiva na população adulta é estimada em cerca de 15%, e aumenta em função da idade.^{10,24} Na nossa amostra de indivíduos adultos portadores de VNS, PANS ocorreu em quase o dobro

dessa expectativa, corroborando os dados da literatura.^{25,26} Dentre as principais etiologias de PANS na população, podem ser incluídas a idade avançada, exposição a ruído ocupacional, infecções (p.ex. meningites), causas metabólicas como diabetes *mellitus*, uso de drogas ototóxicas (p. ex. quimioterápicos e gentamicina), trauma e autoimunidade.¹¹ Em nossa amostra, 15,2% dos participantes apresentavam quadro de PANS bilateral que não era justificada por nenhuma outra causa, além da autoimunidade.

Autoanticorpos e outras doenças autoimunes são frequentes em pacientes com VNS. Anticorpos anti-tireoide (anti-tireoperoxidase e anti-tireoglobulina), anti-células parietais gástricas, antinucleares e anti-adrenais são frequentemente detectados em pacientes com vitiligo.¹⁶ Nessa amostra, encontramos níveis elevados de anticorpos anti-Hsp70 em 26,8% dos pacientes com VNS, o que supera a expectativa de menos que 5% de positividade da população adulta.²⁷ Entre as autoimunidades associadas à presença de anticorpos anti-Hsp70, destacam-se a DIMOI e a síndrome de Cogan, que combina perda auditiva, vertigem, ceratite intersticial e aortite.²⁸ A alta prevalência de anticorpos anti-Hsp70 em pacientes com VNS consolida a hipótese de uma participação do vitiligo no processo autoimune de agressão aos melanócitos da cóclea.

Melanócitos ocorrem em abundância no ouvido interno, especialmente na região da *stria vascularis* na cóclea, mas também em outras partes tanto da cóclea quanto do sistema vestibular.²⁹ Sua função no ouvido interno não é bem definida, mas acredita-se que desempenhe um papel protetor contra toxicidade por drogas, ou no estresse oxidativo.³⁰ Além disso, a sua redução ou ausência, como ocorre não só no vitiligo mas também no albinismo e em outras desordens pigmentares, como na doença de Vogt-Koyanagi-Harada e na síndrome de Waardenburg, em que está associada à perda auditiva e desordens vestibulares.^{31,32}

Um subgrupo de 5,4% dos pacientes adultos com VNS apresentou quadro de PANS bilateral sem causa definida e anticorpos anti-Hsp70 positivos, preenchendo critérios para DIMOI, em uma prevalência centenas de vezes maior do que a esperada na população.¹² Além disso, esse subgrupo de pacientes apresentou níveis de anticorpos anti-Hsp70 2,5 vezes maiores que o restante dos indivíduos estudados, 77% menor extensão da doença, e a idade de início do vitiligo foi 14 anos maior que os demais, substanciando um fenótipo individualizado de participantes com VNS propícios ao desenvolvimento de DIMOI.

DIMOI foi referido como associado a diversas autoimunidades sistêmicas, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e síndrome de Sjögren, entre outras.³³ Tendo em vista nossos resultados, vitiligo também deve ser incluído na lista de doenças autoimunes sistêmicas associadas a DIMOI.

Devido à raridade e quadro clínico insidioso, o diagnóstico de DIMOI é bastante complexo, não existem critérios bem definidos nos diferentes estudos, tampouco investigações populacionais extensas.^{12,34} Em geral, a suspeição diagnóstica ocorre quando há uma associação de fatores, tais como: um quadro clínico característico, o afastamento de outras causas mais comuns de PANS, presença de alterações audiométricas progressivas em audiometrias subsequentes, positividade de anticorpos anti-Hsp70 e de outros marcadores de autoimunidade (como fator antinuclear, por exemplo), além da resposta

às terapêuticas com corticosteroides ou imunossupressores. Portanto, uma limitação da nossa pesquisa é que não acompanhou os indivíduos ao longo do tempo, por ser um estudo transversal, tampouco foram dosados outros autoanticorpos; além disso, foram excluídos participantes com VNS em uso de imunossupressores e portadores de outras doenças reumatológicas, para garantir a homogeneidade da amostra e maximizar a inferência dos níveis de autoanticorpos anti-Hsp70. Esses elementos podem ter subestimado a prevalência de DIMOI nessa amostra.

Houve dois participantes que cumpriram critérios diagnósticos de DIMOI, porém, que não haviam se queixado de hipoacusia quando questionados. Esse dado subsidia a existência de quadros subclínicos de DIMOI, tornando ainda mais importante a indicação de audiometria em pacientes com VNS, para rastrear PANS, cuja etiologia deve ser investigada para exclusão de DIMOI, já que seu tratamento evita a progressão da doença e a evolução para surdez.³⁵ Ademais, quatro participantes (3,6%) apresentaram PANS unilateral e positividade do anticorpo anti-HSP70 e zumbido, o que pode configurar um quadro inicial de DIMOI que seria apenas identificado pelo seguimento longitudinal, ou pela resposta à corticoterapia. Por fim, temos que observar que os anticorpos anti-Hsp70, apesar de serem considerados marcadores sorológicos de DIMOI, são positivos em até 33% dos pacientes com esse diagnóstico, sendo esse mais um dado que reforça a ideia de uma prevalência subestimada de DIMOI na nossa amostra.¹⁴

Outras limitações residem no fato de termos estudado uma população específica da região Sul do Brasil e, portanto, esses dados não podem ser extrapolados para outras populações com diferentes características étnicas ou perfis demográficos, assim como crianças e idosos com VNS. Novas pesquisas devem avaliar se as terapêuticas sistêmicas para o tratamento do VNS, como, por exemplo, os inibidores da via JAK/STAT serão eficazes na remissão da DIMOI.

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.

REFERÊNCIAS

1. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(3). doi:10.1111/J.1755-148X.2012.00997.X
2. Miot HA, Penna G de O, Ramos AMC, et al. Profile of dermatological consultations in Brazil (2018). *An Bras Dermatol.* 2018;93(6):916-928. doi:10.1590/ABD1806-4841.20188802
3. Cesar Silva de Castro C, Miot HA. Prevalence of vitiligo in Brazil-A population survey. *Pigment Cell*

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 Neurotol.* 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.

PERSPECTIVAS

Esse trabalho levanta algumas perspectivas de estudos futuros. Como exemplo, um estudo longitudinal de seguimento desses indivíduos que possuem DIMOI e vitiligo, a fim de se avaliar se os tratamentos do vitiligo poderiam levar à melhora da audição também. Ainda, avaliar a associação entre vitiligo segmentar da face e hipoacusia neurosensorial em ambos os ouvidos e testar a hipótese de que os melanócitos da cóclea mais próximos ao vitiligo pudessem ser mais atingidos. Mapear os marcadores genéticos de risco para DIMOI para se entender melhor essa associação.

Além disso, a partir desse estudo, torna-se importante a divulgação entre os médicos dermatologistas e otorrinolaringologistas dessa associação, a fim de se aumentar o alcance desses achados, que podem ser revertidos em mudanças reais na prática clínica e na vida dos pacientes afetados por ambas as doenças (vitiligo e DIMOI).

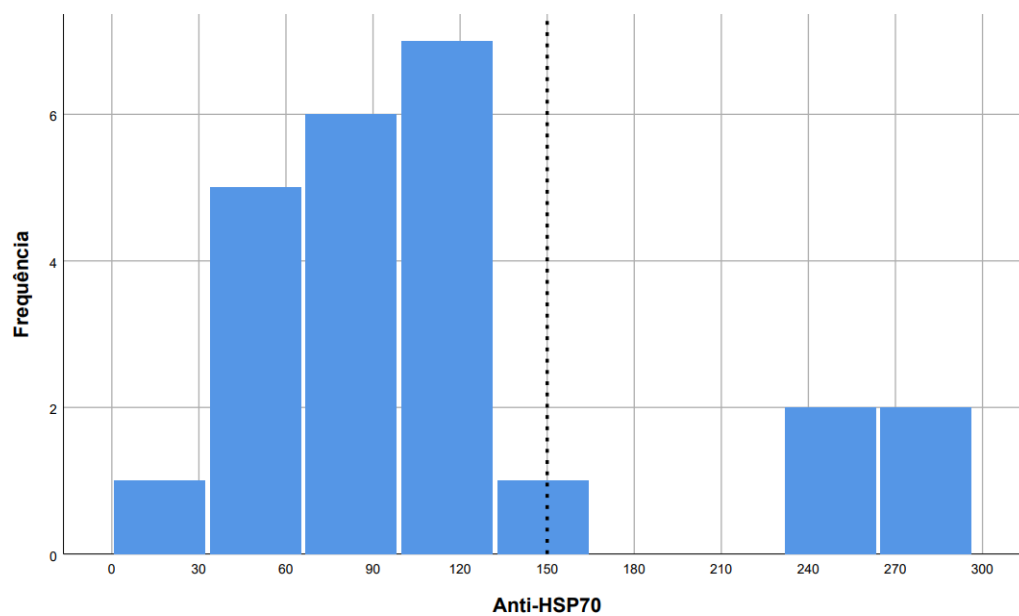
Os resultados dessa pesquisa favorecem ainda a hipótese de que o vitiligo é uma doença sistêmica e deve ser interpretada e tratada como tal.

APÊNDICES

Apêndice 1: Ensaio ELISA Anticorpo Anti-Hsp70: curva-padrão

<u>[ng/mL]</u>	<u>A1</u>	<u>A2</u>	<u>Média</u>
50	2,359	2,371	3,637029
25	1,647	1,538	2,009644
12,5	1,022	1,012	1,025608
6,25	0,588	0,507	0,405113
3,125	0,331	0,335	0,192161
1,56	0,161	0,154	0,062506
<u>0,78</u>	<u>0,117</u>	<u>0,108</u>	<u>0,037734</u>

Apêndice 2: Ensaio ELISA anticorpo anti-Hsp70 - controle ($n = 24$)



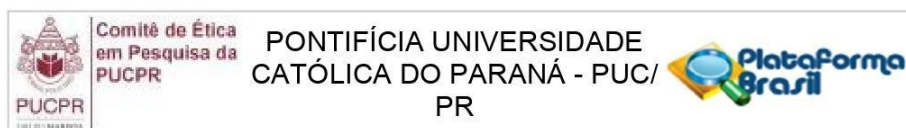
Apêndice 3. Lista de drogas potencialmente ototóxicas

Classe	Droga
Antibióticos	
Aminoglicosídeos	Neomicina Gentamicina Tobramicina Canamicina
Glicopeptídeos	Vancomicina
Macrolídeos	Eritromicina Azitromicina
Antimaláricos	Quinino
Quimioterápicos	Cisplatina Carboplatina Oxaliplatina
Diuréticos de Alça	Furosemida Torasemida Bumetanida
Anti-inflamatórios não esteroidais	Salicilatos

Adaptado de: Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen AA, Parfitt R, et al. Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(4):491-500. doi:10.1002/cpt.603

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HSP70 EM PORTADORES DE VITILIGO E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA AUTOIMUNE DO OUVIDO INTERNO

Pesquisador: HELENA ZENEDIN MARCHIORO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36235020.8.1001.0020

Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE CURITIBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.333.389

Apresentação do Projeto:

O presente estudo visa investigar pacientes de ambos os sexos e maiores de 18 anos, que tenham diagnóstico clínico de vitiligo, provenientes do ambulatório de vitiligo do serviço de dermatologia do hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. É um estudo transversal que em que os pacientes serão entrevistados para coleta dos dados demográficos, como sexo, idade, escolaridade, além das características individuais da doença, como tempo de duração, tratamentos prévios e tratamento atual, além da presença ou não de comorbidades. Posteriormente, os pacientes serão submetidos a exame físico dermatológico para avaliação do vitiligo em relação à localização das lesões e extensão da doença. Além disso, todos os indivíduos participantes realizarão um exame de audiometria para screening de hipoacusia neurossensorial. Por fim, os pacientes serão submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para análise da HSP70.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a prevalência de anticorpos anti-HSP70 em pacientes com diagnóstico de vitiligo não segmentar (VNS).

Objetivo Secundário: Avaliar a prevalência de doença imuno-mediada do ouvido interno em pacientes com vitiligo não segmentar.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

Continuação do Parecer: 4.333.389

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para os participantes do estudo serão aqueles relacionados à coleta de amostra de sangue periférico: dor e formação de hematoma no local da punção venosa. Benefícios: Não haverá benefício direto ao paciente. Entretanto, esse estudo poderá evidenciar uma nova ferramenta no diagnóstico de vitiligo. Além disso, a dosagem de anticorpos anti-HSP70 em portadores de vitiligo, caso nossa hipótese se confirme, poderá servir como uma ferramenta a mais para o rastreio precoce de hipoacusia neurossensorial autoimune.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse estudo possui relevância social e científica. Tem um desenho relativamente simples e adota todos os itens metodológicos para atender os objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados conforme sugerido na primeira versão e estão de acordo com as diretrizes do CEP/CONEP

Recomendações:

Como sugestão, deve incluir o número de pacientes a serem investigados e a forma de recrutamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando o exposto acima e que os pesquisadores acrescentaram todas as pendências solicitadas pelo CEP e não havendo pendências adicionais, esse estudo está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê.

Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155				
Bairro: Prado Velho	CEP: 80.215-901			
UF: PR	Município: CURITIBA			
Telefone: (41)3271-2103	Fax: (41)3271-2103	E-mail: nep@pucpr.br		

Continuação do Parecer: 4.333.389

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1591529.pdf	24/09/2020 17:45:55		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCUD.pdf	24/09/2020 17:45:29	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_proponente.pdf	24/09/2020 17:45:07	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito
Declaração de concordância	Declaracao_Unesp.pdf	24/09/2020 17:43:23	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/09/2020 21:24:30	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	06/08/2020 09:21:09	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/08/2020 18:58:48	HELENA ZENEDIN MARCHIORO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 12 de Outubro de 2020

**Assinado por:
Ana Carla Efig
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

Anexo 2 : Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

Convido o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HSP70 EM PORTADORES DE VITILIGO E ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA AUTOIMUNE DO OUVIDO INTERNO”, que será desenvolvido por mim, Helena Zenedin Marchioro, médica dermatologista, com orientação do profissional médico e professor (a) Dr. Hélio Amante Miot, da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

Estou estudando a doença VITILIGO. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar 10ml do seu sangue, para que seja realizado o seguinte exame: pesquisa e dosagem de anticorpos anti-HSP70. Os riscos relacionados a esse procedimento podem ocorrer durante ou após a coleta e incluem: dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele) e, em alguns casos, desmaios. Pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha, embora raro de acontecer. Assepsia adequada e sistematizada antes da coleta será realizada para prevenir infecções. Qualquer intercorrência será prontamente atendida pela médica pesquisadora e pela equipe do hospital.

Informo que o material biológico colhido do Senhor(a), não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada na Faculdade de Medicina. Para reutilização desse material, será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que o Senhor (a) assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como dados referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a).

Além disso, o (a) Senhor (a) responderá um questionário que levará uns 10 minutos de duração. Depois, realizaremos um exame dermatológico, o qual também terá duração de cerca de 10 minutos.

Depois, o Senhor (a) realizará um exame chamado audiometria por um (a) profissional fonoaudiólogo (a), o qual será agendado. Esse exame serve para detectar deficiências na audição, sendo um método não invasivo, que não traz riscos à sua saúde.

Outros riscos relacionados à sua participação nessa pesquisa são: cansaço ou aborrecimento ao responder questionários; constrangimento ao realizar exames.

Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados dos participantes da pesquisa e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo, mas sempre existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntária e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas.

Os resultados desse estudo não trarão um benefício direto e imediato aos seus participantes individualmente. Seu benefício em participar será: contribuir para o desenvolvimento de um possível método diagnóstico para a doença “vitiligo”, além de ajudar a comunidade médica a compreender melhor a relação existente entre “vitiligo” e “doença autoimune do ouvido interno”, colaborando assim para o desenvolvimento futuro de métodos diagnósticos e terapêuticos dessas duas doenças.

Não haverá remuneração aos participantes.

Não haverá custos para os participantes em relação às consultas e exames realizados para esse estudo. Em qualquer etapa do estudo, o Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e

gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário, pela equipe de pesquisa. Assim como é garantido o direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, custos com o tratamento e transporte.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO em participar de forma voluntária. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas.

Curitiba, ____ / ____ / ____

Participante da Pesquisa

Pesquisador (Helena Zenedin Marchioro)

Nome

Assinatura

Contatos:

Helena Zenedin Marchioro: helena.marchioro@unesp.br (41) 3222-0842

Caio Cesar Silva de Castro: caio.castro@pucpr.br (41) 3222-0842

Hélio Amante Miot: heliomiot@fmb.unesp.br (14) 3880-1001

Anexo 3. Formulário de dados clínicos e demográficos

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-HSP70 EM PORTADORES DE VITILIGO E ASSOCIAÇÃO COM
DOENÇA AUTOIMUNE DO OUVIDO INTERNO

Formulário individual do paciente participante da pesquisa

Responsável pela pesquisa: Dra Helena Zenedin Marchioro

Data de inclusão: ____ / ____ / ____

Nome: _____

Nome da Mãe: _____

Prontuário: _____

Ano de Nascimento: _____ Sexo: F () M ()

Telefones de contato: () _____ () _____

Escolaridade: _____

Peso: _____ kg Altura: _____ m

Idade em que iniciou vitiligo: _____ anos

Tratamentos já realizados:

() corticoide tópico () tacrolimus tópico () pimecrolimus tópico

() corticoide sistêmico () fototerapia (PUVA / NB-UVB / UVB banda larga)

() outro imunossupressor sistêmico (qual?) _____

Tratamento atual:

() corticoide tópico () tacrolimus tópico () pimecrolimus tópico

() corticoide sistêmico () fototerapia (PUVA / NB-UVB / UVB banda larga)

() outro imunossupressor sistêmico (qual?) _____

No dia de hoje, a doença está:

() estável – 1 ano sem aumento () em progressão () em regressão

Possui alguma doença autoimune do tecido conjuntivo? () sim () não

Se sim, qual? () Lupus Eritematoso Sistêmico () Artrite Reumatoide

() Sd de Sjögren () Vasculite () Esclerodermia Sistêmica

() Outra _____

Possui outras comorbidades?

() HAS () DM () Hipercolesterolemia () Hipertrigliceridemia

() Depressão () Transtorno de ansiedade () Hipo / Hipertireoidismo

Outras? Se sim, quais:

Medicações de uso contínuo:

Possui histórico pessoal de malignidades? () Sim () Não

Se sim, qual? _____

Ano do diagnóstico e tratamento _____

Possui quadro hipoacusia? () Sim () Não

- Se sim:

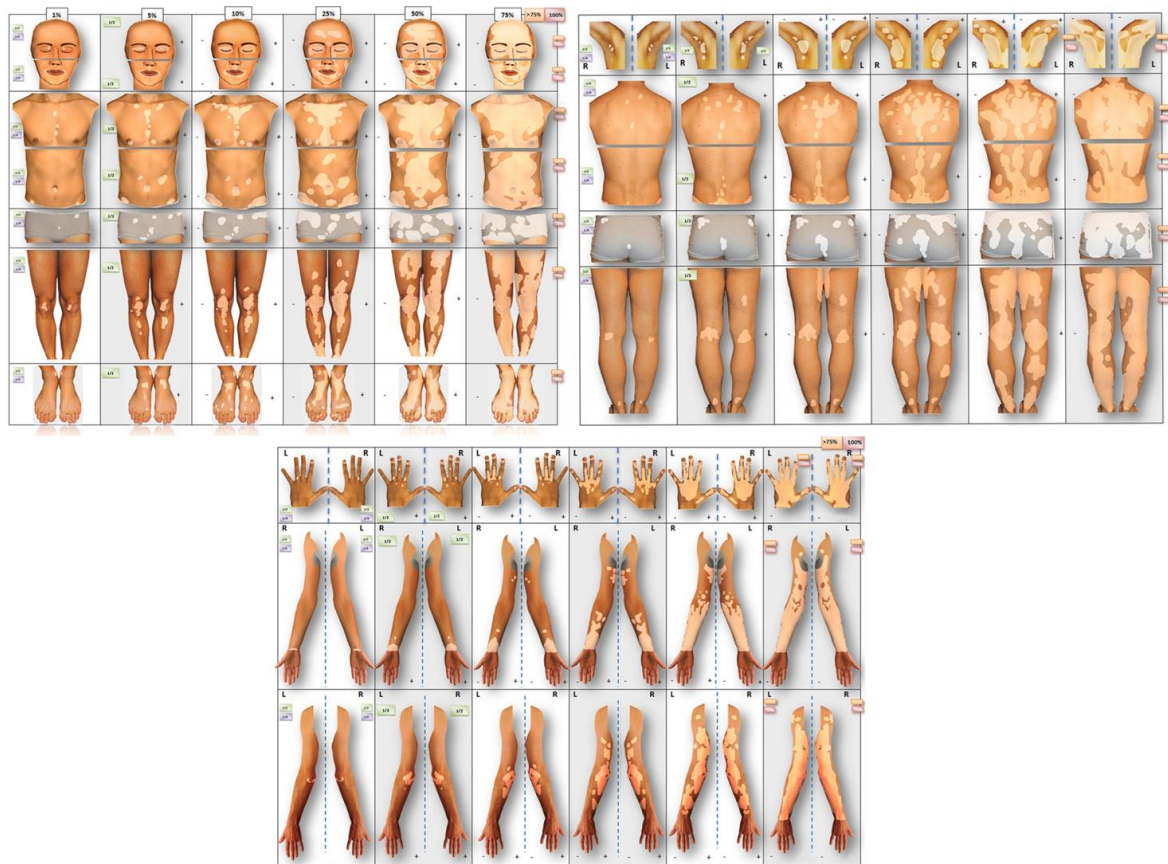
Já foi avaliado por otorrino? Tem diagnóstico do quadro otológico?

Se apresenta quadro de hipoacusia, mas ainda não foi avaliado, caracterizar: uni ou bilateral, tempo de evolução, histórico de exposição ocupacional a ruídos, outros sintomas otológicos associados (zumbido, vertigem).

Exame Físico:

Extensão do Vitiligo (Escala VES): _____

Anexo 4. Vitiligo Extent Score (VES)



Copyright © 2015 Nanja van Geel, Reinhart Speeckaert. All rights reserved.

van Geel N, et al. Development and Validation of the Vitiligo Extent Score (VES): an International Collaborative Initiative. J Invest Dermatol 2016;136:978–84

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

1. Artigo publicado no *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (<https://doi.org/10.1111/jdv.18375>)

LETTER TO THE EDITOR

Moving forward from hearing loss in vitiligo – Does autoimmune sensorineural hearing loss play a role?

Dear Editor,

As non-segmental vitiligo is associated with multiple autoimmune comorbidities (e.g. thyroid diseases, alopecia areata, pernicious anaemia and type 1 diabetes),¹ we read with interest the publication by Lien *et al.* that pooled nine case-control studies (371 vitiligo patients) and concluded vitiligo is consistently associated with high-frequency (>2000 Hz) sensorineural hearing loss (SNHL).² We would like to commend the authors, bring additional data and highlight other hypotheses to this pertinent discussion.

SNHL, the primary cause of hearing impairment, is a common outcome of neurologic or cochlear damage caused by drugs, infectious diseases, genetic disorders, ageing, trauma, diabetes, occupational noise exposure and autoimmune injury. These aetiologies are heterogeneous regarding age groups, disease presentation (time of onset and intensity) and previous risk factors, and they can present different audiometric patterns.³

Several authors have noted the higher prevalence of SNHL in vitiligo; however, it is highly heterogeneous among the studies (ranging from 1% to 77%), which may be due to the different audiometric criteria used and the inclusion of patients in several age groups.^{2,4} Additionally, the lack of detailed clinical and aetiological investigation hinders the imputation of autoimmunity as a pathogenetic model of SNHL in these patients.

To reinforce these results and to provide original data from Latin America, we assessed the prevalence of SNHL in non-segmental vitiligo through an audiometric investigation in a Brazilian sample from Curitiba-PR, recruited from November 2020 to January 2022. Adult patients with non-segmental vitiligo were included in this study. The main outcome was the presence of bilateral SNHL, defined as bone conduction thresholds greater than 15 dB and airway thresholds greater than 25 dB, with an air-bone gap of up to 10 dB. The clinical and demographic characteristics from patients without hypoacusis were compared with those with possible explained hearing loss, and those with SNHL with indetermined aetiology.⁵

One hundred five adult patients (aged 19–64 years) with non-segmental vitiligo were included in the study; their detailed clinical, demographic and audiometric information is summarized in Table 1.

Reinforcing the results from Lien *et al.*, the prevalence of SNHL in the vitiligo patients was 37.1% (CI 95% 28.6–43.8%), twofold higher than expected in the Brazilian adult population (16.5%; $P < 0.01$ – Monte Carlo simulation chi-squared for adherence). All these cases presented audiometric damage at frequencies higher than 2000 Hz.² When excluding cases in which SNHL could be explained by known factors, such as noise exposure, ototoxic drugs, diabetes mellitus, trauma, previous ear infections and unilateral cases of SNHL, there were 17 (16.2%; CI 95% 9.5–21.9%) cases of SNHL with indetermined aetiology. The patients who evidenced hypoacusis were addressed to the otorhinolaryngology consultation, and all the SNHL diagnosed were identified on frequencies higher than 2000 Hz.

Notably, these indeterminate SNHL patients have a different disease profile compared with the other SNHL cases (Table 2), characterized by younger age and earlier disease onset. These findings suggest the existence of an independent subgroup of SNHL patients with vitiligo, whose pathogenetic link between these diseases is currently unknown. Since melanocytes are present in the cochlea, the systemic autoimmunity and oxidative

Table 1 Main clinical, demographic and audiometric data for adult patients with non-segmental vitiligo ($n = 105$)

Variables	Values
Sex, n (%)	
Female	70 (66%)
Male	35 (33%)
Age (years), mean (SD)	46.6 (11.0)
BMI (kg/m ²), mean (SD)	26.8 (4.7)
Age of onset (years), mean (SD)	32.7 (16.3)
Disease length (years), mean (SD)	14.6 (13.0)
VES, median (p25–p75)	1.6 (0.5–4.2)
Vitiligo activity, n (%)	
Stable (≥ 1 year)*	15 (12%)
In progression (new lesions)*	77 (74%)
In regression (repigmentation)*	13 (14%)
Thyroid disease, n (%)†	27 (26%)
Diabetes mellitus (type 1 or 2), n (%)	11 (10%)
Result from audiometry, n (%)	
Normal	60 (57%)
SNHL unilateral	11 (10%)
SNHL bilateral	28 (27%)
Mixed type	6 (6%)

BMI, body mass index; VES, Vitiligo Extent Score; SNHL, sensorineural hearing loss.

*Self-reported by the patient.

†Hashimoto or Graves' disease.

Table 2 Comparison of the main characteristics among 105 patients with non-segmental vitiligo according to the pattern of audiometric results

Variables	Normal audiometry	Explainable cause of hearing loss*	SNHL with indetermined aetiology	P-value†
<i>n</i>	60	28	17	
Sex, <i>n</i> %				
Female	41 (68%)	19 (68%)	10 (59%)	0.808¶
Male	19 (32%)	9 (32%)	7 (41%)	
Age (years), mean (SD)	43.1 (10.6)	55.2 (7.2)††	47.0 (12.5)	<0.001**
BMI (kg/m ²), mean (SD)	26.8 (5.3)	27.4 (3.3)	25.6 (3.3)	0.459**
Age of onset (years), mean (SD)	27.7 (15.1)	45.6 (13.1)††	33.3 (17.8)	<0.001**
VES, median (p25–p75)	1.6 (0.5–3.8)	2.0 (0.9–8.3)	0.7 (0.3–2.3)	0.258**
Vitiligo activity, <i>n</i> (%)				0.341¶
Stable (≥1 year)‡	7 (12%)	3 (11%)	5 (29%)	
In progression (new lesions)‡	44 (73%)	23 (82%)	10 (59%)	
In regression (repigmentation)‡	9 (15%)	2 (7%)	2 (12%)	
Thyroid disease, <i>n</i> (%)§	13 (22%)	8 (29%)	6 (35%)	0.452¶
Diabetes mellitus (type 1 or 2), <i>n</i> (%)	1 (2%)	10 (36%)††	0 (–)	<0.001¶

*Occupational exposure to noise, infectious diseases, metabolic diseases, use of ototoxic drugs or trauma.

†Bivariate analysis.

‡Self-reported by the patient.

§Hashimoto or Graves' disease.

¶*quasi*-exact chi-squared test (Monte Carlo 10 000 simulations);

***quasi*-exact Kruskal–Wallis test (Monte Carlo 10 000 simulations).

††*P* < 0.05 (*post hoc* analysis) in comparison with 'SNHL with indetermined aetiology'.

BMI, body mass index; SNHL, sensorineural hearing loss; VES, Vitiligo Extent Score.

injuries promoted by vitiligo can justify a model of inner ear damage.^{6,7} Actually, SNHL was reported in vitiligo patients with the syndromes of Vogt-Koyanagi-Harada and Waardenburg.^{8,9}

Autoimmune sensorineural hearing loss (ASNHL), or autoimmune inner ear disease, is a rare progressive (months to years) deterioration of auditory function that usually affects adults. It is associated with other autoimmune disorders (e.g. rheumatoid arthritis, thyroid disease, lupus, scleroderma and Sjögren's syndrome) and the presence of autoantibodies (anti-Hsp70), and it favourably responds to immunosuppressant drugs.^{10–12} The estimated prevalence of ASNHL in the population is 0.015%; however, it is probably underdiagnosed due to the stringency of the diagnostic criteria, which include anti-Hsp70 autoantibodies, reduced number of naïve T cells (CD4RA) and a favourable response to immunosuppressive therapy.⁷ To date, vitiligo has not yet been explored as a probable autoimmune disorder associated with ASNHL, nor the prevalence of anti-Hsp70 is known among patients with vitiligo.

This study has some limitations related to the fact that the sample came from a Southern municipality and may not represent the general population, and that using the general population as a control group is limited because of it is average older age than the study population, especially because ageing is a well-known cause of SNHL.

We believe it is time to conduct further studies exploring the pathogenesis of SNHL associated with vitiligo, especially searching for autoimmune pathways involved in the cochlear damage. The

investigation of genetic and serologic markers of risk for ASNHL (e.g. anti-Hsp70), as well as its remission after systemic treatment of vitiligo (e.g. corticosteroids and JAK inhibitors), is warranted.

Acknowledgement

The patients in this manuscript have given written informed consent to publication of their data.

Conflict of interest

None.

Funding source

None.

IRB status

This study was approved by the PUC PR IRB (number 4.333.389).

Data availability statement

Data is available under contact with the authors.

H.Z. Marchioro,¹ A.S.T. Chiesorin,¹ E.C.W. Bindi,¹
C.C. Silva de Castro,¹  H.A. Miot^{2,*} 

¹Santa Casa de Misericórdia – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Puerto Rico, Brazil, ²Departamento de Dermatologia da FMB-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

*Correspondence: H.A. Miot. E-mail: heliomiot@gmail.com

References

- 1 Marchioro HZ, Castro CCS, Fava VM, Sakiyama PH, Dellatorre G, Miot HA. Update on the pathogenesis of vitiligo. *An Bras Dermatol* 2022; **97**: 478–490.
- 2 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**: 373–379.
- 3 Curhan G, Curhan S. Epidemiology of Hearing Impairment. Hearing Aids. Springer, Switzerland, 2016: 21–58.
- 4 Ma SH, Ang MD, Chang YT, Dai YX. Association between vitiligo and hearing loss. *J Am Acad Dermatol* 2021; **85**: 1465–1472.
- 5 Miola AC, Miot HA. Comparing categorical variables in clinical and experimental studies. *J Vasc Brasileiro* 2022; **21**: e20210225.
- 6 Goodall AF, Siddiq MA. Current understanding of the pathogenesis of autoimmune inner ear disease: a review. *Clin Otolaryngol* 2015; **40**: 412–419.
- 7 Tebo AE, Szankasi P, Hillman TA, Litwin CM, Hill HR. Antibody reactivity to heat shock protein 70 and inner ear-specific proteins in patients with idiopathic sensorineural hearing loss. *Clin Exp Immunol* 2006; **146**: 427–432.
- 8 Noguchi Y, Nishio A, Takase H *et al.* Audiovestibular findings in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Acta Otolaryngol* 2014; **134**: 339–344.
- 9 Song J, Feng Y, Acke FR, Coucke P, Vleminckx K, Dhooze JJ. Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review. *Clin Genet* 2016; **89**: 416–425.
- 10 Ribeiro R, Serodio JF, Amaral MC *et al.* Sensorineural hearing loss and systemic autoimmune disease: the experience of a systemic immune-mediated diseases unit. *Cureus* 2021; **13**: e14075.
- 11 Lee JM, Kim JY, Bok J, Kim KS, Choi JY, Kim SH. Identification of evidence for autoimmune pathology of bilateral sudden sensorineural hearing loss using proteomic analysis. *Clin Immunol* 2017; **183**: 24–35.
- 12 Mijovic T, Zeitouni A, Colmegna I. Autoimmune sensorineural hearing loss: the otology-rheumatology interface. *Rheumatology (Oxford)* 2013; **52**: 780–789.

DOI: 10.1111/jdv.18375

2. Artigo submetido aos Anais Brasileiros de Dermatologia (*status = under review*)

Tipo de artigo = Carta / Investigação

Título: Avaliação do Hsp70 plasmático em adultos portadores de vitiligo não-segmentar.

Título curto: Avaliação do Hsp70 plasmático em adultos portadores de vitiligo não-segmentar.

Autores:

Helena Zenedin Marchioro (1)

Dermatologista, M.D., Departamento de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

helenamarchioro@yahoo.com.br

ORCID: 0000-0002-2756-053X

Caio César Silva de Castro (1,2)

Dermatologista, PhD, Professor Associado, Departamento de Dermatologia, PUC-PR, e Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.

caio.castro@pucpr.br

ORCID: 0000-0001-9767-5765

Hélio Amante Miot (3)

Dermatologista, M.D.; PhD, Professor Associado, Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

heliomiot@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2596-9294

Instituições:

1. Departamento de Dermatologia, Hospital Santa Casa de Curitiba, PR, Brasil.
2. Departamento de Dermatologia, Pontifícia Universidade Católica do PR, Curitiba, PR, Brasil.
3. Departamento de Dermatologia e Radioterapia, FMB-Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

Autor para correspondência:

Helena Zenedin Marchioro

Dermatologista pela Sociedade Brasileira de Dermatologia, preceptora da Residência de dermatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba.

Rua André de Barros, 226, sala 1211. Centro. Curitiba, PR, Brasil

Email: helenamarchioro@yahoo.com.br

Fone: (41) 3222-0842

Contribuição de autoria:

HZM: Concepção do estudo; coleta dos dados; análise dos resultados; escrita do texto; revisão e aprovação do texto final.

CCSC: Concepção do estudo; análise dos resultados; escrita do texto; revisão e aprovação do texto final.

HAM: concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados; análise estatística; redação do artigo; revisão crítica de literatura; revisão crítica do manuscrito; aprovação da versão final do manuscrito.

Conflito de interesses:

HZM: nenhum

Silva de Castro, C.C.: Ache – speaker, advisory board; Sun pharma – advisory board; Abbvie – advisory board; Pfizer – clinical trial

HAM: nenhum

Financiamento: FUNADERM

Título: Associação entre características clínicas e níveis plasmáticos de Hsp70 em adultos portadores de vitiligo não segmentar: um estudo transversal.

Prezado editor,

Vitiligo é doença autoimune sistêmica, caracterizada por despigmentação cutânea, que acomete 0,57% da população brasileira e corresponde a 1,6% dos atendimentos dermatológicos no Brasil.[1] Sua patogênese envolve predisposição genética, sensibilidade dos melanócitos ao estresse oxidativo, falhas na adesão intercelular nos melanócitos, e ativação da resposta imunológica, o que justifica a maior frequência de doenças autoimunes concomitantes.[2]

A proteína de choque térmico 70, ou *Heat Shock Protein 70* (Hsp70), é molécula chave na resposta imune inata do vitiligo, constituindo uma chaperona intracelular, responsável pelo dobramento correto das proteínas no retículo endoplasmático e por impedir a agregação de proteínas mal dobradas. Ela existe naturalmente nos tecidos e pode ser induzida pelo estresse celular. Na fisiopatologia do vitiligo, após um gatilho inicial (radiação ultravioleta, trauma ou exposição a compostos fenólicos), o melanócito sofre um processo de estresse oxidativo, que induz a síntese da Hsp70. A partir disso, Hsp70 é secretada para o meio extracelular levando à ativação de células dendríticas, que se transformam em células apresentadoras de antígenos, estas que ativam os linfócitos T, dando início à resposta imune adaptativa. Portanto, Hsp70 é considerada um elo entre as respostas imunes inata e adaptativa, no vitiligo.[3] Estudos em modelos animais demonstraram que Hsp70 não só é necessária como também suficiente para desencadear a despigmentação em camundongos predispostos a vitiligo.[4]

Enquanto os níveis teciduais da Hsp70 são aumentados no vitiligo em atividade, não há estudos que tenham investigado os níveis circulantes da proteína nesses pacientes.[5]

Conduziu-se estudo transversal em Curitiba-PR (Brasil), entre novembro de 2020 a fevereiro de 2022, objetivando determinar os níveis plasmáticos de Hsp70 em adultos com vitiligo não segmentar não submetidos a imunossupressão, nem portadores de outras doenças reumatológicas, câncer ou doença inflamatória intestinal (DII), para não haver confundimento dos níveis de Hsp70 por mediadores inflamatórios. Coletaram-se dados clínicos e amostras de sangue periférico dos participantes, durante a consulta. Utilizou-se o kit Hsp70 ELISA (ADI-EKS-700B, *Enzo Life Sciences, New York, USA*) para estimativa do Hsp70 circulante. Os valores obtidos foram comparados entre os subgrupos quanto à atividade da doença: estável (>1 ano), progressão, e regressão (em repigmentação); assim como em relação à extensão clínica (*Vitiligo Extent Score – VES*).[6]

Foram incluídos no estudo 89 participantes, os seus principais dados clínicos e demográficos estão dispostos na tabela 1. A maior parte dos indivíduos estava com a doença em progressão, havendo ampla variabilidade da extensão clínica da doença (VES variou de 0,04 a 71,06), e dos níveis plasmáticos de Hsp70 (variaram de 1,82 a 27,8).

Não houve correlação direta entre os níveis de Hsp70 e VES ($\rho=0,08$; $p=0,461$), nem nas diferentes formas de atividade da doença. Assim como Hsp70 e tempo de doença, IMC, idade, fototipo ($\rho<0,16$; $p>0,1$).

Quando considerado o valor de corte da normalidade para Hsp70 como 2,8 ng/mL, 76,9% dos vitiligos em regressão apresentaram valores alterados, enquanto que isso ocorreu em apenas 35,7% dos estáveis e 37,1% dos em progressão ($p=0,028$). Esse comportamento se comprovou mesmo quando ajustado por sexo, idade, extensão da doença e fototipo (Tabela 2).

Valores alterados de Hsp70 não se associaram com as comorbidades avaliadas ($p>0,40$). Entre os tratamentos atuais, corticosteroides orais, metotrexato e PUVA não se associaram a Hsp70 ($p>0,20$), porém, os participantes sob fototerapia Nb-UVB mostraram maior frequência de positividade para Hsp70: 71% vs. 36% (OR 4,2; IC 95% 1,3–13,4; $p=0,010$).

Embora alguns estudos tenham demonstrado aumento da Hsp70 tecidual na pele lesional e perilesional de vitiligo em atividade, até o momento ainda não haviam sido avaliados os níveis plasmáticos dessa proteína nos portadores da doença, tampouco tentado correlacioná-lo com a atividade da doença. [5] Em nossa pesquisa, não encontramos correlação entre níveis plasmáticos de Hsp70 e extensão da doença, porém, a positividade do Hsp70 se associou às formas regressivas de vitiligo.

Esse achado sugere não haver alinhamento entre o comportamento da Hsp70 plasmática e sua expressão tecidual da Hsp70, limitando seu uso como marcador direto de gravidade da doença. De fato, outras dermatoses inflamatórias como psoríase e dermatite atópica também não apresentam forte correlação entre marcadores plasmáticos e a extensão da doença. Até o momento, não há estudos em vitiligo no qual, em um mesmo indivíduo, tenha-se dosado a Hsp70 plasmática e estimado a concentração de Hsp70 tecidual da pele afetada.

Deve-se, porém, considerar que a Hsp70 possa desempenhar funções diferentes de acordo com a fase da doença. Por exemplo, na artrite reumatoide, diferentes estudos mostraram papéis contraditórios da Hsp70, ou seja, tanto na promoção da inflamação, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, quanto na sua modulação, estimulando a formação de células T reguladoras (Tregs) e interrompendo a atividade da doença. [7] Nas doenças inflamatórias intestinais (DII), existem evidências de que a Hsp70 tenha sua expressão aumentada na mucosa intestinal, mas a maioria dos estudos apontam para um papel protetor, em que o aumento local da Hsp70 se associou à redução da atividade da doença, em modelos experimentais.[8,9] Ademais, foi demonstrado um papel importante da Hsp70 na supressão da resposta imunológica através da formação de células B reguladoras (Bregs), em um estudo experimental que utilizou modelos animais de tireoidite autoimune e DII.[10]

O modelo fisiopatológico do vitiligo é complexo. A disfunção das células T reguladoras (Tregs) é uma das vias de manutenção da autoimunidade no vitiligo. Porém, se existe algum papel das células Bregs no vitiligo e se a Hsp70 circulante participa dessa modulação, ainda não está elucidado.

Indivíduos em tratamento com Nb-UVB apresentaram maior positividade de Hsp70. A associação entre a exposição UVB, níveis de vitamina D, estresse oxidativo induzido pela fototerapia e os níveis plasmáticos de Hsp70 devem ser explorados com desenhos adequados.

Este estudo apresenta limitações ligadas à falta da constatação da expressão da Hsp70 tecidual nos participantes. Investigações posteriores que explorem os níveis de Hsp70 plasmáticos e os mecanismos de tolerância imunológica em diferentes fases de atividade da doença são necessárias para esclarecer o papel da Hsp70 circulante no vitiligo.

Em conclusão, os níveis plasmáticos de Hsp70 não se correlacionaram diretamente com a extensão do vitiligo, entretanto, maior positividade foi identificada em participantes com formas regressivas da doença.

Tabela 1. Principais dados clínicos e demográficos dos pacientes adultos com vitiligo não segmentar (n = 89)

Variáveis	Valores	
Sexo, n (%)		
Masculino	30	33,7%
Feminino	59	66,3%
Idade (anos), média (dp)	48,8	10,6
Fototipo, n (%)		
I e II	22	24,7%
III	40	44,9%
IV e V	27	30,3%
Escolaridade, n (%)		
Fundamental	23	25,8%
Médio	29	32,6%
Superior	37	41,6%
IMC (kg/m ²), média (dp)	27,1	4,6
Comorbidades, n (%)		
Hipertensão arterial	18	20,2%
Diabetes	8	9,0%
Doença tireoideana	20	22,5%
Depressão	17	19,1%
Ansiedade	24	27,0%
Dislipidemia	12	13,5%
Idade de início do vitiligo, mediana (DIQ)	38	15,8
Tempo de doença (anos), média (dp)	10	14
Tratamentos atuais, n (%)		
Corticoide tópico	12	13,5%
Inibidor de calcineurina tópico	42	47,2%
PUVA	15	16,9%
NB-UVB	17	19,1%
Atividade da doença, n (%)		
Regressão	13	14,6%
Estável	14	15,7%
Progressão	62	69,7%
VES, mediana (DIQ)	1,5	4,3
Hsp70 (ng/mL), mediana (DIQ)	2,6	1,4
Hsp70 >2,8 ng/mL, n (%)	38	43%

VES: *Vitiligo Extent Score*; IMC: Índice de massa corporal;
dp = desvio-padrão; DIQ: desvio interquartilico

Tabela 2. Modelo logístico multivariado da associação entre valores plasmáticos elevados de Hsp70 (>2,8 ng/mL) com dados clínicos e demográficos de pacientes adultos com vitiligo não segmentar (n = 89).

Variável	Frequência	Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
Sexo (masculino)	30 (34%)	1,40 (0,51–3,82)	0,513
Idade (>50 anos)	43 (48%)	1,23 (0,50–3,02)	0,650
Fototipo			0,370
I e II	22 (25%)	1 (-)	
III	40 (45%)	1,38 (0,42–4,53)	
IV e V	27 (30%)	2,04 (0,60–6,94)	
VES (>3)	28 (32%)	1,36 (0,49–3,77)	0,550
Atividade da doença			0,026
Regressão	13 (15%)	1 (-)	
Estável	14 (16%)	0,17 (0,03–0,94)	
Progressão	62 (39%)	0,16 (0,04–0,69)	

VES: *Vitiligo Extent Score*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

