



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO BASEADO EM FAMÍLIAS PARA INVESTIGAÇÃO
DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CDH1*, *NOV* e *IL1B*,
ENVOLVIDOS NA VIA DE ADESÃO DOS MELANÓCITOS NO VITILIGO**

ROBERTO GOMES TARLÉ

Curitiba
2014

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO BASEADO EM FAMÍLIAS PARA INVESTIGAÇÃO
DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CDH1*, *NOV* e *IL1B*,
ENVOLVIDOS NA VIA DE ADESÃO DOS MELANÓCITOS NO VITILIGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção de título de doutor

Orientador: Prof. Marcelo Távora Mira, PhD

Candidato: Roberto Gomes Tarlé, MD

Curitiba
2014

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

T188e
2014

Tarlé, Roberto Gomes

Estudo de associação baseado em famílias para investigação do papel de polimorfismos dos genes CDH1, NOV e IL1B, envolvidos na via de adesão dos melanócitos no vitiligo / Roberto Gomes Tarlé ; orientador, Marcelo Távora Mira. – 2014.
84 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2014
Bibliografia: f. 52-57

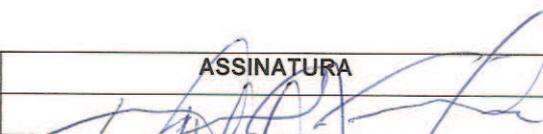
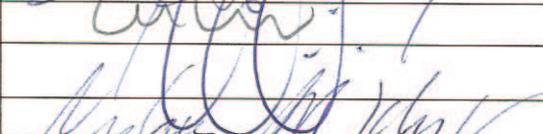
1. Polimorfismo (Genética). 2. Melanócitos. 3. Vitiligo. 4. Auto-imunidade.
I. Mira, Marcelo Távora. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 610

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Aos quinze dias do mês de dezembro de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de tese provisório: **“ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO BASEADO EM FAMÍLIAS PARA INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CDH1*, *NOV* e *IL1B*, ENVOLVIDOS NA VIA DE ADESÃO DOS MELANÓCITOS E VITILIGO”**, apresentado por **Roberto Gomes Tarle** para obtenção do título de doutor; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits-Filho (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado (PUCPR)	
Prof. Dr. Nicolaus Albert BorgesSchriefer (UFBA)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira (PUCPR) - Presidente Parecer: Aprovado

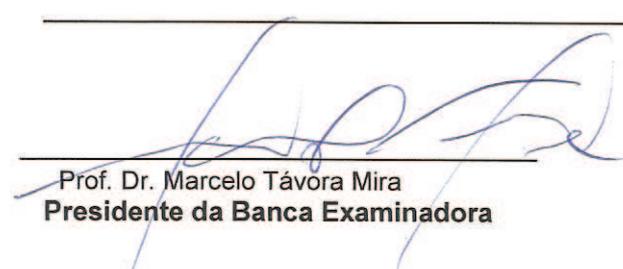
Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits-Filho (PUCPR) Parecer: Aprovado

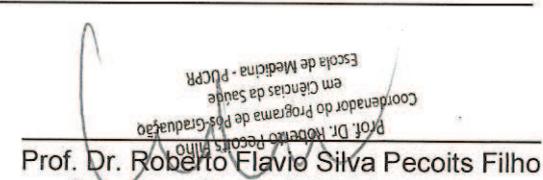
Prof. Dr. Cleber Machado (PUCPR) Parecer: Aprovado

Prof. Dr. Nicolaus Albert BorgesSchriefer (UFBA) Parecer: Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Presidente da Banca Examinadora


Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits-Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa Rafaela, minhas filhas Bruna e Lívia, pelo grande suporte nas diversas etapas da minha formação, a minha mãe leda por acompanhar tão atentamente a minha formação desde os primeiros passos e ao meu pai Sergio um exemplo e grande parceiro no exercício da medicina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Rafaela e minhas filhas Bruna e Livia, que compreenderam minha ausência em momentos que meu trabalho e estudo me chamaram e pelo apoio em momentos que precisei.

Ao meu pai, exemplo de médico que se preocupa com seus pacientes, que tem a ética inserida de forma natural em seus atos, professor na essência. A minha mãe que acompanhou minha formação desde cedo, estimulando sempre o desenvolvimento meu e de minhas irmãs, Denise e Isabella.

Ao meu amigo e orientador Marcelo Mira cientista *per se*, clareza para nos ensinar e surpreender, exemplo a ser seguido.

Ao meu amigo e colega Caio Castro pela oportunidade de compartilhar conhecimento, dermatologista pioneiro e grande suporte aos pacientes portadores de vitiligo.

Aos meus colegas do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de Curitiba, dedicados, voluntariamente, a ajudar o próximo, exercício contínuo de filantropia.

À Liliane Machado do Nascimento por auxiliar um médico de beira de leito a voltar para as bancadas de laboratório, à Geovana Brotto Ramos pela incansável contribuição nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório pela riqueza das discussões e contribuições contínuas que solidificaram minha formação.

Por fim agradeço aos pacientes envolvidos no estudo, que a ciência traga respostas, avanços e esperança àqueles que são o motivo de nossos esforços.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning.”

Albert Einstein

RESUMO

Vitiligo é uma doença crônica e adquirida da pigmentação cutânea, multifatorial e poligênica, caracterizada clinicamente por máculas e manchas acrômicas na pele e mucosa, podendo levar também à despigmentação de pelos, resultantes da ausência de melanócitos funcionais nas áreas acometidas. Diversas hipóteses tentam explicar o desenvolvimento da doença, entre elas a autocitotóxica, neural, autoimune e, mais atualmente, a melanocitorrágica, na qual uma agressão mecânica leva ao desprendimento do melanócito do tecido ao seu redor, com conseqüente eliminação transepidérmica do mesmo. Vários estudos têm demonstrado a importância da genética na suscetibilidade ao vitiligo, estudos de genética epidemiológica demonstrando associação do gene *DDR1* com a doença, bem como dados funcionais que evidenciam alterações na expressão imunistoquímica da molécula de adesão *DDR1* em pele de pacientes com vitiligo dão suporte à hipótese da melanocitorragia. O objetivo deste estudo foi investigar possível associação entre vitiligo e polimorfismos dos genes *CDH1*, *NOV* e *IL1B*, relacionado à via de adesão de melanócitos. A população estudada foi formada por 212 famílias nucleares compostas por indivíduos afetados com vitiligo e seus pais, procedentes dos estados de Santa Catarina e Paraná. Para replicar nossos achados uma amostra caso-controle independente foi utilizada em uma população composta por 131 casos e 119 controles pareados por idade, sexo e etnia. Nossos resultados mostram evidência de associação entre o vitiligo *per se* e o alelo T do marcador rs10431924 do gene *CDH1*. Não foi demonstrada associação com outros marcadores estudados. A análise caso-controle para o marcador rs10431924, detectou associação com significância estatística marginal. Uma análise combinada das duas populações confirmou a associação. Estratificação da amostra demonstrou concentração do sinal de associação para presença de autoimunidade nas análises de famílias e caso-controle. Estes dados sugerem que o gene *CDH1* pode apresentar um papel na suscetibilidade ao vitiligo, especialmente nos pacientes portadores de comorbidades autoimunes.

Palavras-Chave: Vitiligo, *CDH1*, *NOV*, *IL1B*, autoimunidade, polimorfismos

ABSTRACT

Vitiligo is an acquired depigmenting disorder characterized by chronic and progressive loss of functional melanocytes from the epidermis, resulting in achromic macules and patches of the skin, sometimes affecting the hair follicles. Theories have been proposed to explain the pathogenesis of vitiligo, among them the cytotoxic, neural, autoimmune and recently the melanocytotoxic, based on the hypothesis that the disease is caused by a defective adhesion of the melanocytes and that mechanical friction leads to detachment and transepidermal loss of pigment cells of the epidermis. The importance of a genetic factor in the susceptibility of vitiligo has been demonstrated, genetical epidemiologic studies reporting the association of the *DDR1* gene with the disease and functional studies showing different immunohistochemical expression of *DDR1* supports the melanocytotoxic hypothesis. The objective of this study was to investigate the association of polymorphisms of the genes *CDH1*, *NOV* and *IL1B*, involved in the melanocytes adhesion pathway. We studied a population sample of 212 family trios composed by affected individuals and their parents from the south of Brazil. To replicate our findings, we used an independent case–control population sample composed of 131 vitiligo patients and 119 control individuals fully matched by age, gender, and ethnicity. Our results show positive evidence of allelic association between vitiligo and the T allele of marker rs10431924 of *CDH1*. No evidence of association was observed for any of the additional markers tested. The independent, case-control analysis, performed only for rs10431924, also detected association, with borderline significance. A combined analysis using the cases from both samples and the controls from the case-control population confirmed association between rs10431924 and vitiligo. Stratified analysis revealed that the evidence for association between rs10431924 and vitiligo in the family-based sample was concentrated among the trios presenting autoimmune comorbidity, a finding again replicated in the case-control and the combined population. Our data suggest that the *CDH1* gene may play a role in the susceptibility to vitiligo, especially in the presence of autoimmune comorbidities.

Key words: Vitiligo, *CDH1*, *NOV*, *IL1B*, autoimmunity, polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo de interação entre as diversas hipóteses fisiopatogênicas e suscetibilidade genética.

Figura 2: Principais citocinas envolvidas na via de adesão dos melanócitos.
(Adaptado de Fukunaga-Kalabis, *M et al.*, 2008)

Figura 3: Padrão dos clusters alelo-específicos discriminados de acordo com a intensidade de fluorescência detectada no comprimento de onda dos fluoróforos VICTM e FAMTM.

Figura 4: Desenho do estudo

Figura 5: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *CDH1*.

Figura 6: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *NOV*.

Figura 7: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *IL1B*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do Vitiligo (adaptado de: Huggins, 2005).

Tabela 2: Genes estudados para vitiligo por diferentes métodos de genética epidemiológica

Tabela 3: Descrição dos antígenos HLA associados ao vitiligo em diferentes grupos étnicos.

Tabela 4: Genes associados ($P < 5 \times 10^{-8}$) ao vitiligo generalizado em estudos de associação genômica, que já foram replicados.

Tabela 5: Característica clínica dos indivíduos afetados com vitiligo na população estudada.

Tabela 6: Influência da variável idade na associação do polimorfismo do gene *IL1B* e vitiligo em modelo aditivo.

Tabela 7: Análise de associação dos SNPs dos genes *CDH1*, *NOV* e *IL1B*.

Tabela 8: Influência da variável idade na associação do polimorfismo do gene *IL1B* e vitiligo em modelo aditivo.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACE - Angiotensin I Converting Enzyme
AQP3 - Aquaporin 3
AIRE - Autoimmune Regulator
AIS1 - Autoimmunity Susceptibility Locus 1
BACH2 - Basic Leucine Zipper Transcription Factor 2
C1QTNF6 - C1q And Tumor Necrosis Factor Related Protein 6
CASP7 - Caspase 7, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CAT - Catalase
CCR6 - Chemokine (C-C Motif) Receptor 6
CD44 - CD44 molecule (Indian blood group)
CDH1 - Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin (Epithelial)
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
COMT - Catechol-O-Methyltransferase
CTLA-4 - Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
DDR1 - Discoidin Domain Receptor 1
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DOPA - Dioxifenilalanina
DDX6 - DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6
EDN1 - Endothelin 1
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ESR1 - Receptor do Estrógeno 1
FAMTM – Sonda marcada com fluoróforo denominado FAMTM
FAS - NF receptor superfamily member 6
FBAT – Teste de Associação Baseado em Família
FOXD3 - Forkhead box D3
GCH1 - GTP cyclohydrolase 1
GWAS - Genome Wide Association Studies
GZMB - Granzyme B (Granzyme 2, Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Serine Esterase 1
HLA - Antígenos Leucocitário Humano

IC - Intervalo de Confiança
IFIH1 - Interferon Induced With Helicase C Domain 1
IKZF4 - IKAROS family zinc finger 4 (Eos)
IL1B - Interleukin 1, Beta
IL1 β - Interleucina 1 β
IL2RA - Interleukin 2 Receptor, Alpha
IL2RB - Interleukin 2 Receptor, Beta
LD – Desequilíbrio de Ligação
LMP - Gene Que Codifica Polipeptídeo De Baixo Peso Molecular
LOD - Logaritmo das odds de ligação
LPP - LIM Domain Containing Preferred Translocation Partner In Lipoma
MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
MBL2 - Mannose Binding Lectin
MC1R - Melanocortin 1 Receptor
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MITF - Microphthalmia-Associated Transcription Factor
MYG1 - Melanocyte Proliferating Gene 1
NALP1 - NACHT leucine-rich repeat protein 1
NOV - Nephroblastoma Overexpressed Gene
Nrf2 - NF-E2 related factor 2
OCA2 - Oculocutaneous Albinism II
OR – Taxa de Risco (em inglês, Odds Ratio)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K - Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKB - Protein kinase B
PTPN22 - Lymphoid Protein Tyrosine Phosphatase
RERE - Arginine-Glutamic Acid Dipeptide (RE) Repeats
SBE - Single Base Extension
SH2B3 - SH2B adaptor protein 3
SLC29A3 - Solute Carrier Family 29 (Equilibrative Nucleoside Transporter), Member 3
SLA - Src-like-adaptor

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TAP - Gene Codifica Proteína De Processamento De Antígeno Com Transportador Associado
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDT – Teste de Desequilíbrio de Transmissão
TICAM1 - Toll-Like Receptor Adaptor Molecule 1
TNFA – Gene que codifica a citocina TNF α
TOB2 - Transducer Of ERBB2, 2
TYR - Tyrosinase
UBASH3A - Ubiquitin Associated And SH3 Domain Containing A
VDR - Vitamin D (1,25- Dihydroxyvitamin D3) Receptor
VICTM – Sonda marcada com fluoróforo denominado VICTM
XBP1 - X Box Protein 1

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO VITILIGO	14
1.2	HISTÓRICO	15
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS DO VITILIGO	16
1.4	CLASSIFICAÇÃO DO VITILIGO	16
1.5	HISTOPATOLOGIA DO VITILIGO	18
1.6	FISIOPATOGENIA DO VITILIGO	18
1.6.1	Hipótese autoimune	19
1.6.2	Hipótese autocitotóxica	20
1.6.3	Hipótese neural	20
1.6.4	Hipótese melanocitorrágica	21
1.7	GENÉTICA DE DOENÇAS COMPLEXAS	21
1.8	GENÉTICA DA SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO	23
1.8.1	Estudos de genética epidemiológica	23
1.8.2	Estudos de genes/regiões genômicas candidatos(as)	24
1.8.3	Estudos de genoma completo	26
1.9	GENES CANDIDATOS DO PRESENTE ESTUDO	29
1.9.1	Gene <i>CDH1</i>	30
1.9.2	Gene <i>NOV</i>	30
1.9.3	Gene <i>IL1B</i>	31
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MÉTODOS	33
4.1	POPULAÇÃO ESTUDADA	33
4.1.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	35
4.1.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	36
4.2	COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DO DNA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS	36
4.3	SELEÇÃO DE MARCADORES	36
4.4	ANÁLISE MOLECULAR	37
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.6	DESENHO DO ESTUDO	41
5	Artigo publicado no periódico <i>experimental dermatology</i>	42
6	RESULTADOS complementares	45

6.1	Gene <i>CDH1</i>	45
6.2	Gene <i>NOV</i>	46
6.3	Gene <i>IL1B</i>	47
7	DISCUSSÃO COMPLEMENTAR.....	48
8	Conclusões.....	51
9	REFERÊNCIAS	52
10	Anexo	58
10.1	ANEXO 1 – Termo De Consentimento Livre e esclarecido	58
10.2	ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	65
10.3	ANEXO 3 – Artigos de revisão publicado no periódico Anais Brasileiro de Dermatologia	66
10.4	ANEXO 4 – Artigos de revisão publicado no periódico Anais Brasileiro de Dermatologia	77
10.5	ANEXO 5 – Tabela da Influência das variáveis na associação do polimorfismo do genes estudados e vitiligo na população de trios.	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO VITILIGO

Vitiligo é um distúrbio crônico e adquirido da pigmentação cutânea, caracterizado clinicamente pelo desenvolvimento de máculas ou manchas acrômicas na pele, de tamanhos variados e despigmentação de pelos. Trata-se de uma dermatose com impacto significativo na qualidade de vida (1). Melanócitos das leptomeninges, epitélio pigmentar retiniano, trato úveal e ouvido interno também podem ser acometidos (2).

O vitiligo acomete igualmente os sexos, podendo se manifestar em qualquer idade. Em um estudo realizado no sul do Brasil, a idade média de início do vitiligo foi de 13 anos na forma segmentar, 22 anos na forma vulgar e 28,5 anos na forma acrofacial (3). A prevalência do vitiligo, de acordo com a população estudada, pode variar de 0,4% (4) a 1,8% (5).

O vitiligo é aceito como uma doença de base autoimune, o achado de anticorpos anti-melanócitos e a presença de resposta imune celular contra os melanócitos apoiam este mecanismo fisiopatogênico. Estudos epidemiológicos mostram associação de outras doenças autoimunes com vitiligo. Um estudo mostrou uma incidência de 19,4% de tireoidite autoimune em portadores de vitiligo caucasianos, sendo que na população normal sua incidência é de 2,39%. Outras comorbidades autoimunes também tiveram sua incidência elevada, como anemia perniciosa, doença de Addison, lúpus eritematoso e doenças inflamatória intestinais (Doença de Crohn e colite ulcerativa) (6). Em uma população chinesa, demonstrou-se uma incidência de 7,77% de doença autoimune associada ao vitiligo, menor, portanto, que a observada em caucasianos; o que coincide com observação independente de que chineses têm menor incidência de doença inflamatória intestinal quando comparada aos caucasianos (7).

1.2 HISTÓRICO

O termo vitiligo deriva do latim *vitium*, que significa marca ou mancha. Acredita-se que as primeiras descrições desta doença datam de 1500 anos antes de cristo: textos védicos, base das escrituras sagradas do hinduísmo e do Egito antigo fornecem registros de descrição de máculas desprovidas de pigmentação (8).

O estigma causado pelo vitiligo, fato identificado ainda nos dias de hoje pelo grande impacto psicossocial desta doença, tem sido relatado na história. Em textos hindus, indivíduos que cometessem ofensas por insultar mentores religiosos (*guru droh*) sofreriam de vitiligo em sua próxima vida. Em referências bíblicas no antigo testamento, mais especificamente no levítico 13, encontramos o termo hebraico *Zoráat*, este se refere a um grupo de doenças classificadas em 5 categorias; manchas brancas propriamente ditas, manchas brancas associadas a pelos brancos, pelos brancos associados com inflamação, manchas brancas com descamação e manchas brancas com atrofia; destas descrições, as duas primeiras são provavelmente relacionadas ao vitiligo. O termo *Zoráat* foi inadequadamente traduzido nas versões de língua grega e inglesa da bíblia como “lepra branca”. Este equívoco de tradução pode ter contribuído para o estigma e impacto social das “manchas brancas” (9). Na Europa da idade média, o vitiligo não era bem conhecido, sendo confundido com outras doenças caracterizadas por hipopigmentação, especialmente a “lepra”, motivo pelo qual estes pacientes eram perseguidos e obrigados a viver em isolamento, junto com outros doentes considerados “leprosos” (8).

Somente no século XIX ocorreram maiores avanços no conhecimento do vitiligo: Moritz Kaposi, em Viena, foi o primeiro a descrever características histopatológicas do vitiligo, como a ausência de grânulos pigmentares nas cristas epidérmicas. No mesmo século, Pierre Louis Alphée Cazenave, dermatologista francês, descreveu a relação entre vitiligo e *alopecia areata*, talvez o primeiro relato correlacionando o primeiro com outra doença autoimune. Ao mesmo tempo, Isidor Neumann em Viena e Louis-Anne-Jean Brocq em Paris descreviam a correlação de fatores emocionais com a piora do vitiligo (8).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DO VITILIGO

O vitiligo é uma doença caracterizada por hipopigmentação cutânea, onde a perda de melanócitos funcionais leva ao aparecimento de manchas acrômicas na pele. O aparecimento das lesões pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais comum em adultos jovens (10). Os portadores de vitiligo apresentam máculas ou manchas acrômicas em número e distribuição variável, frequentemente são simétricas, com crescimento progressivo. Os pelos em áreas de vitiligo também podem perder sua pigmentação. Com a progressão da despigmentação, um aspecto tricrômico pode aparecer, com um centro branco, uma área hipopigmentada e a pele normal ao redor – por vezes, uma borda hiperpigmentada pode estar presente. Em vitiligo, não ocorre alteração da superfície da pele e eritema inflamatório é visto ocasionalmente (11).

As lesões crescem de forma centrífuga, de maneira imprevisível, podendo acometer qualquer região do corpo, inclusive mucosas. As regiões mais frequentemente acometidas são os dedos, pulsos, axila, região inguinal e regiões periorificiais, como a região perioral, pálpebras e genitália. Lesões de vitiligo também podem ser desencadeadas por trauma local – o chamado fenômeno de Köebner, geralmente em áreas como cotovelos e joelhos (12).

O exame com a lâmpada de Wood, instrumento portátil que emite luz ultravioleta, em ambiente escuro, é usada para o diagnóstico do vitiligo e fornece informações adicionais quanto a extensão, atividade de lesão e resposta terapêutica, especialmente em indivíduos de pele clara (fototipos I e II) (11).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DO VITILIGO

De acordo com Nordlund o vitiligo pode ser classificado em localizado, generalizado e universal (13). Em 2007 o *Vitiligo European Task Force* propôs um novo esquema de classificação, visando padronizar estudos, métodos de avaliação e possibilitar estudos de meta-análise. A proposta divide o vitiligo em dois grandes grupos: generalizado (ou não segmentar) e segmentar, sendo que o primeiro inclui as formas acrofacial, vulgar e universal. O **vitiligo vulgar** se

caracteriza pela presença de lesões múltiplas, por vezes simétricas, geralmente com aumento progressivo, a **forma acrofacial** apresenta predomínio de lesões em face e extremidades e na **forma generalizada** ocorre disseminação das lesões de vitiligo (14). O **vitiligo segmentar** é representado por lesões de distribuição dermatomal, única ou múltiplas. O vitiligo focal foi considerado um subtipo indeterminado, que pode fazer parte dos dois grupos, sendo uma lesão que não tem distribuição dermatomal, com um tamanho de 10 a 15cm², que poderá progredir e ser classificada dentro de um destes grupos (15). Esta classificação é interessante, pois separa subtipos de vitiligo que apresentam comportamentos fisiopatogênicos e clínicos diferentes (tabela 1) (14).

A utilização de uma classificação funcional, como a sugerida por Huggins visa separar tipos clínicos, que possam apresentar mecanismos fisiopatogênico e comportamentos clínicos distintos (14). Em um estudo realizado em 586 portadores de vitiligo foi demonstrado uma associação de vitiligo e autoimunidade em 52,6% na forma vulgar, 42,8% na acrofacial e 30% na segmentar, a presença de história familiar de vitiligo foi de 40,6% na forma vulgar, 25,1% na acrofacial e 19,7% na segmentar (3). Tais resultados são importantes, pois sugerem que mecanismos fisiopatogênicos distintos em diferentes fenótipos da doença podem ter importância na análise de estudos genéticos.

Tabela 1: Classificação do Vitiligo (adaptado de: HUGGINS, 2005) (14).

	Não segmentar	Segmentar
Frequência	72-95%	5-28%
Distribuição	Bilateral geralmente simétrico; não dermatomal.	Unilateral; dermatomal; assimétrico.
Início	Qualquer idade	Precoce
Curso da Doença	Variável, com surgimento de novas lesões ao longo da vida	Rápido surgimento inicial, com interrupção da progressão das lesões após 1 ano
Provável Etiologia	Autoimune	Neural
Associação Autoimune	Forte	Raro

Recentemente, um painel internacional de especialistas em vitiligo reuniu-se em Bordeaux na França (16), em busca de um consenso para classificação da doença. Como resultado, apresentou-se um protocolo de classificação do vitiligo em três grupos:

- Vitiligo não segmentar – Compreende os subtipos acrofacial, mucoso (mais de uma região mucosa acometida), generalizado, universal e misto (associado com vitiligo segmentar);
- Vitiligo segmentar – Com um, dois ou mais dermatomos;
- Vitiligo indeterminado ou inclassificável – focal e mucosa (uma região mucosa acometida).

1.5 HISTOPATOLOGIA DO VITILIGO

O diagnóstico do vitiligo é primariamente clínico, porém a biópsia pode auxiliar no diagnóstico diferencial com outras discromias em casos ambíguos (12). O vitiligo tem como característica central a destruição de melanócitos na junção dermo-epidérmica. Histopatologicamente, o achado mais encontrado nas lesões de vitiligo é a perda de melanócitos e melanina e um infiltrado monomorfonuclear variável. A periferia das lesões, especialmente áreas clinicamente hipopigmentadas, podem apresentar alguns melanócitos DOPA-positivos e alguns grânulos de melanina na camada basal (17).

Lesões precoces podem apresentar um infiltrado inflamatório superficial perivascular e ocasionalmente infiltrado liquenóide. Áreas focais de degeneração vacuolar na junção dermo-epidérmica, associada com infiltrado monomorfonuclear, foi relatada. Colorações específicas para melanina, como Fontana-Masson, e exame imunistoquímico com anticorpos marcadores de linhagem melanocítica, mostram ausência de melanócitos em lesões bem estabelecidas de vitiligo (18).

1.6 FISIOPATOGENIA DO VITILIGO

A etiologia do vitiligo permanece desconhecida; porém, algumas hipóteses são propostas para tentar explicar a destruição dos melanócitos, entre elas, as hipóteses autoimune, neural, autocitotóxica e melanocitorrágica. Estes mecanismos por vezes podem se sobrepor e todos parecem estar sobre influência de um fator de suscetibilidade genético (Figura 1).

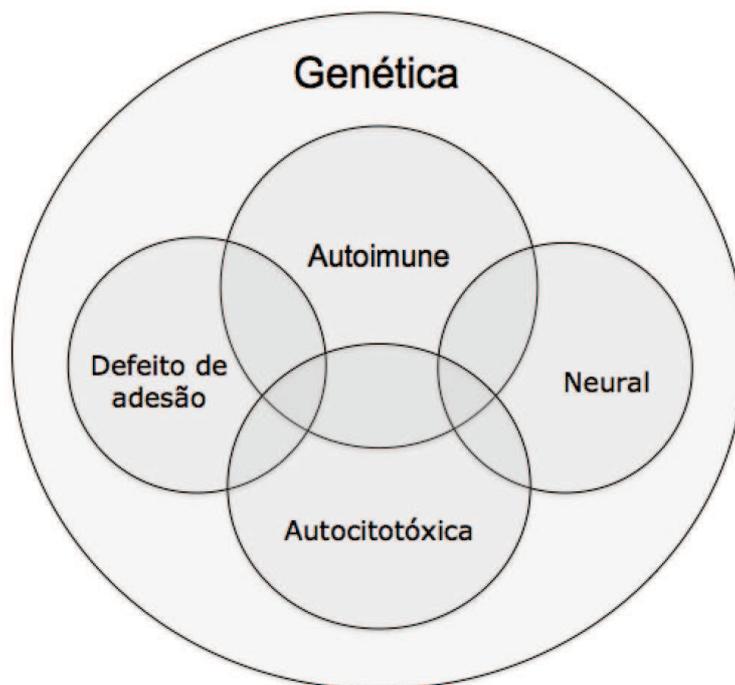


Figura 1: Modelo de interação entre as diversas hipóteses fisiopatogênicas e suscetibilidade genética.

1.6.1 Hipótese autoimune

A teoria autoimune é a mais aceita para explicar a ocorrência do vitiligo. Diversas observações sugerem que a autoimunidade contra os melanócitos é um mecanismo fisiopatogênico importante. O vitiligo se associa a doenças autoimunes de diferentes órgãos, como tireóide, anemia perniciosa, doença de Addison, doença inflamatória intestinal, entre outras, o que sugere a existência de mecanismos fisiopatogênicos e genéticos comuns. Auto-anticorpos contra melanócitos foram descritos por diversas técnicas no soro de portadores de vitiligo, já tendo sido também demonstrado auto-anticorpos contra tirosinase, uma enzima importante para a melanogênese (19).

Além do papel importante dos auto-anticorpos, estudos sugerem a ação da imunidade celular no vitiligo. Em pacientes onde é evidenciada a presença de atividade inflamatória, foi demonstrada a presença de macrófagos e células T, paralelamente à agressão dos melanócitos (20). Na pele perilesional, o infiltrado de células T apresenta aumento da relação CD8/CD4 e aumento da expressão do antígeno linfocitário cutâneo, também foi evidenciado aumento da expressão das moléculas HLA-DR pelos melanócitos (19).

1.6.2 Hipótese autocitotóxica

Pesquisadores sugerem a hipótese de que o vitiligo seja uma doença epidérmica, caracterizada por um desequilíbrio bioquímico que leva à inibição da tirosinase e agressão dos melanócitos por radicais livres de oxigênio (21). Na pele normal, a L-tirosina é um substrato para a síntese da melanina; é proposto que portadores de vitiligo tenham atividades baixas da enzima 4 α -hidroxi-BH₄ desidratase, levando a um aumento de peróxido de hidrogênio na epiderme e inibição da fenilalanina hidroxilase, que converte a L-fenilalanina em L-tirosina, ocasionando um defeito na síntese da melanina; os mesmos autores sugerem que a atividade baixa da catalase na epiderme de portadores de vitiligo, levem a um aumento de toxicidade pelo peróxido de hidrogênio (19).

1.6.3 Hipótese neural

A hipótese neural é embasada clinicamente na ocorrência do vitiligo segmentar, seguindo um trajeto neural. Foi evidenciado, em avaliação ultra estrutural de nervos em áreas de lesão de vitiligo, um aumento da membrana basal das células de Schwann (22). Este mecanismo é supostamente causado direta ou indiretamente por uma reação inadequada de células pigmentares derivadas da crista neural a neuropeptídeos, catecolaminas ou seus metabólitos. Embora não se conheça muito do efeito de neuropeptídios em melanócitos humanos, o sistema nervoso pode ter alguma ação em melanócitos,

especialmente pela secreção de peptídeos relacionados à calcitonina, este está aumentado em fibras nervosas de pele lesional (23).

1.6.4 Hipótese melanocitorrágica

Esta teoria propõe que a despigmentação do vitiligo é resultado de um defeito de adesão do melanócito, que levaria ao desprendimento desta célula da membrana basal da epiderme e sua eliminação transepidérmica, fenômeno denominado melanocitorragia (23). Este mecanismo fisiopatogênico pode ser induzido pelo fenômeno de Koebner, sendo uma resposta alterada do melanócito frente à fricção da pele. Além disso, recente estudo genético encontrou evidência do envolvimento de polimorfismos do gene *DDR1* implicado na via de adesão de melanócitos, no risco de ocorrência do vitiligo, sendo esta a primeira evidência da existência de genes da via de adesão de melanócitos envolvidos no controle da suscetibilidade ao vitiligo (24).

1.7 GENÉTICA DE DOENÇAS COMPLEXAS

O avanço da genética molecular levou à identificação de defeitos cromossômicos e genes mutantes únicos, causadores de doenças que seguem um padrão mendeliano bem definido. Porém, doenças complexas dependem de múltiplos fatores genéticos (poligênicas) e ambientais, que interagem de maneira complexa, sendo a identificação destes genes um desafio para a genética moderna. Algumas ferramentas vêm sendo usadas nos estudos genéticos de doenças complexas, como estudos de genética epidemiológica, estudos de genes e regiões cromossômicas candidatas, e estudos pan genômicos de ligação e associação (25).

As análises de genética epidemiológica são importantes para se identificar a influência de fatores genéticos em uma doença. A observação de uma concentração de casos em famílias, identificadas por estudos de agregação familiar, bem como uma maior concordância da ocorrência da doença entre gêmeos monozigóticos quando comparados com gêmeos dizigóticos, apoiam a

hipótese da existência de um componente genético por trás do fenótipo. Outro método importante é a análise de segregação complexa, que avalia como a doença está distribuída em uma coleção de pedigrees, com o objetivo de definir o modelo de herança genética que melhor explica os dados observados.

Estudos de genes e regiões genômicas candidatas são baseados em conhecimentos prévios de que este gene ou região têm uma relação funcional com a doença; por exemplo, uma estratégia interessante é o estudo de vias biológicas importantes para a doença em estudo. Os genes candidatos também podem ser identificados por uma estratégia posicional, definida a partir da identificação de regiões cromossômicas por análise de ligação, como será discutido mais a frente. Como alternativa, estudos de *scan* genômico, de ligação ou associação, utilizam um mapeamento genético extenso (genômico), livres (ou geradores) de hipótese.

Estudos de ligação bem sucedidos localizam *loci* co-segregando com o fenótipo de interesse em regiões genômicas que compreendem dezenas de genes. Assim, a definição exata do(s) gene(s) envolvido(s) no controle do fenótipo em questão depende de estudos adicionais, geralmente de associação, envolvendo genes candidatos localizados na região genômica identificada na análise de ligação. Mais recentemente, tornaram-se possíveis os estudos de *scan* genômico de associação (em inglês, *Genome Wide Association Studies*, GWAS), nos quais centenas de milhares de SNPs são testados, em um método livre de hipótese prévia, em um grande número de indivíduos. Estes estudos são considerados uma ferramenta poderosa para a investigação de doenças complexas (26); porém, são aspectos a serem avaliados criticamente nestes estudos: a possibilidade de falsos positivos, devido a multiplicidade dos testes estatísticos; e a possibilidade de se identificar SNPs com valor de p significativos, porém com riscos relativos muito baixos ($\leq 1,5$) e sem qualquer relevância biológica estabelecida. Em ambos os casos, é extremamente importante a realização de estudos de replicação, para a confirmação destes achados (27).

1.8 GENÉTICA DA SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO

1.8.1 Estudos de genética epidemiológica

Estudos de genética epidemiológica apoiam a hipótese do vitiligo ser uma doença de base genética. Em 1959, Lerner demonstrou agregação familiar em 38% dos casos (10); estudos de gêmeos demonstram maior taxa de concordância da doença em gêmeos monozigóticos quando comparados aos dizigóticos (28), e estudos de análise de segregação complexa sugerem um modelo genético para a doença (29). O vitiligo apresenta alto índice de agregação familiar, porém não é herdada de uma forma Mendeliana, sendo resultado de interações epistáticas de alelos em dois ou mais *loci*, características de herança poligênica e multifatorial (29).

Tabela 2: Genes estudados para vitiligo por diferentes métodos de genética epidemiológica

Locus	Gene	Método
1p13.3-p32.2	<i>AIS1 (FOXD3)</i>	Ligação, Clonagem Posicional
1p13	<i>PTPN22</i>	Associação
2p21	<i>VIT1 (FBXO11)</i>	Análise de Expressão
2q33	<i>CTLA4</i>	Associação
3p14.1-p12.3	<i>MITF</i>	Ligação
6p21	<i>DDR1</i>	Associação
6q25.1	<i>ESR</i>	Associação
7	<i>AIS2</i>	Ligação, Associação
8	<i>AIS3</i>	Ligação
10q11.2-q21	<i>MBL2</i>	Associação
11p13	<i>CAT</i>	Associação
12q12-q14	<i>VDR</i>	Associação
12q13	<i>MYG1</i>	Análise de Expressão
14q22.1-q22.2	<i>GCH1</i>	Associação, Sequenciamento
17p13	<i>NALP1 (SLEV1)</i>	Ligação, Associação
17q23	<i>ACE</i>	Associação
21q22.3	<i>AIRE</i>	Ligação, Sequenciamento, Associação
22q11.2	<i>COMT</i>	Associação
22q12	<i>XBP1</i>	Associação

Adaptado de: SPRITZ, R.; The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cel Res* 2009, 20 (5), p271-278 (30).

1.8.2 Estudos de genes/regiões genômicas candidatas(as)

Genes e regiões genômicas candidatas, têm sido investigadas intensamente em portadores de vitiligo, utilizando diversas estratégias de análises genéticas (tabela 2). Os primeiros estudos genéticos de associação com vitiligo foram estudos do tipo caso-controle, analisando a região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, em inglês *major histocompatibility complex*). Diversos estudos têm reportado associação entre variantes de genes *HLA* com a suscetibilidade para desenvolver vitiligo em diferentes grupos étnicos (31-40) (tabela 3). Esses estudos foram realizados testando diversos marcadores da região do MHC em pacientes com diferentes fenótipos de vitiligo *versus* controle, em populações de diferentes regiões geográficas.

Tabela 3: Descrição dos antígenos HLA associados ao vitiligo em diferentes grupos étnicos.

População	HLA associado	Autor
Americana	HLA-DR4	Foley e col, 1983
Kuwaitiana	HLA-B21, Cw6, DR53	Al-fouzan e col, 1995
Afro-americana	HLA-A1, A2,A31, DR4, DQ3	Kachru e col, 1978; Dunston e col, 1990
Holandesa	HLA-DR4, DR6	Venneker e col, 1993
Italiana	HLA-A30, Cw6, DR6, DR7,DQ3	Valsecchi e col, 1995; orecchia e col, 1992; Finco e col, 1991
Eslovena	HLA-A2,DW7	Bluce e col, 1996
Omani	HLA-DR7	Venkataram e col , 1995
Alemã	HLA-A2, DR12	Schallreuter e col, 1995
Turca	HLA-DR3, DR4, DR7	Tastan e col, 2004
Saudita	HLA-B7, Bw6, Cw6, Cw7, DR4	Abamni e col, 2006

Nota: Adaptado de Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH. *Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo*. J. Eur Acad Dermatol Venereol. 2007; 21(7): 865-76 (41).

Em geral esses estudos não têm encontrado associação consistente entre a ocorrência de vitiligo e alelos HLA, com exceção do alelo HLA-DR4. Uma meta-análise, realizada por Liu e col., encontrou associação entre vitiligo e HLA-A2 (42). Estudos recentes, utilizando métodos moleculares mais robustos e análise de associação baseada em famílias encontraram associação genética

entre vitiligo generalizado e alelos dos genes HLA-DRB4*0101 e HLA-DRB1*0303 em pacientes holandeses (43); alelos dos genes HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401 e HLA-DRB1*0701 em turcos (40), alelos dos genes DRB1*0701, DQB1*0201 e DPB1*1601 em eslovacos (44) e o alelo 122 do microssatélite D6S265, localizado no cromossomo 6p21.3-p21.4 em colombianos (45). Em famílias *multiplex* caucasianas com vitiligo generalizado, o haplótipo MHC classe II HLA-DRB1*04-(DQA1*0302)-HLADQB1*0301 estava associado tanto com aumento de risco ao vitiligo como com início precoce da doença (46). Em chineses da etnia Han, o haplótipo HLA A25-Cw*0602-DQA1*0302 estava associado com vitiligo generalizado (47).

Associação genética, em estudos do tipo caso-controle e baseado em famílias, foi relatada entre alelos de marcadores do gene *LMP/TAP*, localizado na região MHC, com vitiligo generalizado de início precoce (48). Namian e col. observaram que o polimorfismo funcional -308 do gene MHC classe III *TNFA* determina a suscetibilidade ao vitiligo em iranianas do sexo feminino ($p = 0,0001$) (49). O real significado dos inúmeros achados de associação entre genes HLA e vitiligo ainda é obscuro, em parte devido à associação desses genes com outras doenças autoimunes. No entanto, essas iniciativas contribuíram para somar evidências de que a doença tem um componente autoimune na sua patogênese.

A investigação de genes candidatos localizados fora da região do MHC tem levado a resultados promissores. Em uma análise de gene candidato utilizando-se um desenho de associação baseado em populações, Casp e col. encontraram alelos de marcadores intragênicos no gene *CAT* associados ao vitiligo em uma população caucasiana (50). Mais recentemente, usando desenho de estudo semelhante, Park e col. replicaram este achado em uma população coreana formada por 118 indivíduos afetados e 200 controles (51). Em um estudo de associação de polimorfismos do gene *DDR1* e vitiligo, gene este candidato funcional envolvido na via de adesão dos melanócitos, Silva de Castro e col. encontraram polimorfismo de marcadores deste gene associados ao vitiligo *per se*, um efeito dependente da idade de aparecimento da doença – a associação concentrou-se em uma sub-amostra populacional de casos precoces (24). Entre outros genes candidatos analisados, evidência para associação com

fenótipos do vitiligo foi encontrada para marcadores dos genes *CTLA-4* (52, 53), *ACE* (54), *PTPN22* (55, 56), *ESR1* (54), *COMT* (57), *MBL2* (58), *EDN1* (59), *FAS* (60), *AIRE* (61), *Nrf2* (62).

1.8.3 Estudos de genoma completo

1.7.3.1 Estudos de ligação – Clonagem de posição

Estudos de ligação têm desempenhado um importante papel na elucidação do componente genético do vitiligo. Nath et al. (2001), em uma população euro-americana de 92 famílias multiplex portadoras de lupus eritematoso sistêmico, selecionaram 16 famílias com pelo menos um indivíduo afetado também por vitiligo e utilizaram estas famílias para um estudo de ligação com marcadores do cromossomo 17p13. Análise de ligação não-paramétrica resultou no LOD score significativo de 4,02 ($p = 2,8 \times 10^{-5}$) para esse *locus*, denominado pelos autores de SLEV1 (63). Um estudo de associação, realizado em 114 famílias estendidas da América do Norte e do Reino Unido, envolvendo marcadores do *locus* SLEV1, resultou na identificação do gene *NLRP1* (do inglês, encoding NACHT Leucine-rich-repeat protein, previamente denominado *NALP1*) como o melhor candidato localizado nesta região genômica. Estudos posteriores de mapeamento fino de associação usando marcadores do tipo Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP, em inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) cobrindo toda a extensão do gene *NLRP1* e estendendo-se por 224kb da sua região promotora, mostrou associação de variantes específicas do gene *NLRP1* e vitiligo associado a outras doenças autoimunes e inflamatórias, nessas mesmas famílias. Nesse trabalho, uma análise de regressão logística indicou que pelo menos duas variantes contribuíam independentemente para o risco da doença (64). Subsequentemente, a associação genética entre vitiligo e *NLRP1* foi confirmada em um estudo caso-controle independente em uma população da Romênia formada por 66 indivíduos afetados e 93 controles (65).

Análise de ligação tanto paramétrica como não-paramétrica detectou evidência positiva de ligação entre o *locus* 1p31, denominado pelos autores

“AIS1” (em inglês, *Autoimmunity Susceptibility Locus 1*) e vitiligo em uma grande família multigeracional apresentando múltiplos casos de vitiligo e tireoidite de Hashimoto. No mesmo estudo, a análise foi repetida com a adição de mais 26 famílias (LOD score não-paramétrico = 4,16; $p = 8,5 \times 10^{-4}$) (28). A expansão da mesma amostra populacional para 71 famílias multiplex recrutadas nos EUA e Reino Unido, usadas em um *scan* genômico, levou a forte evidência para ligação entre o *locus* AIS1 e vitiligo (LOD score não-paramétrico = 5,56; $p = 2,82 \times 10^{-7}$) (66). Em estudo complementar posterior, onde a coleção original de 71 famílias foi novamente expandida para um total de 102 pedigrees, evidência adicional para ligação com vitiligo foi detectada nos cromossomos 7 (LOD = 3,73; $p = 2,08 \times 10^{-5}$) e 8 (LOD = 3,36; $p = 4,18 \times 10^{-5}$) (67). No entanto, as evidências de ligação entre vitiligo e o *locus* 1p31 devem ser interpretadas com cautela, uma vez que quando se remove a família *multiplex* multigeracional original (28), o LOD score paramétrico total das outras 26 famílias estudadas cai para 1,24, sugerindo um efeito genético exclusivo ao primeiro pedigree. Esta possibilidade é reforçada por dados de estudo experimental, realizado pelo mesmo grupo, que detectou variação no gene *FOXD3* localizado no *locus* AIS1, exclusivamente na família original. Assim, o efeito genético detectado para o *locus* AIS1 parece ser exclusivo de um pedigree, e não explica a ocorrência da doença na população em geral (68).

Um *scan* genômico independente realizado em 106 famílias *multiplex* chinesas afetadas por vitiligo generalizado identificou sinal significativo de ligação entre a doença e marcadores da região 4q13-q21 (LOD score não-paramétrico = 4,62; $p = 3,0 \times 10^{-6}$), além de sinais sugestivos de ligação em outros cinco *loci*, 1p36, 6p21-22, 6q24-q25, 14q12-q13 e 22q12 (69). Em estudo subsequente, dois *loci* atingiram significância estatística após a adição de 37 famílias às 106 anteriores: *locus* 22q12 (LOD score não-paramétrico = 4,14; $p = 1,5 \times 10^{-5}$) e 6p21-p22 (LOD score não-paramétrico = 4,10; $p = 1,8 \times 10^{-5}$) (70).

O *locus* de suscetibilidade ao vitiligo generalizado, na região cromossômica 22q12, identificado no estudo previamente citado (70), abriga o gene *XBP1* que codifica a proteína homônima, que age como fator de transcrição, reconhecendo o elemento promotor X2 do HLA DR- α e DP- β . A

relação do vitiligo com autoimunidade e evidências de associação com HLA DR tornam este gene um importante candidato funcional (71). Um estudo subsequente mostrou evidências de associação de alelos do marcador rs2269577 (OR = 1,36, $p_{\text{trend}} = 7 \times 10^{-3}$) da região promotora do gene *XBP1* com vitiligo. No mesmo estudo, análise estratificada não revelou associação na presença de comorbidades autoimunes. Dados funcionais do mesmo estudo mostram elevação da expressão do RNAm do *XBP1* em pele lesional comparada com pele normal, correlacionando com o polimorfismo do rs2269577 (71). Esta associação do polimorfismo do marcador rs2269577 foi replicada ($p=7.5E-04$, OR=1.17) em uma população caucasiana (72).

1.7.3.2 Estudos de associação – GWAS

O primeiro GWAS em vitiligo foi realizado em uma população fundadora, que se caracteriza por menor variabilidade genética, com elevada prevalência de vitiligo generalizado, no noroeste da Romênia, encontrando-se associação entre a doença e o marcador rs13208776 ($p=3,13 \times 10^{-8}$) do gene *SMOC2* (73); até o momento, porém, este achado não foi replicado.

Subsequentemente, um GWAS para vitiligo generalizado em uma população caucasiana e, paralelamente, um estudo realizado em uma população chinesa, encontraram forte associação com polimorfismos em *loci* da região do MHC, bem como outros em *loci* não MHC (74, 75); parte destes achados foram replicados em populações e estudos independentes, conforme resumido na tabela 4 (64, 73, 75, 76).

Tabela 4. Genes associados ($P < 5 \times 10^{-8}$) ao vitiligo generalizado em GWAS, já replicados.

Locus	Gene	População	Tipo de Replicação
1p36.23	<i>RERE</i>	CEU	No mesmo estudo
1p13.2	<i>PTPN22</i>	CEU	No mesmo estudo
2q24.2	<i>IFIH1</i>	CEU	No mesmo estudo
3q13.33	<i>CD80</i>	CEU	No mesmo estudo
3q28	<i>LPP</i>	CEU, HAN	Independente
4p16.1	<i>CLINK</i>	CEU	No mesmo estudo
6q21.3	<i>MHC classe I (HLA-A), MHC classe II, MHC classe III</i>	CEU	No mesmo estudo
6q15	<i>BACH2</i>	CEU	No mesmo estudo
6q27	<i>CCR6</i>	HAN	No mesmo estudo
8q24.2	<i>SLA</i>	CEU	No mesmo estudo
10p15.1	<i>IL2RA</i>	CEU, HAN	No mesmo estudo
10q22.1	<i>SLC29A3-CDH23</i>	HAN	No mesmo estudo
10q25.3	<i>CASP7</i>	CEU	No mesmo estudo
11p13	<i>CD44</i>	CEU	No mesmo estudo
11q14.3	<i>TYR</i>	CEU	No mesmo estudo
11q21	<i>TYR regulation</i>	CEU	No mesmo estudo
11q23.3	Região intergenica entre <i>DDX6</i> e <i>CXCR5</i>	HAN	No mesmo estudo
12q13.2	<i>IKZF4</i>	CEU, HAN	Independente
12q24.12	<i>SH2B3</i>	CEU	No mesmo estudo
14q12	<i>GZMB</i>	CEU	No mesmo estudo
15q12-13.1	<i>OCA2-HERC2</i>	CEU	No mesmo estudo
16q24.3	<i>MC1R</i>	CEU	No mesmo estudo
19p13.3	<i>TICAM1</i>	CEU	No mesmo estudo
21q22.3	<i>UBASH3A</i>	CEU	No mesmo estudo
22q12.3	<i>IL2RB</i>	HAN	No mesmo estudo
22q13.1	<i>C1QTNF6</i>	CEU	No mesmo estudo
22q13.2	<i>TOB2</i>	CEU	No mesmo estudo

1.9 GENES CANDIDATOS DO PRESENTE ESTUDO

A importância da melanocitorragia como mecanismo fisiopatogênico do vitiligo e a associação de polimorfismos de genes que codificam proteínas responsáveis pela adesão intercelular, como o *DDR1*, tornam necessária uma melhor investigação de outros genes que codificam importantes proteínas envolvidas na adesão queratinócito-melanócitos como a E-caderina, a *CCN3* e a *IL-1β*, respectivamente os genes *CDH1*, *NOV* (previamente conhecido como *CCN3*) e *IL1B* (figura 2).

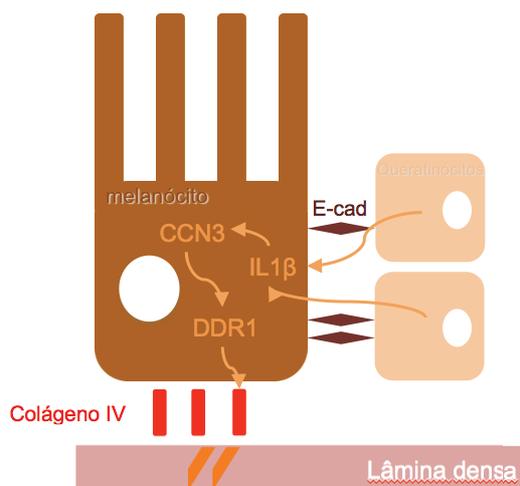


Figura 2: Principais citocinas envolvidas na via de adesão dos melanócitos.
(Adaptado de Fukunaga-Kalabis, *M et al.*, 2008) (77).

1.9.1 Gene *CDH1*

O gene *CDH1* localizado genomicamente na região 16q22.1 codifica a glicoproteína E-caderina, uma molécula de adesão intercelular transmembrana dependente do cálcio. A E-caderina é expressada na epiderme, exceto na camada córnea, tanto no queratinócito como no melanócito.

A E-caderina é a principal mediadora de adesão dos melanócitos humanos aos queratinócitos (23). Esta célula tem um papel importante no controle das funções normais do melanócito, especialmente em relação ao crescimento e melanogênese, sendo esta interação dependente da E-caderina (18). O uso de anticorpo anti-E-caderina humana inibe quase completamente a adesão de melanócitos e queratinócitos *in vitro* (78).

1.9.2 Gene *NOV*

O gene *NOV* “Nephroblastoma overexpressed”, também conhecido como *CCN3*, localizado genomicamente na região 8q24.1, codifica uma proteína de matriz extracelular, que dependendo da célula envolvida, pode ter ação em adesão, proliferação, diferenciação ou sobrevivência celular. Em cultura de melanócitos e queratinócitos esta proteína inibe a proliferação de melanócito e atua na localização tridimensional desta célula (79). O silenciamento do gene

NOV foi relacionado com diminuição da expressão da proteína DDR1 bem como com a diminuição da adesão a colágeno do tipo IV, sendo esta adesão mediada pelo *DDR1* (80). Além disso, foi demonstrado que melanócitos *knockout* para *NOV* perdiam sua localização espacial na epiderme, junto à membrana basal, sendo deslocados para camadas suprabasais ou invadindo a derme (81).

1.9.3 Gene *IL1B*

O gene *IL1B* localizado genomicamente na região 2q14, codifica uma proteína que é membro da família das citocinas da interleucina 1. Foi sugerido que uma alteração na atividade das caspases 1 e 5, estas reguladas pelo gene *NLRP1*, modulam a atividade da interleucina 1 β (IL1 β). Especula-se que algum mecanismo, como a fricção da pele, que pode levar à melanocitorragia, possa ativar o reservatório de IL-1 β , biologicamente inativo na epiderme (82). Um provável mecanismo através do qual melanócitos mantêm a adesão à camada basal envolve a produção e liberação de IL-1 β pelos queratinócitos em resposta a stress, tais como traumas e radiação ultravioleta, a IL-1 β estimularia a produção e liberação de CCN3 pelos melanócitos, que agiria aumentando a expressão de DDR1, conseqüentemente aumentando a adesão ao colágeno IV na membrana basal, resultando em melhora adesão celular.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O vitiligo é uma doença com um alto impacto na qualidade de vida, cuja fisiopatogenia não está completamente elucidada. A complexa relação do vitiligo com outras doenças, especialmente autoimunes, e a influência de um importante controle genético sobre o risco de ocorrência da doença, identificado através de estudos epidemiológicos e moleculares, justificam esforços para identificar variantes genéticas envolvidas nesta doença, a fim de se avançar no entendimento das vias biológicas que contribuem para o seu desenvolvimento.

Considerando a melanocitorragia uma hipótese importante para o desenvolvimento do vitiligo (23), em particular, sob a ótica dos achados prévios

do nosso grupo mostrando associação entre a doença e polimorfismos do gene *DDR1* (24) envolvido com a via de adesão dos melanócitos, assim faz-se necessários estudos para avaliar o impacto de polimorfismos genéticos desta via no vitiligo.

Nossa hipótese é que polimorfismos dos genes *CDH1*, *NOV* e *IL1B* candidatos funcionais da via de adesão celular, estejam envolvidos no controle da suscetibilidade à doença em uma população sul-brasileira.

A escolha do genes *CDH1*, *NOV* e *IL1B* é justificada pelos seguintes aspectos:

- (i) serem reguladores de proteínas expressas na via de adesão dos melanócito;
- (ii) ser o defeito de adesão dos melanócitos, um mecanismo fisiopatogênico importante no desenvolvimento do vitiligo;
- (iii) demonstração prévia de associação de outro gene da via de adesão com vitiligo, como *DDR1*;
- (iv) necessidade de uma melhor compreensão desta via biológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é aplicar uma estratégia de análise de associação baseado em famílias para investigar, em uma população sul-brasileira, a participação de polimorfismos dos genes *CDH1*, *IL1B*, e *NOV* no controle da suscetibilidade ao vitiligo e suas variáveis clínicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar polimorfismos dos genes candidatos, *CDH1*, *IL1B*, e *NOV* para associação com suscetibilidade ao vitiligo em uma amostra populacional

- composta por trios formados por filhos afetados com vitiligo e seus pais, utilizando um desenho baseado em famílias;
2. Estimar as OR relativas às variantes associadas ao controle do vitiligo na população estudada;
 3. Verificar a influência das variáveis, autoimunidade, forma clínica, idade de início, presença de fenômeno de Köebner do vitiligo em caso de evidência de associação para os polimorfismos dos genes candidatos selecionados;
 4. Replicar os achados positivos em uma amostra populacional independente, do tipo caso-controle, recrutada paralelamente a população de famílias, na mesma região geográfica;
 5. Testar os achados positivos em uma população combinada composta pelos casos dos trios e da amostra caso-controle.

4 MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Este estudo foi realizado utilizando uma população previamente recrutada, durante o período 2004-2007, para fins de estudos epidemiológicos e análise genética de suscetibilidade ao vitiligo. Todos os indivíduos recrutados foram avaliados por um único médico dermatologista, treinado e com ampla experiência no tratamento de vitiligo, junto ao seu consultório particular de dermatologia e no serviço de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Para determinar a presença de vitiligo, todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico de todo o tegumento e através de exame de lâmpada de Wood que emite luz ultravioleta “A” em ambiente escuro, a fim de diferenciar acromia (ausência de pigmento), encontrado no vitiligo, de hipocromia (pequena quantidade de pigmento) encontrada em outras doenças. Todos os procedimentos diagnósticos empregados neste estudo são amplamente consagrados na literatura especializada, e não oferecem riscos ao paciente além daqueles descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os candidatos foram solicitados a ler o TCLE, devidamente aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCPR (CONEP 14394/anexo 2). Os indivíduos que concordaram em participar foram solicitados a assinar o TCLE. Caso o voluntário fosse menor de idade, um formulário próprio foi apresentado e assinado por um dos pais ou guardião legal.

Para a análise de associação baseada em famílias, foram incluídos neste estudo 632 indivíduos distribuídos em 199 famílias nucleares formadas por indivíduos afetados com vitiligo, independente de sua forma clínica, e seus pais e parentes, quando disponíveis, procedentes do estado de Santa Catarina e Paraná. Estas famílias dividem-se em 181 famílias simplex independentes (formado por um indivíduo afetado e seus pais) e 18 famílias multiplex (formadas por dois ou mais membros afetados). Ao todo, 224 trios foram derivados desta amostra populacional.

Para compor a população caso-controle de replicação, foram recrutados paralelamente 121 indivíduos com vitiligo *per se*, diagnosticados conforme os mesmos critérios de recrutamento da população de famílias descrito acima; e 134 indivíduos sem histórico de vitiligo e doenças autoimunes, examinados por médico dermatologista, pareados com os casos de acordo com idade e sexo, para compor o grupo controle.

Na tabela 5 estão descritas as principais características, incluindo gênero, idade de início do vitiligo, autoimunidade e forma clínica, dos 224 indivíduos afetados com vitiligo recrutados para compor o estudo baseado em famílias e dos 121 indivíduos que compõem o grupo de casos. As doenças autoimunes associadas com vitiligo presentes na nossa população foram: doença autoimune da tireóide, artrite reumatoide, *diabetes* tipo I, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, halo-nevo, *alopecia areata*, esclerodermia cutânea.

Tabela 5: Característica clínica dos indivíduos afetados com vitiligo na população estudada. Adaptado de Silva de Castro, *et al.* Journal of Dermatological Science. 2012; 65: 63–67 (3)

Característica dos indivíduos afetados	Estudo baseado em famílias n=224	Estudo caso-controle n=121	p valor
Genêro n (%)			
Masculino	92 (41,1%)	215 (49,8%)	p=0.7
Feminino	56 (70%)	217 (50,2%)	
Idade média de início do vitiligo (anos)	18,1 (± 11,47)	25 (± 15,94)	p=0.0001
Autoimunidade n (%)			
presença	108 (48,2%)	50 (41,3%)	p=0.29
ausência	115 (51,3%)	63 (52,1%)	
Forma clinica n (%)			
Segementar	40 (17,8%)	14 (11,6%)	p=0.04
Não-segmentar	184(82,2%)	107 (88,4%)	

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Os pacientes que tiveram o diagnóstico de vitiligo confirmado e a doença classificada por médico dermatologista, através de exame clínico de rotina, conforme protocolo de diagnóstico de vitiligo;
- Aqueles pacientes cujo diagnóstico não foi confirmado pelo exame clínico, mas que tiveram a doença confirmada após biópsia incisional e exame anatomopatológico;
- Os pacientes para os quais tenha sido descartada a presença de síndromes que apresentam o vitiligo como uma das suas manifestações como: síndrome Vogt-Koyanagy-Harada e síndrome de Waardenburg;
- Pacientes e seus pais que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE.

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Famílias para as quais inconsistências de transmissão mendeliana foram encontradas durante a análise genética;
- Amostras para as quais não foram obtidos DNA em qualidade suficiente para a amplificação por PCR e análise molecular.

4.2 COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DO DNA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS

O DNA utilizado nas análises foi obtido a partir de sangue total. Foram coletados 5 ml de sangue por punção venosa em tubos do tipo vacutainer® contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante, em condições ideais de assepsia. O sangue coletado foi centrifugado e separado a camada leucocitária (buff coat) para extração do DNA, segundo o protocolo para extração rápida do DNA genômico proposto em (83). O DNA extraído foi submetido à leitura por espectrofotometria para verificar a concentração da amostra. Após a determinação da concentração, as amostras foram diluídas a uma concentração final de 20 ng/μl, para solução de trabalho, e armazenadas em freezer a -20°C de acesso restrito e permitido apenas aos pesquisadores envolvidos no projeto ou ao pessoal técnico por eles autorizado.

4.3 SELEÇÃO DE MARCADORES

Para os genes candidatos foram selecionados principalmente marcadores do tipo tag SNP através do *Hap Map Project*, usando parâmetros de r^2 de 80% e MAF de 0,2. Assim, foram selecionados oito marcadores do gene *CDH1*; rs10431924, rs1801552, rs7186333, rs7196495, rs8056633, rs8059139, rs9927789 e rs2011779, dois marcadores do gene *NOV*; rs2071519 e rs7014927 e três marcadores do gene *IL1B*; rs1143634, rs1143633 e rs3136558.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR

A genotipagem dos marcadores do gene *IL1B* selecionados foram realizadas através do sistema de discriminação alélica ABI TaqMan conforme implementado na plataforma 7500 de discriminação alélica por PCR.

O sistema TaqMan de discriminação alélica é um ensaio no qual as variantes genômicas são detectadas através de uma reação da cadeia da polimerase (PCR) multiplex, que combina a amplificação e detecção do segmento polimórfico em um único passo. Isso ocorre devido à presença, na reação, de: (i) um par de oligonucleotídeos sonda, específicos para cada variante alélica, marcados com química fluorescente diferente (normalmente VICTM e FAMTM) e (ii) um *quencher* que captura a fluorescência do fluoróforo que está próximo fisicamente. Quando ocorre hibridização sonda/amplicon, a atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase leva à clivagem da sonda e liberação do fluoróforo, o qual emite fluorescência no comprimento de onda específico, que é detectado através de um conjunto de filtros. Os dados da intensidade de fluorescência são acumulados a cada ciclo da reação de PCR e podem ser obtidos no final do processo, considerado end-point.

As reações foram realizadas em termociclador modelo ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) em um volume final de 5µL contendo 20ng de DNA genômico, reagente Assay 40X em concentração final de 1X contendo oligonucleotídeos iniciadores e sondas marcadas com os fluoróforos VICTM e FAMTM alelo específico em concentrações ideais e TaqMan Genotyping PCR Master Mix, a qual contém Gold Taq Polimerase com atividade de 5' DNase, dNTP's e tampão a base MgCl₂. Todos os reagentes foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems).

O ensaio de discriminação alélica envolve as seguintes etapas:

1. Pré-leitura: as reações são submetidas a uma pré-leitura a 60°C por 1 min, a fim de detectar o *background* da fluorescência associada com os oligonucleotídeos iniciadores e sondas antes da amplificação.

2. Reação de amplificação: consiste em uma incubação inicial a 50°C por 2 min para inativação da enzima AmpErase® e 95°C durante 10 minutos para a desnaturação inicial. Em seguida as amostras são submetidas a 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, durante o qual ocorre a hibridização dos oligonucleotídeos e a extensão dos fragmentos.
3. Pós-leitura: as reações são submetidas a uma pós-leitura a 60°C por 1 minuto, a fim de subtrair o *background* coletado na pré-leitura do valor final obtido na pós-leitura.
4. Interpretação dos resultados: nos indivíduos homocigotos, ocorre à hibridização com uma das sondas alelo-específica VIC™ ou FAM™, sendo somente detectada a fluorescência no comprimento de onda de um dos fluoróforo, dependendo para qual alelo o indivíduo é homocigoto. Nos indivíduos heterocigotos, ocorre à hibridização com ambas as sondas alelo-específica VIC™ e FAM™, e as sondas apresentam intensidade de fluorescência equivalentes para os alelos, sendo detectadas em ambos os comprimentos de onda dos fluoróforos em questão (figura 3).

A genotipagem dos marcadores dos genes *NOV* e *CDH1* foi realizada na plataforma de alto rendimento Sequenom® MassARRAY, que usa o ensaio denominado de iPLEX. O ensaio iPLEX é baseado em uma amplificação inicial dos fragmentos genômicos em um PCR multiplex. As reações foram realizadas em um volume final de 5 µl contendo tampão *Sequenom* PCR, 2 mM de *Sequenom* MgCl₂, 0,5 mM de *Sequenom* dNTPs, *pool* de oligonucleotídeos iniciadores a 0,1 µM, 0,2 U/ul de *Sequenom* Enzima PCR, sob condições uniformes e universal de ciclagem para todos os SNPs. Após o PCR os amplicons foram tratados por 50 min, sob alternância de temperatura, com 0,150 U/ul da enzima SAP, a qual desativa os nucleotídeos livres que não foram incorporados à reação de PCR. Na sequência foi realizada a etapa SBE (em inglês, *single base extension*) que se baseia na incorporação de um nucleotídeo terminal com massa modificada.

1. As reações de extensão foram realizadas em um volume final de 2 µl contendo *pool* dos oligonucleotídeos sondas 47% V, 1 mM de iPLEX *terminator*, tampão iPLEX e 0.655 U/ul de iPLEX *thermo sequence*. Os

produtos resultantes da extensão das sondas foram tratados com 6 mg de resina (*clean resin*), a qual precipita os cátions presentes na reação e, então, o sobrenadante foi adicionado ao SpectroCHIP®. O chipe contendo o produto da extensão foi analisado no espectro de massa MALDI-TOF (em inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*). Os genótipos foram discriminados através da sua massa e analisado no software MassARRAY Typer 4.0.

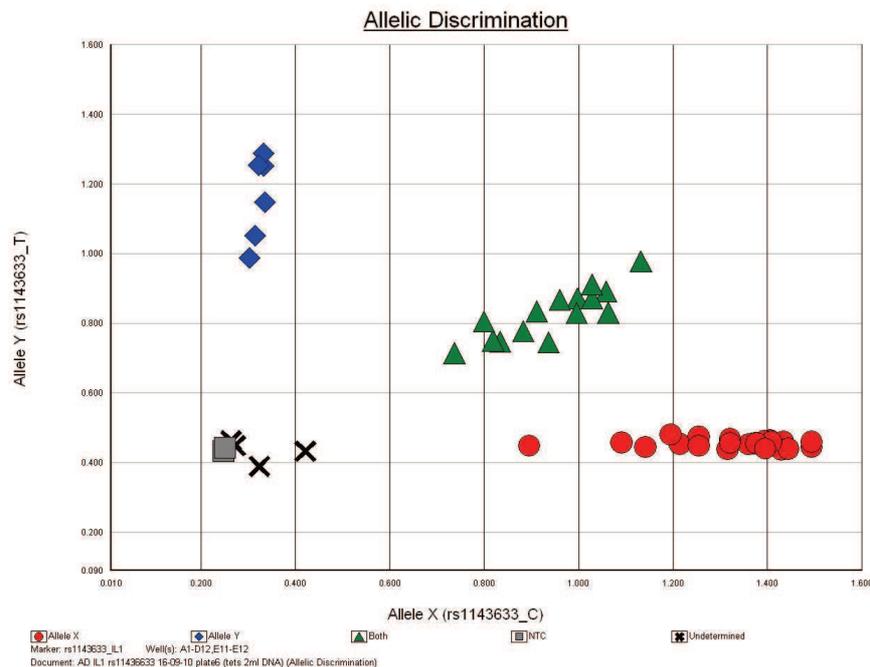


Figura 3: Padrão dos clusters alelo-específicos discriminados de acordo com a intensidade de fluorescência detectada no comprimento de onda dos fluoróforos VIC™ e FAM™, para o marcador rs1143633 do gene *IL1B*. Em azul; indivíduos homocigotos para o alelo T, em verde; indivíduos heterocigotos, em vermelho; indivíduos homocigotos para o alelo C; “X” indicam amostras onde não foi obtida discriminação alélica; quadrados cinzas são os controles negativos (sem DNA).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de associação genética baseada em famílias entre os marcadores testados e suscetibilidade ao vitiligo foi realizada através de teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), conforme implementado no software FBAT

(84). A análise considera pais heterozigotos e avalia a frequência com as quais os alelos são transmitidos dos pais heterozigotos para os filhos afetados. Assim, só são incluídas na análise famílias apresentando pelo menos um dos pais heterozigotos para o marcador em estudo. As frequências alélicas na população foram estimadas com base nos alelos parentais não-transmitidos (85). Os alelos dos marcadores dos genes candidatos mostrando evidência para associação foram analisados por regressão logística condicional, estratégia que permite analisar a influência dos fatores ambientais juntamente aos fatores genéticos, assim como estimar *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC), implementado no software SAS, versão 9.1 (SAS institute, Cary, North Carolina, USA). A análise de associação genética baseada em população (caso-controle) foi implementada no programa SAS.

O teste para verificar se as frequências alélicas dos SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o grau de LD entre alelos de pares de marcadores foram estimadas através do parâmetro r^2 , conforme implementado no software Haploview.

4.6 DESENHO DO ESTUDO

O diagrama abaixo resume o desenho geral do estudo.

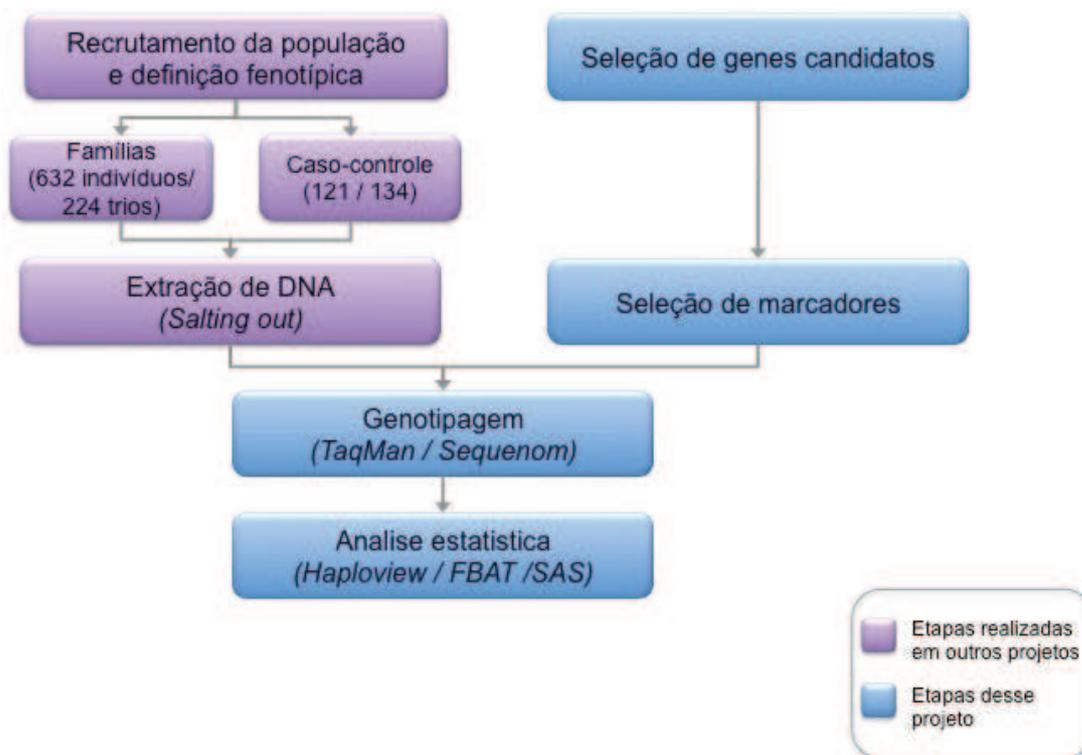


Figura 4: Desenho do estudo

Polymorphism of the E-cadherin gene *CDH1* is associated with susceptibility to vitiligo

Roberto Gomes Tarlé¹, Caio Cesar Silva de Castro¹, Liliane Machado do Nascimento³ and Marcelo Távora Mira^{2,3}

¹Department of Dermatology, Santa Casa de Misericórdia de Curitiba Hospital, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil; ²Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil; ³School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil
Correspondence: Marcelo Távora Mira, PhD, Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP: 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil, Tel.: +55 41 32712030, Fax: +55 41 32711657; e-mail: m.mira@pucpr.br

Abstract: Vitiligo is a depigmenting disorder characterized by loss of functional melanocytes from the epidermis. Experimental data suggest that defective melanocyte adhesion may underlie the pathogenesis of the disease. In particular, association between vitiligo and genetic variants of the *DDR1* gene involved in melanocyte adhesion has been recently published. A subsequent, independent study revealed lower expression of *DDR1* in vitiligo lesions. Here, we expand this investigation by testing for association between vitiligo and polymorphisms of *CDH1*, *IL1B*

and *NOV* (formerly *CCN3*), genes belonging to the *DDR1* adhesion pathway, in two population samples of distinct design. Our results reveal that alleles of marker rs10431924 of the *CDH1* gene are associated with vitiligo, especially in the presence of autoimmune comorbidities.

Key words: cadherins – *CDH1* – cell adhesion – genetic association studies – vitiligo

Accepted for publication 11 January 2015

Background

Vitiligo is a depigmenting disorder characterized by loss of functional melanocytes from the epidermis, resulting in achromic patches of the skin. The hypothesis that vitiligo is caused by impaired melanocyte adhesion is based on the observation that mechanical friction leads to cell detachment and transepidermal loss (1). The adhesion hypothesis has been reinforced by recent report of association between vitiligo and polymorphisms of the *Discoidin Domain Receptor 1* (*DDR1*) gene that codifies a tyrosine kinase receptor involved in melanocyte anchoring through binding to collagen IV (2). A subsequent study revealed reduced immunohistochemical expression of *DDR1* in lesional versus non-lesional skin (3), raising the hypothesis that additional genes of the same pathway may be involved.

In this context, *IL1 β* , a pro-inflammatory cytokine produced by keratinocytes, upregulates expression of the matricellular protein *CCN3* that stimulates *DDR1* expression, preventing melanocyte detachment from the basement membrane of the epidermis (4). Also, depletion of *DDR1* in MDCK cell cultures decreased the levels of cell surface E-cadherin, causing cytoplasmic accumulation and decreased intercellular adhesion mediated by this protein; *DDR1* overexpression stabilized cell surface E-cadherin (5).

Question addressed

Our goal was to investigate for association between vitiligo and polymorphisms of genes belonging to the same melanocyte adhesion pathway as *DDR1*: *CDH1*, *IL1B* and *NOV* that codify proteins E-cadherin, *IL1 β* and *CCN3*, respectively.

Experimental design

A family-based association analysis involving 212 family trios (596 individuals) previously described (2) was performed between vitiligo and genetic variants of *CDH1*, *IL1B* and *NOV*. To replicate our findings – thus reducing the probability of false positive association results – we used an independent case-control population sample of 131 patients with vitiligo and 119 controls matched by age, gender and ethnicity. The study was approved by the Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná and conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Tag single nucleotide polymorphism (SNP) markers capturing the entire information of the candidate genes were selected according to the International Hap Map Project, release 24/phase 2_Set08. We selected tag SNPs presenting a minor allele frequency of 0.2 or more in at least 4 HapMap populations (Caucasian, Japanese, Yoruba and Chinese Han) (Table 1). The cut-off parameter to define independence between two markers, estimated by Linkage Disequilibrium (LD), was an $r^2 < 0.8$. Genomic DNA was obtained from peripheral blood by salting-out. SNPs were genotyped by either fluorescence-based TaqMan or SEQUENOM Mass-ARRAY platforms. Family-based association and logistic multivariate analysis were performed in FBAT: Harvard University, Cambridge, MA, USA and SAS: SAS Institute, Cary, NC, USA, software, respectively. Genotype frequencies of cases and controls and the combined population were analysed by conditional logistic regression, as implemented in SAS.

Table 1. Candidate genes, genomic location and selected tag SNPs

Gene	Genomic location	Markers
<i>CDH1</i>	16q22.1	rs10431924, rs1801552, rs2011779, rs7186333, rs7196495, rs8056633, rs8059139 and rs9927789
<i>IL1B</i>	2q14	rs1143634, rs1143633 and rs3136558
<i>NOV</i>	8q24.12	rs2071519 and rs7014927

Results and discussion

There was positive evidence for association between vitiligo and the 'T' allele of marker rs10431924, a C → T substitution at position 68805399 of *CDH1* ($P = 0.04$). No evidence of association was observed for any additional marker. Independent case-control analysis, performed only for rs10431924, confirmed association, with borderline significance ($P = 0.07$). A combined analysis using cases from both samples and the controls from the case-control population confirmed association between rs10431924 and vitiligo ($P = 0.01$) (Table 2).

Stratified analysis by age of onset, autoimmune comorbidity, clinical type (segmental vs. non-segmental) and Koebner phenomenon revealed concentration of the association signal between rs10431924 and vitiligo among trios presenting autoimmune comorbidity ($P = 0.03$), a finding replicated in the case-control ($P = 0.06$) and combined populations ($P = 0.002$) (Table 2). No impact of the other covariants was observed.

In silico analysis showed rs10439324 – an intronic variant with no obvious functional impact – in proxy (perfect LD, $r^2 = 1.0$) with rs10431923 associated with Crohn's disease. In the same study, the authors showed that the risk allele of rs10431923 causes a smaller mRNA in intestinal biopsies, leading to a higher cytoplasmic localization of E-cadherin in enterocytes, in contrast with the normal plasma membrane localization observed in patients without the risk allele (6).

E-cadherin is a transmembrane anchor and a core component of the adherens junction of the epithelial sheet (Reference S1), expressed by epidermal melanocytes and functionally mediating its adhesion to keratinocytes *in vitro*, effect abolished in the presence of anticadherin antibodies (7). Comparison between lesional and non-lesional skin of patients with vitiligo shows reduced E-cadherin expression, as well as reduced fluorescence for anti-E-cadherin (Reference S2). A recent study, published as an abstract, suggests that reducing *CDH1* activity in mice and melanocytes of human reconstructed epidermis, in the presence of mechanical or oxidative stress, decreases pigmentation and number of basal melanocytes and increases melanocytes in suprabasal layers (Reference S3).

Table 2. Association of vitiligo and *CDH1* marker rs10431924 in the family-based and the case-control analysis, according to phenotypes

SNP	rs10431924		T' allele		
			Vitiligo	Vitiligo and autoimmune comorbidity	Vitiligo without autoimmune comorbidity
Phenotype	Family based	NF/NIF ¹	212/134	82/53	94/59
		Trans/Untrans ²	113/95	64/47	59/58
		P-value	0.04	0.03	0.84
	Case-control	OR ³ (CI ⁴ 95%)	1.6 (1.01–2.54)	2.22 (1.06–4.69)	1.13 (0.64–2.0)
		# Cases (% T/C)	125 (48.4/51.6)	47 (50/50)	64 (47.66/52.34)
		# Controls (% T/C)	108 (41.2/58.8)	108 (41.2/58.8)	108 (41.2/58.8)
	Combined	P-value	0.07	0.06	0.37
		OR (CI 95%)	1.55 (0.87–2.73)	2.04 (0.97–4.33)	0.75 (0.39–1.41)
		# Cases (% T/C)	294 (49.15/50.85)	125 (54/46)	154 (45.13/54.87)
		# Controls (% T/C)	108 (41.2/58.8)	108 (41.2/58.8)	108 (41.2/58.8)
		P-value	0.01	0.002	0.81
		OR (CI 95%)	1.63 (1.04–2.57)	2.61 (1.85–4.92)	0.93 (0.54–1.61)

¹NF/NIF, Number of families/number of informative families.

²trans/untrans, transmitted/untransmitted.

³OR, odds ratio.

⁴CI, confidence interval.

Interestingly, E-cadherin also anchors Langerhans cells to keratinocytes, regulating its tolerogenic differentiation. A dysfunction of this mechanism could induce autoimmune/inflammatory disease (8), an effect in accordance with our observation of concentration of association among patients presenting autoimmune comorbidities.

Some aspects of our findings are intriguing: no association was observed between vitiligo and the *CDH1* locus in genomewide association studies (GWAS) (References S4–S6), probably due to the use of highly stringent statistical corrections for multiple tests in GWAS that could result in missing of true association (Reference S7). The lack of association between vitiligo and *IL1B* polymorphisms is somewhat unexpected, given a recent study showing association between vitiligo progression and marker rs16944 of *IL1B* (9); the use of a distinct phenotype could explain the absence of replication in our population.

Defective melanocyte adhesion may impact on the pathogenesis of vitiligo (1–3, Reference S8) through distinct mechanisms. Previous studies have suggested a role of nitric oxide in regulating cell adhesion in cultured melanocytes; in addition, the effect of adhesion molecules in immunogenic cells has also been described

(8, References S9, S10). A dysfunctional E-cadherin could result in morphologic and functional impaired melanocytes, as well as a lower threshold of immune tolerance that, in the presence of oxidative or mechanical stress, could result in loss of melanocytes. Here, we reinforce the adhesion hypothesis for vitiligo pathogenesis by reporting association between the disease and a *CDH1* polymorphism, an effect particularly evident in the presence of autoimmune comorbidity.

Author contribution

RGT, CCSC, LMN and MTM designed the research study; RGT, LMN and MTM performed the research; RGT and MTM analysed the data; RGT and MTM wrote the manuscript.

Funding

This study was supported in part by the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The Mira Laboratory is supported by CNPq (process number: 303621/2011-7 Grant call: PQ – 2011, Produtividade em Pesquisa)

Conflict of interests

The authors have declared no conflicting interests.

References

- 1 Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S *et al*. *Br J Dermatol* 2003; **148**: 95–101.
- 2 Silva de Castro C C, do Nascimento L M, Walker G *et al*. *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 1813–1818.
- 3 Reichert-Faria A, Jung J E, Moreschi Neto V *et al*. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; **27**: 1057–1059.
- 4 Fukunaga-Kalabis M, Santiago-Walker A, Herlyn M. *Cancer Microenviron* 2008; **1**: 93–102.
- 5 Eswaramoorthy R, Wang C K, Chen W C *et al*. *J Cell Physiol* 2010; **224**: 387–397.
- 6 Muise A M, Walters T D, Glowacka W K *et al*. *Gut* 2009; **58**: 1121–1127.
- 7 Tang A, Eller M S, Hara M *et al*. *J Cell Sci* 1994; **107**(Pt 4): 983–992.
- 8 Fu C, Jiang A. *Immunol Res* 2010; **46**: 72–78.
- 9 Laddha N C, Dwivedi M, Mansuri M S *et al*. *PLoS ONE* 2014; **9**: e107020.

Supporting Information

Additional supporting data may be found in the supplementary information of this article. Supporting Information References S1–S10.

6 RESULTADOS COMPLEMENTARES

6.1 Gene *CDH1*

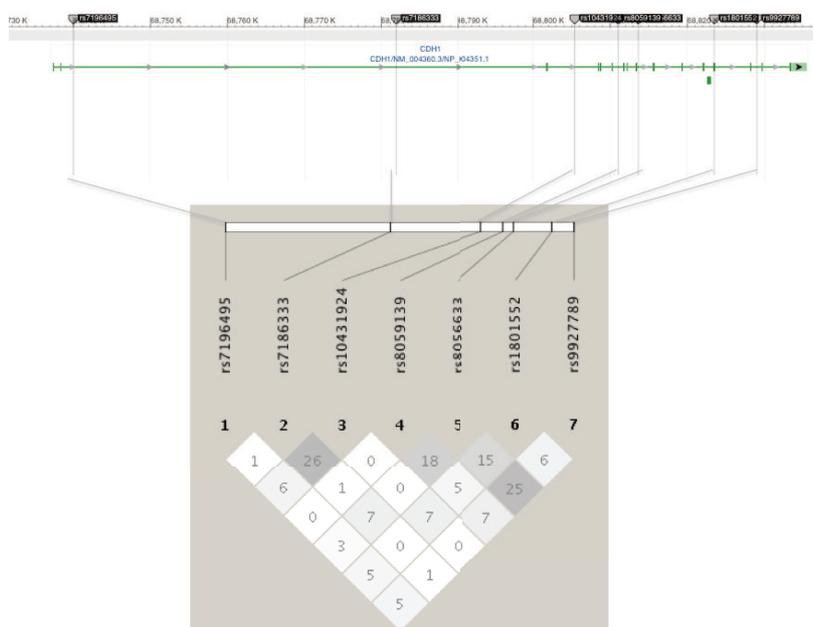


Figura 5: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *CDH1*. Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL em %, calculado utilizando-se o parâmetro de r^2 , a variação dos tons de cinza refletem a intensidade de DL entre os dois marcadores: quanto mais escuro o quadrado maior o DL entre os SNPs.

A distribuição das frequências alélicas dos marcadores do gene *CDH1* rs10431924, rs1801552, rs7186333, rs7196495, rs8056633, rs8059139 e rs9927789 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os marcadores não se encontravam em desequilíbrio de ligação, segundo o critério de $r^2 < 0,8$ (Figura 5). A análise de associação baseada em famílias dos marcadores do gene *CDH1* revelou associação com vitiligo *per se* ao alelo T do rs10431924 ($p=0,04$; OR=1,6; 95% IC, 1,01-2,54) (Tabela 7). Não houve evidência de associação entre os demais marcadores do gene *CDH1* e vitiligo *per se* e quando estratificado por sexo, idade, fenômeno de Köebner, presença ou não de doença autoimune e forma clínica. Uma análise independente em uma população caso-controle evidenciou associação com significância estatística marginal entre o rs10431924 e vitiligo *per se* ($p=0,07$; OR=1,55; IC, 0,87-2,73). Para confirmar a

associação anterior foi realizada outra análise combinada com os casos de ambas as populações e os controles da amostra de caso-controle ($p=0,01$; $OR=1,63$; 95% IC, 1,04-2,57).

Ao se estratificar para variáveis como idade, sexo, fenômeno de Köebner, presença ou não de doença autoimune e forma clínica, observamos uma concentração do sinal de associação do rs10431924 com vitiligo, na amostra de famílias, na presença de comorbidade autoimune ($p=0,03$, $OR= 2,22$; 95% IC,1,06-4,69), achado este replicado na população caso-controle ($p=0,06$, $OR=2,04$; 95 % CI, 0,97-4,33) e na análise combinada das populações ($p=0,002$, $OR=2,61$; IC, 1,85-4,92). Ao se estratificar para ausência de comorbidade autoimune, observamos perda dos sinais de associação.

6.2 Gene *NOV*

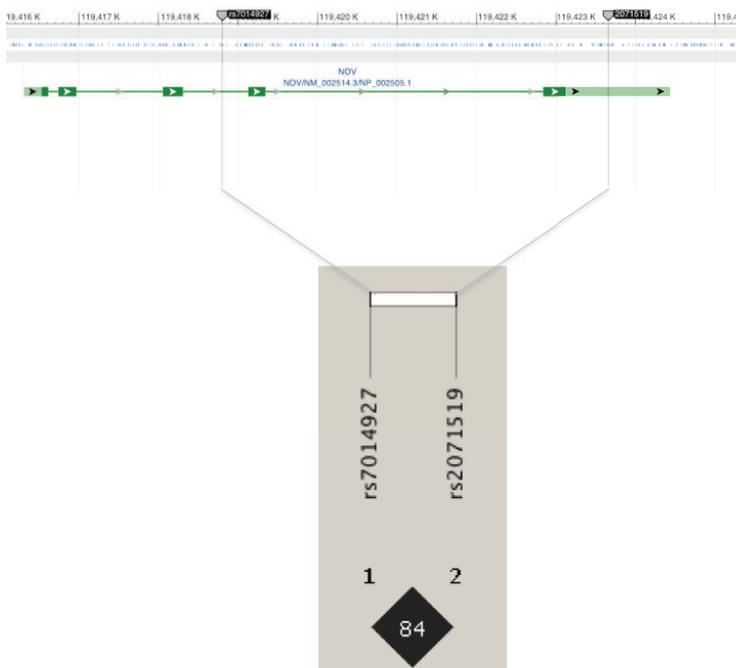


Figura 6: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *NOV*. Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL em %, calculado utilizando-se o parâmetro de r^2 , a variação dos tons de cinza refletem a intensidade de DL entre os dois marcadores: quanto mais escuro o quadrado maior o DL entre os SNPs.

A distribuição das frequências alélicas de ambos os marcadores do gene *NOV* testados, rs2071519 e rs7014927, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os marcadores se encontravam em desequilíbrio de ligação, segundo

o critério de $r^2 < 0,8$ (Figura 5). A análise de associação baseada em famílias dos SNPs rs2071519 e rs7014927 não revelou associação com vitiligo *per se* (Tabela 7). Também não houve evidência positiva de associação entre alelos de ambos os marcadores do gene *NOV* e vitiligo na amostra populacional estratificada por sexo, fenômeno de Köebner, presença ou não de doença autoimune e forma clínica (anexo 5).

6.3 Gene *IL1B*

O rs3136558 foi excluído das análises devido a baixa qualidade dos genótipos obtidos; assim, apenas os marcadores rs1143634 e rs1143633 foram testados para associação com vitiligo. As frequências alélicas dos marcadores estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra. Os marcadores não se encontravam em desequilíbrio de ligação, segundo o critério de $r^2 < 0,8$ (figura 4).

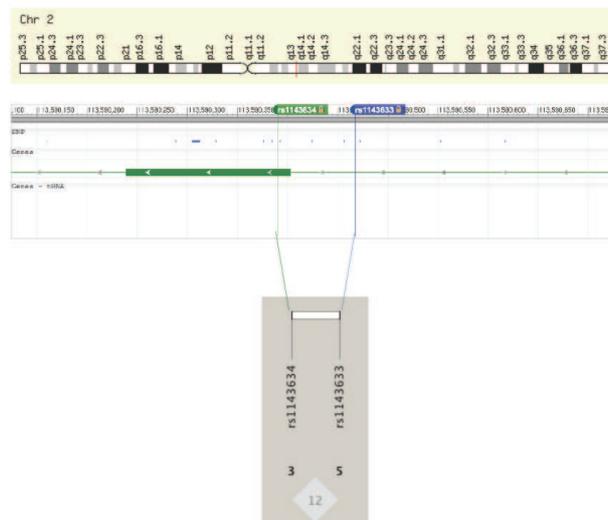


Figura 7: Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *IL1B*. Os números no interior dos quadrados indicam a proporção de DL em %, calculado utilizando-se o parâmetro de r^2 , a variação dos tons de cinza refletem a intensidade de DL entre os dois marcadores: quanto mais escuro o quadrado maior o DL entre os SNPs.

A análise de associação baseada em famílias dos SNPs rs1143634 e rs1143633 não revelou associação com vitiligo *per se* (tabela 7). Também não houve evidência positiva de associação entre alelos de ambos os marcadores de

IL1B e vitiligo na amostra populacional estratificada por sexo, fenômeno de Köebner, presença ou não de doença autoimune e forma clínica; evidência marginal de associação foi observada para o marcador rs1143633 na amostra contendo pacientes que manifestaram o vitiligo abaixo dos 18 anos ($p=0,06$, em modelo aditivo) e para o rs1143634 na amostra contendo apenas pacientes que manifestaram vitiligo após os 25 anos de idade ($p=0.05$, em modelo aditivo) (anexo 5).

Tabela 7: Análise de associação dos SNPs dos genes *CDH1*, *NOV* e *IL1B*.

Gene	Marcador	Alelo	Frequência alélica	Famílias informativas	F bat (p)	OR (95% IC)
<i>CDH1</i>	rs10431924	T	0.47	105	0.04	1.6 (1.01-2.54)
	rs1801552	T	0.36	114	0.38	1.19 (0.79-1.79)
	rs7186333	T	0.68	58	0.14	1.59 (0.85-2.97)
	rs7196495	G	0.17	59	0.72	0.91 (0.53-1.56)
	rs8056633	C	0.23	80	0.9	1.03 (0.64-1.64)
	rs8059139	G	0.1	46	0.22	1.46 (0.79-2.69)
	rs9927789	T	0.1	8	0.4	2.47 (0.28-21.20)
<i>NOV</i>	rs2071519	A	0.75	29	0.51	1.37 (0.54-3.47)
	rs7014927	T	0.71	38	0.63	0.84 (0.41-1.72)
<i>IL1B</i>	rs1143633	C	0.63	42	0.33	0.719 (0.37-1.39)
	rs1143634	G	0.23	80	1.0	1.000 (0.36-2.75)

F BAT, Family based association test. p, valor de p. OR, Odds Ratio. IC, Intervalo de confiança

7 DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

Dados de literatura vêm trazendo suporte à hipótese de que um defeito de adesão dos melanócitos esteja implicada na patogênese do vitiligo (24, 86, 87). Observamos em nossas análises a associação do marcador rs10431924 do gene *CDH1* e vitiligo *per se*, em uma população de famílias, achado este replicado na população caso controle e subsequentemente em análise combinada com maior significância estatística. Ao se estratificar a população para a presença de comorbidade autoimune podemos observa uma maior concentração do sinal de associação.

É interessante observar que o vitiligo tem sido considerado um distúrbio funcional e estrutural da interação do melanócito e queratinócito e que em fase inicial da doença queratinócitos apoptóticos têm sido demonstrados. Um estudo recente demonstrou que a inibição de duas quinases, a PI3K (Fosfatidil inositol-3 quinase) e a AKT (também conhecida como PKB, fosfoquinase B) induzem a um estado pró-apoptótico do queratinócito (88). Por sua vez, a ativação da PI3K é dependente da adesão celular mediada pela E-caderina, molécula de adesão importante para a diferenciação de queratinócitos (89).

A aquaporina 3 (AQP3), uma proteína transmembrana de tecidos epiteliais, com ação antiapoptótica em queratinócitos, co-acumula com E-caderina. Sugere-se que a PI3K seja dependente de E-caderina e que a AQP3 tenha um papel na ativação desta quinase, tendo sido demonstrado que a inibição da AQP3 em cultura de queratinócitos humanos resulta em diminuição da fosforilação da PI3K e diminuição da expressão de E-caderina (90).

Foi demonstrada expressão reduzida de AQP3 em pele despigmentada, quando comparada à pele normal de portadores de vitiligo, também foi observado que cultura de queratinócitos *knockdown* para AQP3 apresentam menor expressão de E-caderina, β -catenina e γ -catenina, este mesmo estudo demonstrou menor expressão de AQP3 e E-caderina na pele lesionada em comparação com pele normal (90).

A demonstração de apoptose, da menor expressão de AQP3 e E-caderina na epiderme lesionada, bem como a diminuição da sobrevivência de queratinócitos *knockdown* para AQP3 (90). Sugerem que a comunicação intercelular do queratinócito e melanócito tem um papel importante para o funcionamento adequado destas células e que a participação da E-caderina pode ser importante neste processo.

Em um estudo comparando vitiligo ativo, com vitiligo estável e pele normal, foi demonstrada alteração morfológica de melanócitos, apresentando dendritos mais curtos e mais achatados em sua extremidade, evidenciou-se também menor adesão do melanócito de vitiligo ativo ao colágeno do tipo IV, quando comparado ao vitiligo estável ou ao controle. Neste estudo também foi demonstrado aumento da caspase 3, um importante marcador de apoptose

celular, em células de vitiligo instável, quando comparadas com vitiligo estável e controle (91).

As células de Langerhans, presentes na epiderme também expressam E-caderina em sua superfície e estão ancoradas aos queratinócitos ao seu redor através desta proteína de adesão (92). Uma importante função destas células dendríticas é manter tolerância a proteínas próprias do indivíduo ("self"), uma falha nesta ação levaria a um processo inflamatório ou autoimune. Foi demonstrado que a ativação de células dendríticas via E-caderina não aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, o que pode contribuir para maior tolerância imunológica e não indução de um processo autoimune (92).

Dados de literatura mostram evidências da importância da E-caderina na comunicação intercelular entre o melanócito e o queratinócito (78), também é interessante observarmos o papel da E-caderina na maturação de células dendríticas, com importante papel na tolerância imunológica,, conseqüentemente levando a um estado de equilíbrio imunológico contra tecidos próprios. Os nossos dados, evidenciando associação do vitiligo com polimorfismo do gene *CDH1*, codificador da E-caderina, trazem suporte a este defeito da interação queratinócito e melanócito, bem como a concentração do sinal nos portadores de comorbidades autoimune, em conjunto com o papel desta proteína de adesão na maturação de células dendríticas, sugerem que a E-caderina possa ter um papel na interação entre o melanócito, o queratinócito. e a células de Langerhans na epiderme, na patogenia do vitiligo.

8 CONCLUSÕES

1. Foi encontrada associação significativa entre vitiligo e o marcador rs10431924 do gene *CDH1* ($p=0,04$), na amostra populacional composta por trios formados por filhos afetados com vitiligo e seus pais.
2. A odds ratio para a associação do rs10431924 e vitiligo foi de 1,6 (1,1-2,54, IC 95%) indicando maior suscetibilidade ao vitiligo.
3. O sinal de associação entre o rs10431924 e vitiligo apresentou concentração em pacientes portadores de comorbidades autoimune ($p=0,03$, OR= 2,22; 95% IC, 1,06-4,69).
4. A análise independente em uma população caso-controle evidenciou associação com significância estatística marginal entre o rs 10431924 e vitiligo *per se* ($p=0,07$; OR=1,55; IC, 0,87-2,73). A evidência de associação do marcador com vitiligo na presença de comorbidade autoimune também foi replicada, com valor marginal, na população caso-controle ($p=0,06$, OR=2,04; 95 % IC, 0,97-4,33).
5. A análise combinada usando casos de ambas às populações e os controles da amostra de caso-controle revelou evidência positiva de associação com vitiligo ($p=0,01$; OR=1,63; 95% IC, 1,04-2,57) e na presença de comorbidade autoimune ($p=0,002$, OR=2,61; IC, 1,85-4,92).

9 REFERÊNCIAS

1. Halder RM, Chappell JL. Vitiligo update. *Semin Cutan Med Surg.* 2009;28(2):86-92.
2. Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(10):1144-50.
3. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, 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(1):63-7.
4. Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol.* 1977;113(1):47-52.
5. Mehta NR, Shah KC, Theodore C, Vyas VP, Patel AB. Epidemiological study of vitiligo in Surat area, South Gujarat. *Indian J Med Res.* 1973;61(1):145-54.
6. Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz RA. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res.* 2003;16(3):208-14.
7. Zhang Z, Xu SX, Zhang FY, Yin XY, Yang S, Xiao FL, et al. The analysis of genetics and associated autoimmune diseases in Chinese vitiligo patients. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(2):167-73.
8. Millington GW, Levell NJ. Vitiligo: the historical curse of depigmentation. *Int J Dermatol.* 2007;46(9):990-5.
9. Goldman L, Moraites RS, Kitzmiller KW. White spots in biblical times. A background for the dermatologist for participation in discussions of current revisions of the bible. *Arch Dermatol.* 1966;93(6):744-53.
10. Lerner AB. Vitiligo. *The Journal of investigative dermatology.* 1959;32(2, Part 2):285-310.
11. Gawkrödger DJ, Ormerod AD, Shaw L, Mauri-Sole I, Whitton ME, Watts MJ, et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *The British journal of dermatology.* 2008;159(5):1051-76.
12. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(3):473-91.
13. Lotti T, Gori A, Zanieri F, Colucci R, Moretti S. Vitiligo: new and emerging treatments. *Dermatol Ther.* 2008;21(2):110-7.
14. Huggins RH, Schwartz RA, Janniger CK. Vitiligo. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2005;14(4):137-42, 44-5.
15. Taieb A, Picardo M, Members V. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force. *Pigment Cell Res.* 2007;20(1):27-35.
16. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CC, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(3):E1-13.

17. Spielvogel RaK, G. Pigmentary disorder of the skin. In: Elder D, editor. *Lever's Histopathology of the skin*. 8th ed. Philadelphia: Raven Publishers; 1997. p. 617-23.
18. Yaghoobi R, Omidian M, Bagherani N. Vitiligo: a review of the published work. *J Dermatol*. 2011;38(5):419-31.
19. Castanet J, Ortonne JP. Pathophysiology of vitiligo. *Clin Dermatol*. 1997;15(6):845-51.
20. Passeron T, Ortonne JP. Physiopathology and genetics of vitiligo. *Journal of autoimmunity*. 2005;25 Suppl:63-8.
21. Westerhof W. Vitiligo--a window in the darkness. *Dermatology*. 1995;190(3):181-2.
22. Al'Abadie MS, Warren MA, Bleehe SS, Gawkrödger DJ. Morphologic observations on the dermal nerves in vitiligo: an ultrastructural study. *Int J Dermatol*. 1995;34(12):837-40.
23. Gauthier Y, Cario Andre M, Taieb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res*. 2003;16(4):322-32.
24. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Walker G, Werneck RI, Nogoceke E, Mira MT. Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(7):1813-8.
25. Schork NJ. Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(4 Pt 2):S103-9.
26. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-53.
27. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*. 2012;90(1):7-24.
28. Alkhateeb A, Stetler GL, Old W, Talbert J, Uhlhorn C, Taylor M, et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. *Hum Mol Genet*. 2002;11(6):661-7.
29. Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ. Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *American journal of human genetics*. 1994;55(5):981-90.
30. Spritz RA. The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Res*. 2007;20(4):271-8.
31. Foley LM, Lowe NJ, Misheloff E, Tiwari JL. Association of HLA-DR4 with vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8(1):39-40.
32. al-Fouzan A, al-Arbash M, Fouad F, Kaaba SA, Mousa MA, al-Harbi SA. Study of HLA class I/II and T lymphocyte subsets in Kuwaiti vitiligo patients. *Eur J Immunogenet*. 1995;22(2):209-13.
33. Finco O, Cuccia M, Martinetti M, Ruberto G, Orecchia G, Rabbiosi G. Age of onset in vitiligo: relationship with HLA supratypes. *Clin Genet*. 1991;39(1):48-54.
34. Dunston GM, Halder RM. Vitiligo is associated with HLA-DR4 in black patients. A preliminary report. *Arch Dermatol*. 1990;126(1):56-60.
35. Metzker A, Zamir R, Gazit E, David M, Feuerman EJ. Vitiligo and the HLA system. *Dermatologica*. 1980;160(2):100-5.

36. Orecchia G, Perfetti L, Malagoli P, Borghini F, Kipervarg Y. Vitiligo is associated with a significant increase in HLA-A30, Cw6 and DQw3 and a decrease in C4AQ0 in northern Italian patients. *Dermatology*. 1992;185(2):123-7.
37. Lorini R, Orecchia G, Martinetti M, Dugoujon JM, Cuccia M. Autoimmunity in vitiligo: relationship with HLA, Gm and Km polymorphisms. *Autoimmunity*. 1992;11(4):255-60.
38. Venkataram MN, White AG, Leeny WA, al Suwaid AR, Daar AS. HLA antigens in Omani patients with vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 1995;20(1):35-7.
39. Venneker GT, Westerhof W, de Vries IJ, Drayer NM, Wolthers BG, de Waal LP, et al. Molecular heterogeneity of the fourth component of complement (C4) and its genes in vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1992;99(6):853-8.
40. Tastan HB, Akar A, Orkunoglu FE, Arca E, Inal A. Association of HLA class I antigens and HLA class II alleles with vitiligo in a Turkish population. *Pigment Cell Res*. 2004;17(2):181-4.
41. Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21(7):865-76.
42. 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(2):205-13.
43. Zamani M, Spaepen M, Sghar SS, Huang C, Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L, et al. Linkage and association of HLA class II genes with vitiligo in a Dutch population. *The British journal of dermatology*. 2001;145(1):90-4.
44. Buc M, Fazekasova H, Cechova E, Hegyi E, Kolibasova K, Ferencik S. Occurrence rates of HLA-DRB1, HLA-DQB1, and HLA-DPB1 alleles in patients suffering from vitiligo. *Eur J Dermatol*. 1998;8(1):13-5.
45. 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(4):334-42.
46. Fain PR, Babu SR, Bennett DC, Spritz RA. HLA class II haplotype DRB1*04-DQB1*0301 contributes to risk of familial generalized vitiligo and early disease onset. *Pigment Cell Res*. 2006;19(1):51-7.
47. Xia Q, Zhou WM, Liang YH, Ge HS, Liu HS, Wang JY, et al. MHC haplotypic association in Chinese Han patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20(8):941-6.
48. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genes of the LMP/TAP cluster are associated with the human autoimmune disease vitiligo. *Genes Immun*. 2003;4(7):492-9.
49. Namian AM, Shahbaz S, Salmanpoor R, Namazi MR, Dehghani F, Kamali-Sarvestani E. Association of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with susceptibility to vitiligo in Iranian patients. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):21-5.
50. Casp CB, She JX, McCormack WT. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res*. 2002;15(1):62-6.
51. Park HH, Ha E, Uhm YK, Jin SY, Kim YJ, Chung JH, et al. Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Exp Dermatol*. 2006;15(5):377-80.

52. Kemp EH, Ajjan RA, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Cork MJ, Watson PF, et al. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol.* 1999;140(1):73-8.
53. Blomhoff A, Kemp EH, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Husebye ES, Akselsen HE, et al. CTLA4 polymorphisms are associated with vitiligo, in patients with concomitant autoimmune diseases. *Pigment Cell Res.* 2005;18(1):55-8.
54. Jin SY, Park HH, Li GZ, Lee HJ, Hong MS, Hong SJ, et al. Association of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism of vitiligo in Korean population. *Pigment Cell Res.* 2004;17(1):84-6.
55. Canton I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Blomhoff A, Watson PF, et al. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun.* 2005;6(7):584-7.
56. LaBerge GS, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1757-62.
57. Tursen U, Kaya TI, Erdal ME, Derici E, Gunduz O, Ikizoglu G. Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. *Arch Dermatol Res.* 2002;294(3):143-6.
58. Onay H, Pehlivan M, Alper S, Ozkinay F, Pehlivan S. Might there be a link between mannose binding lectin and vitiligo? *Eur J Dermatol.* 2007;17(2):146-8.
59. Kim HJ, Choi CP, Uhm YK, Kim YI, Lee JW, Yoon SH, et al. The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population. *Exp Dermatol.* 2007;16(7):561-6.
60. Li M, Sun D, Li C, Zhang Z, Gao L, Li K, et al. Functional polymorphisms of the FAS gene associated with risk of vitiligo in Chinese populations: a case-control analysis. *J Invest Dermatol.* 2008;128(12):2820-4.
61. Tazi-Ahnini R, McDonagh AJ, Wengraf DA, Lovewell TR, Vasilopoulos Y, Messenger AG, et al. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):591-6.
62. Lu T, Yu S, Fan D, Mu J, Shangguan Y, Wang Z, et al. Collection and comparative analysis of 1888 full-length cDNAs from wild rice *Oryza rufipogon* Griff. W1943. *DNA Res.* 2008;15(5):285-95.
63. Nath SK, Kelly JA, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, et al. Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *American journal of human genetics.* 2001;69(6):1401-6.
64. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2007;356(12):1216-25.
65. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *The Journal of investigative dermatology.* 2007;127(11):2558-62.
66. Fain PR, Gowan K, LaBerge GS, Alkhateeb A, Stetler GL, Talbert J, et al. A genomewide screen for generalized vitiligo: confirmation of AIS1 on chromosome 1p31 and evidence for additional susceptibility loci. *American journal of human genetics.* 2003;72(6):1560-4.

67. 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(1):188-91.
68. Alkhateeb A, Fain PR, Spritz RA. Candidate functional promoter variant in the FOXD3 melanoblast developmental regulator gene in autosomal dominant vitiligo. *The Journal of investigative dermatology.* 2005;125(2):388-91.
69. 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(6):1057-65.
70. 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. *The Journal of investigative dermatology.* 2007;127(11):2552-7.
71. Ren Y, Yang S, Xu S, Gao M, Huang W, Gao T, et al. Genetic variation of promoter sequence modulates XBP1 expression and genetic risk for vitiligo. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000523.
72. 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. *The Journal of investigative dermatology.* 2011;131(2):371-81.
73. Birlea SA, Gowan K, Fain PR, Spritz RA. Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMOC2, in close proximity to IDDM8. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(3):798-803.
74. 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(18):1686-97.
75. Quan C, Ren YQ, Xiang LH, Sun LD, Xu AE, Gao XH, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nature genetics.* 2010;42(7):614-8.
76. 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. *The Journal of investigative dermatology.* 2012.
77. Fukunaga-Kalabis M, Santiago-Walker A, Herlyn M. Matricellular proteins produced by melanocytes and melanomas: in search for functions. *Cancer Microenviron.* 2008;1(1):93-102.
78. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 4):983-92.
79. Fukunaga-Kalabis M, Martinez G, Liu ZJ, Kalabis J, Mrass P, Weninger W, et al. CCN3 controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. *J Cell Biol.* 2006;175(4):563-9.
80. 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. *Experimental dermatology.* 2012.
81. Craiglow BG. Vitiligo in early American history: the case of Henry Moss. *Arch Dermatol.* 2008;144(9):1242.

82. Taieb A. NALP1 and the inflammasomes: challenging our perception of vitiligo and vitiligo-related autoimmune disorders. *Pigment Cell Res.* 2007;20(4):260-2.
83. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(2):408.
84. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(4):301-6.
85. Thomson G, Esposito MS. The genetics of complex diseases. *Trends Cell Biol.* 1999;9(12):M17-20.
86. Gauthier Y, Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Taieb A. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *The British journal of dermatology.* 2003;148(1):95-101.
87. Reichert-Faria A, Jung JE, Moreschi Neto V, Silva de Castro CC, Mira MT, Noronha L. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) in vitiligo skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(8):1057-9.
88. Lee AY. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. *Annals of dermatology.* 2012;24(2):115-25.
89. Xie Z, Bikle DD. The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C-gamma1 activation and human keratinocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(12):8695-703.
90. Kim NH, Lee AY. Reduced aquaporin3 expression and survival of keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(9):2231-9.
91. Kumar R, Parsad D, Kanwar AJ. Role of apoptosis and melanocytorrhagy: a comparative study of melanocyte adhesion in stable and unstable vitiligo. *The British journal of dermatology.* 2011;164(1):187-91.
92. Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity.* 2007;27(4):610-24.

10 ANEXO

10.1 ANEXO 1 – Termo De Consentimento Livre e esclarecido

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Suscetibilidade ao vitiligo

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) estará realizando um estudo que irá investigar o papel da genética na suscetibilidade ao vitiligo e na gravidade da doença. Se bem sucedido, o projeto poderá facilitar o tratamento do vitiligo e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, seus familiares e pessoas próximas. Este estudo será coordenado por Dr. Marcelo Távora Mira, professor adjunto e pesquisador do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR.

1) Métodos

Se você concordar em participar neste estudo, você será submetido a um exame médico e coleta de uma amostra de sangue de seu antebraço, com uma agulha nova e descartável, após assepsia local (limpeza). A amostra de sangue será usada para extração de ácidos nucléicos (DNA, seu material genético). O DNA será enviado a um laboratório para um teste chamado “genotipagem” que irá permitir aos cientistas estudar as características genéticas que tornam mais fácil para alguns indivíduos e seus familiares contrair vitiligo e desenvolver os diferentes tipos clínicos da doença. Sob sua autorização, informações de prontuários clínicos também poderão ser lidas pelos cientistas e utilizadas no estudo.

2) Local do estudo

Os procedimentos descritos acima serão realizados parte no Consultório de Dermatologia ou no Hospital Santa Casa de Misericórdia da PUCPR, (avaliação clínica e coleta sanguínea), parte nos laboratórios da PUCPR e instituições associadas (testes laboratoriais). Colaboração entre a PUCPR e

outros institutos de pesquisa deverão aumentar as chances de sucesso e o impacto do estudo. Portanto, está sendo requerida sua autorização para o uso de sua amostra em estudos do vitiligo envolvendo outras instituições. Sua autorização só valerá sob a condição de se manter o desenho, objetivos e metodologia do projeto original, além da avaliação e aprovação de eventuais alterações pelo Comitê de Ética da PUCPR.

3) Permissão para estocagem

Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem da sua amostra de DNA na PUCPR. Se assinar esse termo de consentimento, você está autorizando estocagem de longo prazo de sua amostra de DNA. Sua amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que sua amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas sim será estocada pelo tempo que ela durar. Embora pequenas quantidades de sua amostra possam ser enviadas a instituições colaboradoras para análise, não haverá estocagem de amostras em outras instituições além da PUCPR. Amostras estocadas serão usadas exclusivamente para fins de pesquisa. Amostras estocadas poderão ser utilizadas para estudos adicionais de suscetibilidade ao vitiligo. Nenhuma outra doença será investigada. O uso da sua amostra estocada terá como condição uma nova avaliação e aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética pertinente.

4) Riscos Físicos para Saúde/Desconfortos

Os riscos físicos para saúde de participação neste estudo são muito pequenos e limitados ao procedimento de coleta de sangue. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir um desconforto temporário devido à introdução da agulha. A coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada.

5) Tratamento e Compensação por Danos

Se você desenvolver infecção localizada devido ao procedimento de coleta de sangue, o tratamento será providenciado pela PUCPR. O custo deste tratamento será totalmente coberto pelo projeto.

6) Alternativas

Se você estiver afetado por vitiligo, acesso a procedimentos médicos para diagnóstico e tratamento da doença será providenciado mesmo que não queira participar do estudo. Portanto, se você decidir não participar, ou cessar sua participação no estudo a qualquer momento, todos os procedimentos para diagnósticos e tratamento médico serão mantidos pelo Hospital Santa Casa de Misericórdia da PUCPR e instituições colaboradoras.

Se você não estiver afetado pelo vitiligo, você está sendo convidado a participar do estudo como parte do grupo controle ou como familiar do afetado. Neste caso, sua decisão de participar ou não, ou de cessar sua participação a qualquer momento, não irá interferir de nenhuma forma nos procedimentos médicos para diagnóstico ou tratamento do vitiligo que você possa necessitar no futuro. Da mesma forma, sua decisão não irá refletir no acesso a procedimentos médicos necessários à algum familiar ou contato afetado pelo vitiligo.

7) Custos para os participantes

No caso de você decidir participar do estudo, você não terá nenhum custo. Custos com testes laboratoriais e análises de suas amostras para propósito de pesquisa serão cobertos pelo estudo.

8) Benefícios

A longo prazo, os procedimentos médicos e laboratoriais aos quais você será submetido poderão facilitar a detecção de resistência ao tratamento do vitiligo, tornando possível evitar tratamentos inadequados. Além disso, espera-se que conhecimentos científicos adicionais sejam alcançados, com consequente melhoria do tratamento de pessoas afetadas pelo vitiligo.

9) Reembolso

Você não será reembolsado por participar deste estudo.

10) Exclusividade do uso do material genético

Amostras de DNA SERÃO UTILIZADAS APENAS PARA PESQUISA DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO. Nenhuma outra doença será estudada. Se, devido a situações imprevistas, os pesquisadores descobrirem alguma informação relacionada a suscetibilidades que não ao vitiligo, você será aconselhado a procurar seu médico para um exame completo. Você não terá acesso a nenhuma informação genética específica que nós produzirmos. Todos os resultados obtidos no estudo, após análise do conjunto completo dos dados, serão publicados em artigos científicos. Como estes dados publicados serão usados por outros investigadores é desconhecido. Importante reafirmar, o alvo de nossos estudos é a identificação do fator de risco genético ao vitiligo.

11) Confidencialidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade. Além disso, a descoberta de fatores de risco genéticos para vitiligo

podem expor suscetibilidades de certos grupos de pessoas, possivelmente levando a outros ou certas empresas a considerar estes grupos diferentes de uma forma negativa. Entretanto, procedimentos serão adotados pelos responsáveis por este estudo no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você fornecer e as informações produzidas pelo projeto. Nenhuma informação genética individual será tornada pública. As informações serão codificadas e mantidas num local reservado o tempo todo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso às informações. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos de computador, mantidos em local restrito com acesso permitido apenas aos mesmos pesquisadores. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

CONSENTIMENTO

Estudo de Fatores de Riscos Genéticos de Suscetibilidade ao vitiligo

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento para mantê-lo consigo. Se você tiver qualquer dúvida no futuro sobre a sua participação neste estudo, você pode e deve utilizar os seguintes meios de contato com o pesquisador responsável:

Dr. Marcelo Távora Mira

Telefone: (41) 3271-2618

Celular: (41) 96318997

E-mail: m.mira@pucpr.br

A PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA É VOLUNTARIA

Você tem o direito de não concordar em participar ou mesmo de se retirar do estudo em qualquer momento que queira, sem riscos para o seu tratamento médico. Se você desejar e concordar em participar, deve assinar ou fornecer sua impressão digital na linha apropriada abaixo.

Se você desejar participar do estudo, permitirá que seu endereço e telefone sejam anotados em uma folha separada, para facilitar contato quando necessário. Como já foi esclarecida anteriormente, toda informação, pessoal será mantida em sigilo.

Assinatura/impressão digital do voluntário

Nome completo e nº do prontuário

Assinatura do entrevistador

Nome do entrevistador

Assinatura testemunha 1

Assinatura testemunha 2

____/____/____
Data

10.2 ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ

RESEARCH ETHICS COMMITTEE

Curitiba (Brazil), 2008-02-12

To whom it may concerns

We hereby, certify that the study entitled "**ESTUDO DE FATORES DE RISCO GENÉTICOS DE SUSCETIBILIDADE AO VITILIGO**" (**PORTUGUESE VERSION**), was submitted to the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná. After analysis the project was approved for execution at the committee meeting of **September 5, 2007**, under the protocol number **1975**.

The protocol was submitted and approved by the Brazilian National Commission on Ethics in Research (CONEP), under the protocol number **14394**.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Surugi de Siqueira', is written over a horizontal line.

Prof. Sergio Surugi de Siqueira, Ph.D.

Coordinator

Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná



10.3 ANEXO 3 – Artigos de revisão publicado no periódico Anais Brasileiro de Dermatologia

REVISÃO

461

Vitiligo - Parte 1*

Roberto Gomes Tarlé^{1,2}
Marcelo Távora Mira¹

Liliane Machado do Nascimento¹
Caio Cesar Silva de Castro^{1,2}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142573>

Resumo: O vitiligo é uma doença crônica estigmatizante, já conhecida há milênios, que afeta, principalmente, os melanócitos da camada basal da epiderme, causando lesões hipocrômicas e acrômicas. Estima-se que a enfermidade ocorra em aproximadamente 0,5% da população mundial. O envolvimento de fatores genéticos na suscetibilidade ao vitiligo vem sendo estudado ao longo das últimas décadas e os resultados dos estudos já realizados permitem considerar o vitiligo como uma doença complexa, multifatorial e poligênica. Neste contexto, certos genes, entre eles o XBP1, DDR1 e NLRP1, têm sido consistentemente associados funcionalmente à doença. Não obstante, fatores ambientais que precipitem ou mantenham a doença ainda não foram descritos. A etiopatogenia do vitiligo ainda não foi totalmente esclarecida e várias teorias têm sido propostas. Destas, a hipótese autoimune é hoje a mais citada e estudada entre os especialistas. Disfunções em vias metabólicas, que levariam à produção de metabólitos tóxicos e provocariam danos aos melanócitos, têm sido também investigadas. O déficit de adesão dos melanócitos em pacientes com vitiligo tem sido especulado principalmente através do aparecimento do fenômeno de Köebner. Recentemente, novos genes e proteínas envolvidas com este déficit têm sido encontrados.

Palavras-chave: Autoimunidade; Epidemiologia; Estudos de associação genética; Ligação genética; Vitiligo

INTRODUÇÃO

O vitiligo é uma doença sistêmica crônica adquirida, que apresenta evolução clínica imprevisível, caracterizada pelo surgimento de máculas e manchas acrômicas ou hipocrômicas em pele e mucosas devido ao desaparecimento dos melanócitos nas áreas afetadas. Estas lesões podem apresentar-se em diferentes formas e tamanhos e podem estar presentes em qualquer área do tegumento.

Além de o vitiligo afetar pele e mucosas, levando-se em conta que existem melanócitos nos aparelhos ocular (predominantemente no trato uveal) e auditivo (nas estrias vasculares e no modíolo da cóclea), podem também ocorrer, além da diminuição desses melanócitos, enfermidades oculares como uveítes ou mesmo

hipoacusia neurossensorial, conforme já detectadas em 13 a 16% de pacientes de estudos anteriores.^{1,2} No entanto, uma das principais consequências da doença é psíquica porque o vitiligo pode gerar grande impacto sobre a autoestima dos pacientes, com aumento dos casos de depressão grave, um forte sentimento de discriminação social e consequente diminuição da qualidade de vida desses pacientes.^{3,4}

ASPECTOS HISTÓRICOS

Os mais antigos textos sobre uma doença semelhante ao vitiligo, como hoje é conhecido, datam de 1500 AC. Estão presentes em escritos sagrados hindus ("Vedas"), com a denominação de *kil̥̄ṣa*, e em textos

Recebido em 25.02.2013.

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 25.05.2013.

* Trabalho realizado na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba- Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) - Curitiba (PR), Brasil.

Suporte Financeiro: Nenhum.

Conflito de Interesses: Nenhum.

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) - Curitiba (PR), Brasil.

² Santa Casa de Misericórdia de Curitiba - Curitiba (PR), Brasil.

©2014 by Anais Brasileiros de Dermatologia

An Bras Dermatol. 2014;89(3):461-71.

(papiros) do antigo Egito. ⁷ Existem várias referências no Antigo Testamento, principalmente no Levítico XIII, ao termo *Zoriat* ou *Tzaraut* que, em hebreu clássico, significaria "manchas brancas", mas existem controvérsias quanto à possibilidade de essa doença ser realmente o vitiligo.

O termo latino *vitiligo* surge no primeiro século dC, usado por Celsus no tratado clássico de Medicina. Entretanto, a raiz latina do termo é desconhecida e entre as outras palavras Latinas citadas estão algumas palavras com significados semelhantes, como *viteilius* e *vituli*, que comparam as lesões acrómicas ou hipocrômicas do vitiligo às manchas brancas observadas em bezerras, ou *vitium*, que significa defeito ou falha. ⁸

No século XIX, Brocq e Kaposi estavam entre os primeiros a descrever tanto os aspectos clínicos, como acromia e hiperpigmentação nas bordas das lesões, quanto a histopatologia, na qual Kaposi descreveu a ausência de grânulos de pigmento nas células da camada basal da epiderme. ⁹

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A doença afeta, igualmente, ambos os sexos e pode manifestar-se em qualquer idade. A média de idade de início do vitiligo praticamente se mantém em diferentes regiões geográficas ¹⁰ e varia entre 22 anos nos EUA e Índia, 24 no Brasil até 25 anos na Inglaterra. Além disso, diferenças na média de idade de início do vitiligo têm sido relatadas entre casos de vitiligo familiar e esporádico. ¹¹⁻⁸

A prevalência do vitiligo tem sido estimada entre 0,093% na China, 0,34% na ilha de Martinica, 0,38% na Dinamarca, 1% nos EUA e de 0,5% a 1,13% na Índia. ¹²⁻¹⁴ ¹⁰ O Brasil não possui dados epidemiológicos atualizados relativos à incidência e à prevalência da doença.

Com o desaparecimento dos melanócitos nos indivíduos afetados por vitiligo, seria esperada uma maior incidência de câncer não melanoma e ceratoses actínicas; não obstante, dados experimentais evidenciam o contrário; desse modo, alguns autores formularam a hipótese de que esta baixa incidência de câncer de pele ocorreria por uma superexpressão da proteína p53, que teria um efeito anticarcinogênico. Já foi demonstrada, por meio de estudo imuno-histoquímico, uma maior expressão de p53 tanto na pele afetada por vitiligo quanto na pele não afetada desses mesmos indivíduos, quando comparada à pele de controles com história de carcinoma basocelular. ¹⁵⁻²² Além disso, a reduzida expressão de CD3 (que contribui para a apoptose de queratinócitos) induziria a um mecanismo compensatório de espessamento epidérmico para proteger a pele afetada dos danos da radiação UV. ²³ Finalmente, em dois estudos recentes retrospectivos, não foi detectado um aumento estatisticamente signifi-

cativo de câncer de pele não melanoma ou câncer de pele não melanoma e melanoma em pacientes com vitiligo quando comparados à população em geral. Além disso, neste último estudo retrospectivo, também não foi encontrada uma tendência ao aumento de prevalência desses cânceres de pele no subgrupo de pacientes que foi submetido a tratamento com PUVA e Narrow-Band UVB, ajustados por idade e tempo de exposição durante a vida. ^{24,25}

GENÉTICA DO VITILIGO

A maioria das doenças humanas resulta da interação entre variantes genéticas e fatores ambientais. Estabelecer a real contribuição dos fatores genéticos é o estágio inicial dos estudos genéticos de doenças complexas. Em termos gerais, a dissecação do componente genético de doenças complexas inicia-se por meio de estudos observacionais, tais como: análises de agregação familiar de casos, estudos comparativos de taxas de concordância da ocorrência da doença entre gêmeos monozióticos (MZ) e dizigóticos (DZ) e análises de segregação complexa (ASC). Entretanto, estes estudos não fornecem informações sobre a exata natureza do componente genético em questão, como a localização e a identidade dos genes envolvidos. Para se avançar, é necessária a adoção de modelos de estudos envolvendo marcadores genéticos moleculares, tal como é feito nas análises de ligação e associação.

Estudos de genética epidemiológica têm demonstrado que o vitiligo pode ser considerado uma doença genética complexa, pois: (i) a doença varia na gravidade dos sintomas e idade de início, o que resulta em dificuldades na definição do fenótipo apropriado e na seleção da melhor população para estudo; idade de início precoce foi associada à ocorrência familiar de vitiligo generalizado. ^{10,26} Além disso, vitiligo de início precoce está associado à maior gravidade da doença; ²¹ (ii) a doença pode variar em seu mecanismo etiológico; a etiopatogenia do vitiligo ainda não foi totalmente esclarecida, sendo que várias teorias têm sido propostas; (iii) doenças genéticas complexas são frequentemente oligogênicas, ou mesmo poligênicas, e cada gene contribui com uma fração do risco relativo total; análises de ligação realizadas utilizando o fenótipo vitiligo identificaram *loci* de suscetibilidade localizados nos cromossomos 1, 4, 6, 7, 8, 17 e 22 co-segregando com a doença. ²⁷⁻³⁰ Para essas regiões, alguns genes consistentemente associados ao vitiligo foram descritos, tais como *NLRP1* (17p13) e *XBP1* (22q12). ^{31,32}

GENÉTICA EPIDEMIOLÓGICA OBSERVACIONAL EM VITILIGO

O envolvimento dos fatores genéticos na suscetibilidade ao vitiligo tornou-se evidente nos estudos familiares, mostrando que o vitiligo segrega com um

complexo padrão de herança multifatorial e poligênica.¹⁰ Estudo envolvendo 160 famílias caucasianas dos EUA confirmou agregação familiar de casos, com 20% dos afetados apresentando ao menos um familiar de primeiro grau com vitiligo.¹⁰ O risco relativo de vitiligo, nas populações da Dinamarca e Índia, foi de sete para os pais, 12 para os irmãos e 36 para os filhos.¹⁰ O risco relativo de vitiligo para familiares de primeiro grau foi estimado entre sete a dez vezes maior em relação à população em geral.¹⁰ Estudo realizado em gêmeos com vitiligo mostrou uma taxa de 23% de concordância de vitiligo generalizado para 22 pares de gêmeos MZ em comparação a 0% em 24 pares de gêmeos DZ.¹¹ No entanto, a falta de completa concordância para o vitiligo entre gêmeos MZ sugere a importância de fatores não genéticos.

Evidência adicional da existência de um componente genético de suscetibilidade ao vitiligo vem sendo obtida a partir de ASC, principal ferramenta estatística usada para determinar, a partir de informações das famílias, o modelo de herança que melhor explique o padrão de segregação de um fenótipo em particular.²⁹ Resultado de ASC realizada em 56 famílias colombianas de múltiplas gerações, contendo indivíduos afetados por vitiligo, indicou como mais adequado um modelo que assume a existência de um gene principal dominante, com forte influência de fatores ambientais agindo sobre os genótipos recessivos.⁴⁰ Outra ASC envolvendo 2.247 chineses portadores de vitiligo e suas famílias demonstrou que diferentes tipos de vitiligo são regulados por diferentes conjuntos de genes, reforçando o caráter oligo/poligênico da doença.⁴¹

ESTUDOS DE LIGAÇÃO EM VITILIGO

A análise de ligação é uma ferramenta que permite a varredura de todo o genoma humano, usando famílias multigeracionais a fim de identificar regiões do genoma que abrigam *loci* responsáveis pelo fenótipo observado, mesmo sem suposições prévias sobre a patogênese da doença. O princípio da análise de ligação é baseado na premissa de que, se um marcador polimórfico está perto do *locus* que abriga o gene de predisposição à doença, ele vai co-segregar nas famílias, ao longo das gerações, de forma mais frequente do que o esperado sob a hipótese da transmissão aleatória prevista em uma herança independente de *loci* não ligados.⁴²

A primeira evidência de ligação foi entre vitiligo associado ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e marcadores do cromossomo 17p13, *locus* denominado pelos autores de SLEV1, em 16 famílias euro-americanas afetadas por ambas as doenças.⁴³ Este resultado sugere a existência de um possível determinante genético de autoimunidade comum entre vitiligo e LES nestas famílias. Estudo independente subsequente

detectou ligação entre o *locus* 1p31, denominado pelos autores "ASI" (em inglês, *Autoimmunity Susceptibility Locus 1*), e vitiligo em uma grande família multigeracional, apresentando múltiplos casos de vitiligo e tireoidite de Hashimoto.⁴⁴ Em estudo complementar posterior, em que a coleção original de famílias foi expandida para um total de 102 pedigrees, evidência adicional para ligação com vitiligo foi detectada nos cromossomos 7 e 8. Além disso, foi confirmada a evidência de ligação para o *locus* 17p13, anteriormente descrito.³⁵ Foi ainda detectado sinal sugestivo de ligação para quatro *loci* nos cromossomos 9, 13, 19 e 22.³⁵ Os autores sugerem que os sinais de ligação detectados para os cromossomos 7q e 17p parecem derivar primariamente de famílias que segregam vitiligo e doenças autoimunes epidemiologicamente associadas. Já o sinal de ligação detectado para o cromossomo 8p deriva de famílias que segregam somente o vitiligo.³⁵ Mais recentemente, *scan* genômico realizado em famílias *multiplex* chinesas afetadas por vitiligo generalizado identificou ligação entre a doença e marcadores da região 4q13-q21, 22q12 e 6p21-p22.^{36,37}

Análises de ligação realizadas em populações com *backgrounds* étnicos diferentes, usando vitiligo generalizado como fenótipo, mostraram que o principal *locus* de suscetibilidade co-segregando com a doença não é o mesmo em cada população, exceto para o *locus* 22q11. Isso sugere que diferentes genes podem estar envolvidos na patogênese do vitiligo em diferentes populações ao redor do mundo, caracterizando uma doença poligênica.^{35,36} A definição exata do(s) gene(s) envolvido(s) no controle do fenótipo em questão depende de estudos adicionais, geralmente de associação, envolvendo genes candidatos localizados na região genômica identificada na análise de ligação.

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO EM VITILIGO

Existem dois tipos principais de desenho de estudo de associação: o primeiro, baseado em população e outro, baseado em famílias. Os estudos baseados em populações (tipo caso-controle) basicamente comparam as frequências alélicas de um marcador genético entre os indivíduos afetados e não afetados (controles); determinado alelo é considerado associado ao fenótipo estudado quando este ocorrer com frequência diferente entre os grupos. Nesse tipo de estudo, o grande desafio é a correta seleção da amostra populacional e o tamanho amostral, a fim de que tenha poder suficiente para detectar o efeito genético, se ele realmente existir. O estudo de associação baseado em famílias usa o desenho básico de trios, que consiste nos dois pais e um filho afetado. A análise avalia a frequência com que um determinado alelo é transmitido de um pai heterozigoto para o filho afetado: um desvio na transmissão esperada ao acaso, de acordo com

a primeira lei de Mendel, sugere associação. É importante ressaltar que estudos de associação têm um poder maior para detectar efeitos genéticos moderados a fracos quando comparados a estudos de ligação, o que os torna ideais para mapeamento fino de regiões cromossômicas previamente detectadas em ligação com a doença.⁴⁶

Atualmente, mais 50 genes candidatos já foram investigados em estudos de associação para a suscetibilidade ao vitiligo. No entanto, poucos genes, entre

eles o *DDR1*, *XBPI*, *NLRP1*, *PTPN22* e *COMT*, foram consistentemente associados à doença, seja por estarem localizados em região previamente identificada em estudo de ligação (posicional) ou por terem sido replicados em populações de diferentes regiões geográficas (Tabela 1). Além dos genes citados acima, evidência para associação com fenótipos do vitiligo foi encontrada para marcadores dos genes *ACE*, *AIRE*, *CD4*, *COX2*, *ESR1*, *EDN1*, *FAS*, *FOXD3*, *FOXP3*, *IL1RN*, *IL-10*, *MBL2*, *MC1R*, *MYG1*, *Nrf2*, *PDGFRA*,

TABELA 1: Genes não-HLA consistentemente associados ao vitiligo

Gene	Região	Desenho estudo	Amostra caso/ controle Famílias (nd)	População	Fenótipo	Variante	Posição	Valor-P	OR (CI - 95%)	Autor	Ano
COMT	22q11.1-q11.2	CC	51 / 66	Turca	Acrifacial	rs108/158met	Exon 3	P=0.07	NA	Tursen et al,	2002 ⁴⁷
		CC	749 / 763	Chinesa	Volgar / localizado - IIP	rs4680	Exon3	P<0.001	1.42 (1.15 - 1.75)	Li et al,	2009 ⁴⁸
		CC	1392 / 2629	Europeia	Generalizado	rs4680	Exon3	NS	-	Brisso et al,	2011 ⁴⁹
DDR1	6p21	BF	188 F (96 IND) ^a	Brasileira	Vitiligo per se	rs4618569	5' Non Gene	P=0.002	5.27 (1.99 - 17.40)	Silva de et al,	2010 ⁵⁰
						rs3049823	Exon 15	P=0.05	1.73 (0.97 - 3.08)		
						rs2267641	Exon 17	P=0.01	3.47 (1.22 - 9.17)		
		CC	134 / 134	Brasileira	Vitiligo per se	rs2267641	Exon 17	P=0.04	6.0 (1.73 - 52.33)	Silva de et al,	2010 ⁵⁰
		CC	220 / 409	Coreana	Não-Segmentar	rs1049823	Exon 15	NS	-	Kim et al,	2010 ⁵¹
CC	1392 / 2629	Europeia	Generalizado	rs2267641	Exon 17	NS	-	Brisso et al,	2011 ⁴⁹		
NLRP1	17p13	BF	114 F (56 IND) ^a	Americana / Europeia	Generalizado + DAA	rs50267	Intron 15	P<0.001a	2.8 (1.37 - 3.15)	Jin et al,	2007 ⁵²
						rs479097	#	P<0.01a	2.1 (1.39 - 2.91)		
		CC	66 / 98	Romana	Generalizado	rs50267	Intron 15	P=0.019b	1.86 (1.09 - 3.21)	Jin et al,	2007 ⁵²
		CC	26 / 61	Árabe	Generalizado	rs308588	#	P=0.027	NA	Alkhatieb et al,	2010 ⁵³
					rs2670660	#	P=0.038	NA			
PTPN22	1p33.3-p13.1	CC	165 / 304	Europeia	Generalizado	188 C/T	Exon 14 (R620W)	P=0.005 c	1.82 (1.17 - 2.82)	Carson et al,	2005 ⁵⁴
		CC	126 / 140	Indiana	Generalizado	188 C/T	Exon 14 (R620W)	NS	-	Lodha et al,	2008 ⁵⁵
		CC	65 / 111	Romana	Generalizado	188 C/T	Exon 14 (R620W)	P=0.036 c	2.92 (1.21 - 7.03)	LaBege et al,	2008 ⁵⁶
		BF	126 F (71 IND) ^a	Americana / Europeia	Generalizado + DAA	188 C/T	Exon 14 (R620W)	P=0.026 a	2.16 (1.22 - 3.82)	LaBege et al,	2008 ⁵⁶
		CC	55 / 85	Árabe	Generalizado	188 C/T	Exon 14 (R620W)	NS	-	Alkhatieb et al,	2010 ⁵³
XBPI	22q12.1	CC	319 / 294 365 / 404 1402 / 1288	Chinesa Han	Vitiligo per se	rs2269577	Promoto	P=0.007	1.36 (1.09 - 1.71)	Ren et al,	2009 ⁵⁷
						rs2269577	Promoto	P=0.008	1.31 (1.07 - 1.59)		
						rs2269577	Promoto	P=0.003	1.18 (1.06 - 1.32)		
		CC	896 / 1515	Europeia	Generalizado	rs2269577	Promoto	P=0.0075	1.17 (1.06 - 1.29)	Brisso et al,	2011 ⁴⁹
		MA	2651 / 2980	Europeia / Chinesa	Generalizado	rs2269577	Promoto	P=0.000000095	1.21 (1.13 - 1.19)		

CC, Desenho Caso-Control. BF, Desenho Baseado em Família. MA, Meta-análise. * F, família, (IND = indivíduos). DAA, Doença Autoimune Associada. IIP, Idade de Início Precoce. #, Região Intergênica. a, Análise de Regressão Logística Condicionada. b, Associação Alélica. c, Associação Genotípica. NS, não significante. NA, Não disponível. OR, odds ratio. CI, Intervalo de Confiança.

PRO2268, *SCF*, *SCGF*, *TXNDC5*, *UVRAG*, *VDR*, porém estas associações não foram replicadas em populações independentes.⁶⁷ Já os diversos estudos genéticos realizados para os genes *CAT* e *CTLA-4*, em populações de origem étnica distinta, têm produzido resultados conflitantes.^{67,68} Em geral, associações entre variantes dos genes *HLA* com suscetibilidade ao vitiligo, considerando diferentes grupos étnicos, não têm sido consistentes, porém há notáveis exceções, como os sinais de associação observados para os alelos *HLA-A2*, *HLA-DR4* e *HLA-DR7*.^{75,76}

Genes candidatos, identificados a partir de *scan* genômico de ligação, geraram resultados interessantes. O primeiro deles foi o *NLRP1*, localizado na região cromossômica 17p13, que codifica uma proteína reguladora do sistema imune inato. Polimorfismos do gene *NLRP1* foram primeiramente investigados e associados em famílias americanas afetadas com vitiligo generalizado e doenças autoimunes epidemiologicamente associadas ao vitiligo; posteriormente, o sinal de associação foi replicado em populações independentes do tipo caso-controle, provenientes da Romênia e Jordânia, usando o fenótipo de vitiligo generalizado.^{76,77}

Mapeamento fino bem-sucedido do locus 22q12 identificou o gene *XBP1* associado ao vitiligo. O *XBP1* codifica um fator de transcrição que regula a expressão de genes do MHC de classe II. A identificação da variante genética rs2269577, localizada na região promotora do gene *XBP1*, associada ao vitiligo *per se*, foi possível devido à realização de análises de associação progressivas em três amostras populacionais independentes, tanto caso-controle quanto famílias. Ainda, estudo funcional mostrou uma elevada expressão de *XBP1* na pele lesionada de pacientes que carregam o alelo de risco C do polimorfismo rs2269577.⁷⁷ Curiosamente, o mesmo alelo de risco da variante rs2269577 foi replicado em uma população europeia em um estudo de associação caso-controle.⁷⁸

Outra abordagem é a seleção de genes envolvidos em vias biológicas importantes na patogênese da doença, como é o caso do gene *DDR1*, localizado na região cromossômica 6p21. O gene *DDR1* codifica um receptor transmembrana de tirosina quinase; mutações neste gene podem levar a alterações na adesão dos melanócitos à membrana basal via integrina CCN3. Associação entre polimorfismos do gene *DDR1* e vitiligo *per se* foi reportada em uma população proveniente do sul do Brasil. Significativamente, o sinal de associação observado foi fortemente dependente da idade, sugerindo um efeito genético mais pronunciado em pacientes afetados pelo vitiligo com idade ≤ 18 e 25 anos.⁶⁴ Importante estudo em uma amostra populacional coreana replicou a associação entre vitiligo e duas

variantes do *DDR1*, apesar de o sinal estatístico não ter resistido à correção para múltiplos testes.⁶² Outro estudo independente falhou em replicar a mesma associação; no entanto, os autores não avaliaram a amostra populacional estratificada por idade de início do vitiligo.⁶⁷ Estudos funcionais recentes demonstraram que a diminuição da adesão do melanócito na lâmina basal é, em parte, devido à diminuição da expressão de *DDR1*.⁶⁴

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DE GENOMA COMPLETO - (GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES - GWAS)

Os GWAS envolvem centenas de milhares de marcadores genéticos, suficientes para a cobertura completa do genoma, que são testados em conjunto para associação a uma determinada doença. Este método é livre de hipótese funcional ou posicional, pois o único objetivo na seleção da coleção de marcadores testados é a cobertura mais densa possível, incluindo todos os genes do genoma, que são investigados em um único experimento. Desta forma, os GWAS permitem a identificação de genes previamente insuspeitos de participar do controle da patogênese da doença em estudo.

O primeiro GWAS em vitiligo foi realizado em uma amostra populacional de um isolado genético, sob forte efeito fundador (portanto, apresentando menor variabilidade genética) do noroeste da Romênia, com elevada prevalência de vitiligo generalizado; os autores encontraram associação entre a doença e o marcador rs13208776 ($p=3,13 \times 10^{-9}$) do gene *SMOC2*; até o momento, este achado não foi replicado.⁶⁵ Em seguida, dois GWAS independentes para vitiligo generalizado, realizados em amostras caucasiana e chinesa, encontraram diversos sinais de associação entre vitiligo e polimorfismos de *loci* diversos, incluindo o MHC.⁶⁶ Destes sinais, apenas dois, para os genes *LPP* e *IKZF4*, foram replicados em amostras populacionais distintas das originais.^{76,78}

ETIOPATOGENIA

A etiopatogenia do vitiligo ainda não foi totalmente esclarecida e várias teorias têm sido propostas. Destas, a hipótese autoimune é hoje a mais aceita entre os especialistas.⁶⁷ Além dessa teoria, outras têm sido intensamente estudadas, assim como a do defeito de adesão na epiderme, a bioquímica e a neural. Neste artigo, vão ser discutidas as teorias autoimune, do defeito de adesão e a bioquímica.

TEORIA AUTOIMUNE

A percepção inicial de que a autoimunidade estava implicada em pacientes com vitiligo não segmentar foi baseada na frequente coocorrência de

doenças autoimunes nesses pacientes e em seus parentes, como lúpus eritematoso, psoríase, alopecia areata, halo-nevus e, principalmente, doenças autoimunes da tireoide, e na resposta favorável a imunossuppressores, como fotoquimioterapia com UVA (PUVA) e corticosteroides tópicos e orais.⁷¹⁻⁷⁶ Neste sentido, já foi determinado que terapia com corticosteroides sistêmicos diminuiu a citotoxicidade mediada por anticorpos contra melanócitos de pacientes com vitiligo.⁷⁷

Além disso, dois grandes estudos epidemiológicos encontraram diferentes prevalências de comorbidades autoimunes em indivíduos com vitiligo, especialmente doenças da tireoide, neste caso, 7,7% em indivíduos chineses, contrastando com uma prevalência maior de 20% em caucasianos.¹¹⁷ Uma recente revisão sistemática sobre doenças de tireoide em pacientes com vitiligo identificou uma prevalência média de doenças da tireoide, doenças autoimunes da tireoide e a presença de autoanticorpos tireoide-específicos de, respectivamente, 15,1%, 14,3% e 20,8% e um Risco Relativo (RR) para estes afetados de 1,9, 2,5 e 5,2, respectivamente.⁷⁹

O vitiligo é acompanhado de anormalidades da imunidade humoral e celular e altos níveis de autoanticorpos circulantes têm sido detectados em soro entre 5 a 10% dos pacientes, predominantemente da classe IgG e, principalmente, anticorpos antitiroxinase um e dois (TRP-1 e TRP-2). Entretanto, o papel de anticorpos antimelanócitos na patogênese do vitiligo permanece incerto e tem sido sugerido que a presença deles possa ser secundária ao dano aos queratinócitos e melanócitos.^{70,80}

Os melanócitos são capazes de apresentar antígenos na presença de MHC de classe II, o que permitiria que células HLA-DR+ presentes na área perilesional do vitiligo apresentassem antígenos em resposta a traumas ou inflamação local, neste último caso, levando à destruição autoimune dos melanócitos.^{80,81} Vários estudos já demonstraram que existem infiltrados linfocíticos CD4+ e CD8+ na junção dermoepidérmica em pele perilesional de vitiligo.⁸² Foi observado, experimentalmente, que, em alguns pacientes com vitiligo comum, ocorreu infiltração de células T CLA+ na pele perilesional, sendo possível que o recrutamento destas células T ocorra através da ativação das células dendríticas e estas, por sua vez, sejam ativadas nos locais de trauma epidérmico.⁸³ Recentemente, foram encontrados dados que talvez confirmem esta hipótese. Um estudo de imuno-histoquímica demonstrou um aumento da população de células dendríticas mieloides dérmicas CD11c+ e células de Langerhans CD207+ na borda lesional de lesões de vitiligo.⁸⁴

Curiosamente, linfócitos T citotóxicos melanócito-específicos foram associados à atividade da doen-

ça.⁸⁵ Mais recentemente, em estudo *in vitro*, foi demonstrado que linfócitos T citotóxicos infiltrados em área perilesional de vitiligo comum destruíram os melanócitos vizinhos.⁸⁶

Melanócitos e células de melanoma compartilham antígenos de diferenciação e, com base no número de casos observados em humanos e camundongos, o desenvolvimento espontâneo de vitiligo em pacientes com melanoma tem sido considerado como um sinal de bom prognóstico para melanoma.^{84,86} Neste sentido, vários estudos na área da imunologia do vitiligo são decorrentes do estudo de melanoma e de vacinas contra melanoma. A imunoterapia contra antígenos, como gp100 e tirosinase, pode, por exemplo, levar à infiltração de linfócitos T citotóxicos específicos tanto na área de melanoma quanto nas lesões de vitiligo.^{87,88}

Camundongos que tiveram tumores de melanoma extirpados cirurgicamente geraram resposta de linfócitos T citotóxicos de memória contra os melanócitos. Estes camundongos, que apresentavam ausência de células T reguladoras (TREGs), desenvolveram vitiligo, sugerindo que as TREGs preveniriam autoimunidade contra melanócitos.¹⁰⁰ Novos dados em pacientes com vitiligo corroboram estes resultados, como a detecção de uma redução da quimiocina CCL22 que aumenta a migração de TREGs (*Regulatory T cells*) em direção à pele lesada, o que levaria a um número inadequado de TREGs em pacientes com vitiligo, que não seria capaz de suprimir uma reação citotóxica na pele de pacientes afetados.¹⁰¹ Nesta mesma vertente de pesquisa, análise através de citometria de fluxo revelou aumento de linfócitos T CD8+ e diminuição de TREGs circulantes em pacientes com vitiligo generalizado. Além disso, foram identificados aumentos expressivos desses dois tipos de células na pele perilesional desses pacientes. Entretanto, as TREGs do sangue periférico tinham diminuição da capacidade de supressão dos linfócitos T CD8+, sugerindo que a falha no funcionamento das TREGs e o aumento desses linfócitos contribuíram para a destruição dos melanócitos nestes afetados.¹⁰² Contrastando com alguns resultados deste último estudo, em outro artigo, não foram encontrados aumento de TREGs ou linfócitos T CD8+ em sangue periférico de pacientes com vitiligo generalizado em comparação aos controles; entretanto, neste trabalho, estas células não foram estudadas em área de pele perilesional de vitiligo.¹⁰³ Não obstante, de relevância neste mesmo estudo foi detectada uma diminuição, no sangue periférico, de células invariáveis *natural killer T (i NKT)*, que são células reguladoras do equilíbrio Th1/Th2 da resposta imune e que estão frequentemente diminuídas em outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso e artrite reumatoide, sugerin-

do um efeito protetor dessas células.¹⁰⁰

O mecanismo de perda de autotolerância que potencialize a ação de linfócitos citotóxicos autorreativos na perda dos melanócitos ainda é pouco conhecido. Estudo recente apresentou evidências de defeitos funcionais de linfócitos T regulatórios periféricos (TREGs) em metade dos pacientes testados com vitiligo instável.¹⁰¹

Também tem sido encontradas no vitiligo segmentar, cuja patogênese foi primordialmente relacionada a disfunções dos nervos simpáticos, evidências de que uma resposta celular imunomediada, incluindo linfócitos T CD8+, esteja envolvida nas fases iniciais desse tipo de vitiligo. Além disso, neste mesmo estudo, foi detectado, por citometria de fluxo, um elevado nível de expressão de IFN-gama na pele lesional.¹⁰²

Um perfil de citocinas Th-1, Interferon - gama, TNF- alfa e, recentemente, IL-8, tem sido bem descrito em áreas de pele de vitiligo tanto segmentar quanto não segmentar.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Além da resposta Th-1, muitas evidências de uma influência Th-17 têm sido descritas no vitiligo, com demonstração por imuno-histoquímica e imunofluorescência de infiltração de linfócitos IL17A+ em áreas dérmicas na borda de lesões de vitiligo. Além disso, foi encontrado também, nos bordos das lesões, aumento de expressão de mRNA de IL-17 A e IL-1beta.¹⁰⁶ Recentemente, foi descrito um aumento de IL-17 em soro de pacientes afetados por vitiligo.¹⁰⁷

TEORIA DO DEFEITO DE ADESÃO

Tem sido sugerido que defeitos de adesão estejam envolvidos no desaparecimento dos melanócitos nas lesões de vitiligo.⁶⁵ O principal sinal clínico reforçando essa teoria é a presença do fenômeno de Köebner (aparecimento de vitiligo após traumas crônicos ou agudos) que pode estar presente em até 31% dos pacientes caucasianos com vitiligo comum.¹¹

Em um dos primeiros estudos que tentava identificar defeitos de adesão na gênese do vitiligo, foi realizada uma análise imuno-histoquímica que demonstrou que a proteína tenascin, que pode interferir na adesão dos melanócitos, estava superexpressa em pele lesada comparada à pele sã dos mesmos pacientes.^{112,113}

Estudo experimental com pacientes do subgrupo generalizado (que incluiu os tipos comum, acrofacial e universal) demonstrou que estes afetados apresentaram destacamento dos melanócitos após fricção mecânica da pele não afetada.¹¹⁴ Esta observação levou à proposição de uma nova teoria, na qual o vitiligo não segmentar é uma desordem primária melanocitotóxica, ou seja, ocorreria uma provável perda aguda dos melanócitos (porque a maioria dos pacientes tem um surgimento repentino das lesões), com resposta alterada do melanócito à fricção e a possíveis outros tipos de estresse, que induziriam o destaca-

mento das células e subsequente perda transepidérmica. Neste contexto, os autores da teoria especularam que um fenômeno autoimune possa ser desencadeado por liberação de antígenos e reconhecimento por células dendríticas ou células T de memória durante a migração transepidérmica de melanócitos afetados, agravando, assim, o destacamento e a perda de mais melanócitos.³⁹

Alterações na principal proteína que adere o melanócito à lâmina basal da epiderme, a DDR1 (*Discoidin Domain Receptor-1*), têm sido implicadas como um dos fatores agravantes na perda dos melanócitos. Inicialmente, estudos genéticos de associação encontraram evidências de associação entre vitiligo não segmentar e alelos do gene *DDR1* e esta associação foi mais evidente em afetados que tiveram o vitiligo iniciado antes dos 25 anos de idade.^{61,62}

Estudos funcionais tentando explicar a participação das proteínas *DDR1* e *CCN3* (que controlam a adesão do *DDR1* à lâmina basal da epiderme)¹¹⁵ identificaram que melanócitos perilesionais não expressavam *CCN3*.⁶² Além disso, o silenciamento de *CCN3* em melanócitos induziu uma inibição significativa da adesão dos melanócitos ao colágeno IV. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a expressão de *DDR1* estava diminuída na pele lesional em comparação à pele perilesional na maioria dos pacientes e a expressão do colágeno IV estava diminuída em todos os pacientes.⁶² Nesta mesma linha de pesquisa, um estudo recente confirmou a diminuição da expressão de *DDR1* em toda a epiderme lesional, considerando que a expressão epidérmica de *DDR1* era devido somente à expressão entre os queratinócitos, e não na camada basal da epiderme onde estão localizados os melanócitos. Este estudo levantou a hipótese de que o vitiligo seja uma doença em que toda a epiderme é afetada e não somente os melanócitos.⁶⁴

TEORIA BIOQUÍMICA DO VITILIGO

A hipótese de o vitiligo ser causado por uma disfunção em vias metabólicas, não necessariamente relacionadas aos melanócitos, que levariam à produção de metabólitos tóxicos, como catecolaminas, *o*-quinonas, espécies reativas de oxigênio, tem sido amplamente investigada.^{31,70}

O envolvimento do estresse oxidativo no dano ao melanócito é suportado por evidências que sugerem um desequilíbrio entre o sistema oxidante/antioxidante na epiderme de pacientes com vitiligo. Foi demonstrado que os melanócitos das bordas das lesões de pacientes com vitiligo apresentavam aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo quando cultivados.¹¹⁶ Schallreuter e cols. observaram *in vivo* que pacientes com vitiligo podem acumular uma concentração acima de 10⁻³ M de H₂O₂ na sua epiderme.¹¹⁷

Diferentes possíveis fontes endógenas de produção de H_2O_2 na epiderme de pacientes com vitiligo têm sido descritas, incluindo aumento na atividade da Monoamino Oxidase A (MAO-A), aumento da atividade da NADPH-oxidase e desequilíbrio na síntese/reciclagem/regulação da (6R)-L-eritro-5,6,7,8 tetra-hidrobiopterina (6-BH4).^{117,120} Uma das possíveis consequências do aumento da produção de 6-BH4 observado na epiderme de pacientes com vitiligo é a inibição da enzima fenilalanina hidroxilase, responsável pela produção L-tirosina a partir da L-fenilalanina, levando a baixo nível de tirosina e, conseqüentemente, a defeito na síntese da melanina.²¹ Pacientes com vitiligo apresentam um baixo nível/atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como catalase, glutathione peroxidase e vitamina E, possivelmente aumentando a toxicidade do H_2O_2 .^{123,124} Os resultados obtidos para os níveis do antioxidante superóxido dismutase foram conflitantes entre os estudos realizados.^{122,123,125,126} Outra evidência do envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da doença é a suspensão do processo de despigmentação e restauração da cor da pele com a remoção do H_2O_2 da epiderme pelo *Narrow-Band* UVB311nm-pseudocatalase ativada.¹¹⁷

Estudos relatam o envolvimento do sistema colinérgico e adrenérgico na patogênese do vitiligo.¹²⁷ A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima importante em promover e manter o estresse oxidativo, sendo ela inativada pela oxidação dos resíduos Trp⁴³², Trp⁴³⁵, Met⁴³⁶ pelo H_2O_2 . Significativamente, a atividade da AChE é baixa nas lesões de pele de vitiligo durante a despigmentação, mas retorna ao normal quando a pele lesionada volta a repigmentar.²⁸ Picardo e cols. mostraram que a anormal liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas autonômicas pode resultar na produção excessiva de radicais tóxicos no microambiente dos melanócitos.¹²⁸ Além disso, foram reportados níveis elevados de metabólitos de catecolaminas na urina de pacientes com vitiligo, na fase ativa da doença, quando comparados a controles pareados por idade.^{129,130} □

REFERÊNCIAS

- Sharma L, Bhawan R, Jain RK. Hypoaesthesia in vitiligo. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2004;70:162-4.
- Albert DM, Nordlund JJ, Lerner AB. Ocular abnormalities occurring with vitiligo. *Ophthalmology.* 1979;86:1145-60.
- Giochia G, Marelli MA, Fresa D, Robiolo L. Audiologic disturbances in vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21:1317-8.
- Porter J, Beuf A, Nordlund JJ, Lerner AB. Personal responses of patients to vitiligo: the importance of the patient-physician interaction. *Arch Dermatol.* 1978;114:1384-5.
- Porter JR, Beuf AH, Lerner A, Nordlund J. Psychosocial effect of vitiligo: a comparison of vitiligo patients with "normal" control subjects, with psoriasis patients, and with patients with other pigmentary disorders. *J Am Acad Dermatol.* 1986;15(2 Pt 1):220-4.
- Radtke MA, Schafer I, Gajjar A, Langerbruch A, Augustin M. Willingness-to-pay and quality of life in patients with vitiligo. *Br J Dermatol.* 2009;161:134-9.
- Millington GW, Levell NJ. Vitiligo: the historical course of depigmentation. *Int J Dermatol.* 2007;46:990-5.
- Frelich AR. Zarait-"Idiopathic leprosy". *J Am Acad Dermatol.* 1982;6:131-4.
- Kopca D. Historical aspects and definition of vitiligo. *Clin Dermatol.* 1997;15:841-3.
- Majumder PP, Nordlund JJ, Nath SK. Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol.* 1993;129:994-8.
- Alkhatieb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spitz RA. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res.* 2003;16:208-14.
- Das SK, Majumder PP, Chakraborty R, Majumdar TK, Haldar B. Studies on vitiligo. I. Epidemiological profile in Calcutta, India. *Genet Epidemiol.* 1985;2:71-8.
- Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Dandaski 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.
- Lu T, Gao T, Wang A, Jin Y, Liu Q, Liu C. Vitiligo prevalence study in Shaanxi Province, China. *Int J Dermatol.* 2007;46:47-51.
- Bolesao-Garsaud AM, Garsaud P, Cales-Quist D, Helonen R, Guenherve C, Clere RC. Epidemiology of vitiligo in the French West Indies (isle of Martinique). *Int J Dermatol.* 2000;39:18-20.
- Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K. Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol.* 1977;113:47-52.
- Lerner AB. Vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1959;32(2 Part 2):285-310.
- Melita NR, Shah KC, Theodore G, Vyas VP, Patel AB. Epidemiological study of vitiligo in Surat area, South Gujarat. *Indian J Med Res.* 1973;61:145-54.
- Calanchini-Postolzi E, Frenk E. Long-term actinic damage in sun-exposed vitiligo and normally pigmented skin. *Dermatologica.* 1987;174:266-71.
- Schallreuter KU, Behrens-Williams S, Khatiq TP, Pickles SM, Peters EM, Marks LK, et al. Increased epidermal functioning wild-type p53 expression in vitiligo. *Exp Dermatol.* 2003;12:268-77.
- Bakry OA, Hammam MA, Wahed MM. Immunohistochemical detection of P53 and Mdm2 in vitiligo. *Indian Dermatol Online J.* 2012;3:171-6.
- Schallreuter KU, Tobin DJ, Panate A. Decreased photodamage and low incidence of non-melanoma skin cancer in 136 sun-exposed caucasian patients with vitiligo. *Dermatology.* 2002;204:194-201.
- Le Poole IC, Stennett LS, Borlich BK, Dee L, Robinson JK, Hernandez C, et al. Expansion of vitiligo lesions is associated with reduced epidermal CDw60 expression and increased expression of HLA-DR in perilesional skin. *Br J Dermatol.* 2003;149:739-48.
- Hexsel CL, Eide MJ, Johnson CG, Rajenta R, Jacobsen G, Hamzavi I, et al. Incidence of non-melanoma skin cancer in a cohort of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60:929-33.
- Teulings HE, Overkamp M, Oeylan E, Neuwelboer-Kobotova L, Bos JD, Nijsten T, et al. Decreased risk of melanoma and non-melanoma skin cancer in patients with vitiligo: a survey among 1307 patients and their partners. *Br J Dermatol.* 2013;168:162-71.
- Liberge G, Malloix CM, Gowan K, Holland P, Bennett DC, Fain PR, et al. Early disease onset and increased risk of other autoimmune diseases in familial generalized vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2005;18:300-5.
- Rezeq N, Gavlas NG, Westman AP, Kemp EH. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;21:865-76.
- Castanet J, Ortonne JP. Pathophysiology of vitiligo. *Clin Dermatol.* 1997;15:845-51.
- Morelli JG, Norris DA. Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol.* 1993;100(2 Suppl):191S-5S.
- Gauthier Y, Cario Andre M, Taieb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytotoxicity? *Pigment Cell Res.* 2003;16:322-32.
- Defafina ML, Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2006;19:406-11.
- Huang CL, Nordlund JJ, Boissy R. Vitiligo: a manifestation of apoptosis? *Am J Clin Dermatol.* 2002;3:301-8.
- Spitz RA, Gowan K, Bennett DC, Fain PR. Novel vitiligo susceptibility loci on chromosomes 7 (AS2) and 8 (AS3), confirmation of SLEVI on chromosome 17, and their roles in an autoimmune diabetes. *Am J Hum Genet.* 2004;74:188-91.
- Chen JJ, Huang W, Gu J, Yang S, Zhou FS, Xiong GG, 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.
- Liang Y, Yang S, Zhou Y, Gu 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.
- Jin Y, Malloix CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2007;355:1216-25.
- Ren Y, Yang S, Xu S, Gao M, Huang W, Gao T, et al. Genetic variation of promoter sequence modulates XBP1 expression and genetic risk for vitiligo. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000523.
- Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ. Genetic epidemiology of vitiligo: multibioses recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet.* 1994;55:981-90.
- Elston RC, Stewart J. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Hum Hered.* 1971;21:523-42.
- Acosta-Burgos M, Parod E, Salgar M, Bedoya E, Bales 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 XL, Liu JB, Gu JR, Li M, Xiong GG, Wu HB, et al. Characteristics of genetic epidemiology and genetic models for vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51:383-90.
- Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science.* 1994;265(5181):207-48.
- Nath SK, Kelly JA, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, et al. Evidence for a susceptibility gene, SLEVI, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2001;69:1401-6.
- Alkhatieb A, Steier GL, Do W, Talbert J, Uhlhorn C, Taylor M, et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AS1) to chromosome 10p13-p32.2. *Hum Mol Genet.* 2002;11:661-7.
- Fain PR, Gowan K, LaBerge GS, Alkhatieb A, Steier GL, Talbert J, et al. A genome-wide screen for generalized vitiligo: confirmation of AS1 on chromosome 10p31 and evidence for additional susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1560-4.
- Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet.* 2005;366:1121-31.
- Biles SA, Jin Y, Bennett DC, Herbstman DM, Wallace MR, McCormack WT, et al. Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports XBP1, FODP3, and TSLP. *J Invest Dermatol.* 2011;131:371-81.
- Casp CB, She JK, McCormack WT. Genetic association of the cathepsin gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res.* 2002;15:62-6.
- Liu L, Li C, Gao J, Li K, Zhang R, Wang G, et al. Promoter variant in the cathepsin gene is associated with vitiligo in Chinese people. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2647-53.
- Em S, Laditha NC, Chatterjee S, Gani AR, Malek RA, Shah BJ, et al. Association of cathepsin TC exon 9 and glutathione peroxidase oxon 200 polymorphisms in relation to their activities and oxidative stress with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *Pigment Cell Res.* 2007;20:405-7.
- Biles SA, LaBerge GS, Procopciuc LM, Fain PR, Spitz RA. CTLA-4 and generalized vitiligo: two genetic association studies and a meta-analysis of published data. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:230-4.
- Kemp EH, Ajan RA, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Cork MJ, Watson PE, et al. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol.* 1999;140:73-8.
- Debla F, Syed R, Qureshi J, Wahed MA, Jamil K, Rao H. CTLA-4 A49G gene polymorphism is not associated with vitiligo in South Indian population. *Indian J Dermatol.* 2010;55:29-32.
- Tastan HB, Akar A, Dikunoglu FE, Arca E, Inal A. Association of HLA class I antigens and HLA class II alleles with vitiligo in a Turkish population. *Pigment Cell Res.* 2004;17:181-4.
- Buc M, Fazekasova H, Cechova E, Hegyi E, Kolbasova K, Ferencik S. Occurrence rates of HLA-DRB1, HLA-DQB1, and HLA-DPB1 alleles in patients suffering from vitiligo. *Br J Dermatol.* 1998;8:13-5.
- Wang J, Zhao YM, Wang Y, Xiao Y, Wang YK, Chen HD. [Association of HLA class I and II alleles with generalized vitiligo in Chinese Hairs in north China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2007;24:221-3.
- 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.
- Hu DX, Ren YQ, Zhu KJ, Lv YM, Cheng H, Zhang Z, et al. Comparisons of clinical features of HLA-DRB1*07 positive and negative vitiligo patients in Chinese Han population. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:1299-303.

59. Jin Y, Birela SA, Fain PR, Spitz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2558-62.
60. Akhaleeb A, Qaraz F. Genetic association of NALP1 with generalized vitiligo in Jordanian Arabs. *Archives of dermatological research*. 2010;302:631-4.
61. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Walker G, Werneck RL, Nogueira E, Mira MT. Genetic variants of the DDR1 gene are associated with vitiligo in two independent Brazilian population samples. *J Invest Dermatol*. 2010;130:1813-8.
62. Kim HJ, Uhm YK, Yun JK, Im SH, Yim SV, Chang JH, et al. Association between polymorphisms of discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 (DDR1) and non-segmental vitiligo in the Korean population. *Eur J Dermatol*. 2010;20:231-2.
63. Ricard AS, Pain C, Daubos A, Ezzidine K, Lamissi-Garda I, Bbeyan A, et al. Study of CCN3 (NOV) and DDR1 in normal melanocytes and vitiligo skin. *Exp Dermatol*. 2012;21:411-6.
64. Reichert-Faria A, Jung JE, Neto VM, de Castro CC, 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.
65. Birela SA, Gowan K, Fain PR, Spitz RA. Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMOG2, in close proximity to IODMS. *J Invest Dermatol*. 2010;130:798-803.
66. Jin Y, Birela SA, Fain PR, Gowan K, Ricard AS, Holland PL, et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med*. 2010;362:1686-97.
67. Qian C, Ren YQ, Yang LH, Sun LD, Xu AE, Gao XH, et al. Genome-wide association study for vitiligo identifies susceptibility loci at 6q27 and the MHC. *Nat Genet*. 2010;42:614-8.
68. 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.
69. Sandoval-Cruz M, Garcia-Carrasco M, Sanchez-Pomas R, Mendoza-Pinto C, Jimenez-Hernandez M, Munguia-Raspgozo P, et al. Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmun Rev*. 2011;10:762-5.
70. Schallreder KU, Bahadran P, Prazdo M, Slominski A, Elaszyl YE, Kemp EH, et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol*. 2006;17:139-40; discussion 41-60.
71. Clayton R. A double-blind trial of 0-05% dobetasol propionate in the treatment of vitiligo. *Br J Dermatol*. 1977;96:71-3.
72. Schallreder KU, Lemke R, Bandt G, Schwartz R, Westhofen M, Moltz R, et al. Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology*. 1994;188:269-75.
73. British Photodermatology Group guidelines for PUVA. *Br J Dermatol*. 1994;130:246-55.
74. Kim SM, Lee HS, Hahn SK. The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. *Int J Dermatol*. 1999;38:546-50.
75. Radakovic-Fijan S, Fursin-Friedl AM, Horigsmann H, Tanew A. Oral dexamethasone pulse treatment for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:814-7.
76. Cockayne SE, Messenger AG, Gawkrödger DJ. Vitiligo treated with topical corticosteroids: children with head and neck involvement respond well. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46:964-5.
77. Hahn SK, Kim H, Im S, Pak YK, Cui J, Bystyn JC. The change of melanocyte cytotoxicity after systemic steroid treatment in vitiligo patients. *J Dermatol Sci*. 1993;6:201-5.
78. Zhang Z, Xu SK, Zhang FY, Yin XY, Yang S, Xiao R, et al. The analysis of genetics and associated autoimmune diseases in Chinese vitiligo patients. *Arch Dermatol Res*. 2009;301:167-73.
79. Wijman C, Koon MW, Umpens J, Leffang MM, Luiten RM, van der Veen JP, et al. The prevalence of thyroid disease in patients with vitiligo: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2012;167:1224-35.
80. Kemp EH, Gawkrödger DJ, Watson PE, Weetman AP. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). *Clin Exp Immunol*. 1997;109:495-500.
81. Kemp EH, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Watson PE, Weetman AP. Autoantibodies to tyrosinase-related protein-1 detected in the sera of vitiligo patients using a quantitative radio-binding assay. *Br J Dermatol*. 1998;139:798-805.
82. Kemp EH, Waterman EA, Gawkrödger DJ, Watson PE, Weetman AP. Molecular mapping of epitopes on melanocyte-specific protein Pmel17 which are recognized by autoantibodies in patients with vitiligo. *Clin Exp Immunol*. 2001;124:509-15.
83. Kemp EH, Waterman EA, Hawes SE, O'Neill K, Gottumukkala RV, Gawkrödger DJ, et al. The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. *J Clin Invest*. 2002;109:923-30.
84. Okamoto T, Iie RF, Fujii S, Huang SK, Nize AJ, Morton DL, et al. Anti-tyrosinase-related protein-2 immune response in vitiligo patients and melanoma patients receiving active-specific immunotherapy. *J Invest Dermatol*. 1998;111:1034-9.
85. Bystyn JC. Serum antibodies in vitiligo patients. *Clin Dermatol*. 1989;7:136-4E.
86. Le Poole IC, Luben RM. Autoimmune etiology of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmun*. 2006;10:227-43.
87. Steltz J, Bruck J, Lenz J, Budis S, Tuling T. Peripheral CD8+ T cell tolerance against melanocyte self-antigens in the skin is regulated in two steps by CD4+ T cells and local inflammation: implications for the pathophysiology of vitiligo. *J Invest Dermatol*. 2005;124:144-50.
88. Oyarbide-Valecia K, van den Boorn JG, Denman CJ, Li M, Carlson JM, Hernandez C, et al. Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev*. 2006;5:486-92.
89. van den Wijngaard R, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, Tigges B, Westerhof W, Das P. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest*. 2000;80:1299-309.
90. Le Poole IC, Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Ninkovic BJ, Das PK. Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2004;9:68-72.
91. Wang QD, Cruz-Inigo AE, Fuentes-Duculan J, Mousal D, Galati N, Sullivan-Whalen M, et al. Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. *PLoS One*. 2011;6:e18907.
92. Lang KS, Card CC, Muhl A, Wemmet D, Moir A, Schiftek B, et al. HLA-A2 restricted, melanocyte-specific CD8(+) T lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against MelanA/MART1. *J Invest Dermatol*. 2001;116:891-7.
93. van den Boorn JG, Kolijberg D, Dellenij TA, van der Veen JP, Bos JD, Meijer CJ, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol*. 2009;129:2220-32.
94. Nordlund JJ, Gidwood JM, Forgal BM, Milton G, Albert DM, Lerner AB. Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J Am Acad Dermatol*. 1983;9:689-96.
95. Lengagne R, Le Gal FA, Garotte M, Fiette L, Aze P, Kato M, et al. Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2004;64:1496-501.
96. Uchi H, Stan R, Turk MJ, Engelhorn ME, Rizzuto GA, Gdöteborg SM, et al. Unraveling the complex relationship between cancer immunity and autoimmunity: lessons from melanoma and vitiligo. *Adv Immunol*. 2006;90:215-41.
97. Jacobs JF, Aantjen EH, Sibelt LA, Blok WA, Boullart AC, Geritsen MJ, et al. Vaccine-specific local T cell reactivity in immunotherapy-associated vitiligo in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:145-51.
98. Wankowicz-Kalinska A, Le Poole C, van den Wijngaard R, Stokus WJ, Das PK. Melanocyte-specific immune response in melanoma and vitiligo: two faces of the same coin? *Pigment Cell Res*. 2003;16:254-60.
99. Das PK, van den Wijngaard RM, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole IC. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol*. 2001;22:130-6.
100. Zhang P, Cote AL, de Vries VC, Usherwood EJ, Turk MJ. Induction of postsurgical tumor immunity and T-cell memory by a poorly immunogenic tumor. *Cancer Res*. 2007;67:6468-76.
101. Klarquist J, Denman CJ, Hernandez C, Wainwright DA, Strickland FM, Overbeck A, et al. Reduced skin homing by functional Trp in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23:276-86.
102. Lili Y, Yi W, Ji Y, Yue S, Weimin S, Ming L. Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS One*. 2012;7:e37513.
103. Zhou L, Li K, Shi YL, Hanzavi I, Gao TW, Henderson M, et al. Systemic analysis of immunophenotypes of peripheral T cells in non-segmental vitiligo: implication of defective natural killer T cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25:602-11.
104. Ben Ahmed M, Zarka I, Bekk R, Elbeld-Ferdouh A, Kouda N, Beltaoui Hmida N, et al. Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25:99-109.
105. van Geel NA, Mollet IG, De Schipper S, Tijn EP, Vermaalen K, Clark RA, et al. First histopathological and immunophenotypic analysis of early dynamic events in a patient with segmental vitiligo associated with halo nevus. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23:375-84.
106. Toos S, Olfow SJ, Mangan P. Vitiligo-inducing phenols activate the unfolded protein response in melanocytes resulting in upregulation of I β and I β S. *J Invest Dermatol*. 2012;132:2601-9.
107. Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Tigges BJ, Westerhof W, Ogo GS, Goundou V, et al. Immunopotentialization of CD4+ and CD8+ T cells to Type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest*. 2003;83:683-95.
108. Binol A, Kasa U, Kurtipek GS, Kara F, Kocak M, Erkek E, et al. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1 alpha (IL-1-alpha) levels in the lesional skin of patients with nonsegmental vitiligo. *Int J Dermatol*. 2006;45:992-3.

109. Moretti S, Spallanzani A, Amato L, Hautmann G, Galliani I, Fabiani M, *et al.* New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res.* 2002;15:87-92.
110. Khan R, Gupta S, Sharma A. Circulatory levels of T-cell cytokines (interleukin [IL]-2, IL-4, IL-17, and transforming growth factor-beta) in patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:510-1.
111. Noo MD, Das PK, Bos JD, Westerhof W. Association of the Koebner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. *Arch Dermatol.* 1999;135:407-13.
112. Lightner VA, Erickson HR. Binding of hexatrachion (jenacin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. *J Cell Sci.* 1990;95(Pt 2):263-77.
113. Le Poole IC, van der Wijngaert RM, Westerhof W, Das PK. Tenascin is overexpressed in vitiligo lesional skin and inhibits melanocyte adhesion. *Br J Dermatol.* 1997;137:171-8.
114. Gauthier Y, Cario-Andrie M, Lepieux S, Pain C, Taieb A. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. *Br J Dermatol.* 2003;148:95-101.
115. Fukunaga-Kabibis M, Martinez G, Liu ZJ, Kabibis J, Miras P, Weninger W, *et al.* CCNS controls 3D spatial localization of melanocytes in the human skin through DDR1. *J Cell Biol.* 2006;175:563-9.
116. Jimbow K, Chen H, Park JS, Thomas PD. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol.* 2001;144:55-65.
117. Schallreuter KJ, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, *et al.* In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H2O2) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999;4:91-6.
118. Haase S, Gibbons NC, Rokos H, Miles LK, Schallreuter KJ. Perturbed 6-tetrahydrobiopterin recycling via decreased dihydropteridine reductase in vitiligo: more evidence for H2O2 stress. *J Invest Dermatol.* 2004;122:307-13.
119. Schallreuter KJ, Wood JM, Pittelkow MR, Butler G, Swanson N, Korner C, *et al.* Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. *Archives of dermatological research.* 1996;288:14-8.
120. Schallreuter KJ, Wood JM, Pittelkow MR, Gullich M, Lemke KR, Rod W, *et al.* Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science.* 1994;263:1444-6.
121. Schallreuter KJ, Wood JM, Ziegler I, Lemke KR, Pittelkow MR, Lindsey NJ, *et al.* Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1226:161-92.
122. Masciocci V, Roccolta M, Roccolta 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.
123. Srivani PV, Babu NK, Gopal KV, Rao GR, Rao AR, Moorthy B, *et al.* Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009;75:268-71.
124. Passi S, Grandinetti M, Maggio F, Stancato A, De Luca C. Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1998;11:81-5.
125. Picardo M, Passi S, Morone A, Grandinetti M, Di Cato A, Ippolito F. Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1994;7:110-5.
126. Yildirim M, Baysal V, Inaloz HS, Keski D, Delibas N. The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo. *J Dermatol.* 2003;30:104-8.
127. Iyengar B. Modulation of melanocytic activity by acetylcholine. *Acta Anat (Basel).* 1989;136:139-41.
128. Schallreuter KJ, Dwyer SM, Gibbons NC, Rokos H, Wood JM. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H2O2: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:502-6.
129. Morone A, Picardo M, de Luca C, Terminali G, Passi S, Ippolito F. Catecholamines and vitiligo. *Pigment Cell Res.* 1992;5:65-9.
130. Cucchi ML, Fratini P, Santagostino G, Peda S, Orecchia G. Catecholamines increase in the urine of non-segmental vitiligo especially during its active phase. *Pigment Cell Res.* 2003;16:111-6.
131. Tursen U, Kaya TI, Erdal ME, Delici E, Gunduz O, Ilizoglu G. Association between catechol-O-methyltransferase polymorphism and vitiligo. *Archives of dermatological research.* 2002;294:143-6.
132. Li K, Li C, Gao L, Yang L, Li M, Liu L, *et al.* A functional single-nucleotide polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene alters vitiligo risk in a Chinese population. *Archives of dermatological research.* 2009;301:661-7.
133. Canton I, Akhtar S, Gavilan NG, Gawkrudger GJ, Blomhoff A, Watson PF, *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun.* 2005;6:584-7.
134. Laddha NC, Dwivedi M, ShajfEM, Prajapati H, Marfatia YS, Begum R. Association of PTPN22 1858C>T polymorphism with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *J Dermatol Sci.* 2006;49:260-2.
135. Laberge GS, Bilela SA, Fain PR, Spitz RA. The PTPN22-1858C>T (R620W) functional polymorphism is associated with generalized vitiligo in the Romanian population. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2006;21:206-8.
136. Laberge GS, Bennett DC, Fain PR, Spitz RA. PTPN22 is genetically associated with risk of generalized vitiligo, but CTLA4 is not. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1757-62.

Endereço para correspondência:
 Caio Cesar Silva de Castro
 Praça Rui Barbosa, 245
 80010-030 - Curitiba - PR
 Brasil
 E-mail: caio.castro@puqr.br

Como citar este artigo: Tarlé RG, Nascimento LM, Mira MT, Silva de Castro CC. Vitiligo - Parte I. *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):461-71.

Vitiligo: classificação, histopatologia e tratamento - Parte 2*

Adriane Reichert Faria^{1,2}
Marcelo Távora Mira²

Roberto Gomes Tarlé¹
Caio Cesar Silva de Castro^{1,2}

Gerson Dellatorre¹

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142717>

Resumo: Em um esforço inédito na área de vitiligo, foi realizado um consenso mundial que sugeriu uma nova classificação da doença. O principal achado histopatológico no vitiligo é a ausência total de melanócitos funcionantes nas lesões e as células inflamatórias mais comumente encontradas nos bordos das lesões são linfócitos CD4+ e CD8+. Os tratamentos físicos e com fármacos do vitiligo têm como objetivo controlar o dano autoimune aos melanócitos e estimular a migração de melanócitos dos bordos das lesões e do reservatório na bainha externa da raiz do pelo para a pele lesada. Além disso, os tratamentos cirúrgicos podem ser combinados com tratamentos tópicos e físicos.

Palavras-chave: Histologia; Resultado de tratamento; Terapêutica; Vitiligo

CLASSIFICAÇÃO DO VITILIGO

De acordo com a revisão realizada pelo *Vitiligo Global Issues Consensus Conference*¹ entre 2011-2012, o vitiligo pode ser classificado nas seguintes formas clínicas (Tabela 1):

* Vitiligo Não Segmentar (VNS): grupo composto pelas formas acrofacial, mucoso, generalizada ou comum, universal, mista e formas raras.

a. Acrofacial: pode afetar face, cabeça, mãos e pés e atingir, preferencialmente, região peribucal e extremidade dos dígitos;

b. Mucoso: quando envolve mucosas oral e genital. Além disso, áreas de mucosa podem ser afetadas em pacientes com as formas acrofacial, comum e universal; quando afeta um só sítio mucoso, é classificada como indeterminada;

c. Generalizado ou comum (Figura 1): as máculas/manchas são frequentemente simétricas, podem afetar qualquer parte do tegumento e afetam, principalmente, mãos, dedos, face e áreas mais expostas a traumatismos;

d. Universal: é a forma que afeta maior extensão do tegumento (80 a 90% da superfície corporal) e é mais comum na fase adulta. Geralmente, é precedida pela forma generalizada ou comum;

e. Misto: é o acometimento concomitante de vitiligo segmentar e vitiligo não segmentar. Na maioria das vezes, a forma segmentar precede o VNS;

f. Formas raras: puntata, minor e folicular. Esses tipos foram também considerados como inclassificáveis.

* Vitiligo segmentar: pode ser uni, bi ou multissegmentar (Figura 2). A forma unissegmentar é a mais comum e consiste na presença de uma ou mais máculas brancas em um lado do corpo, geralmente respeitando a linha média corporal, em envolvimento dos pelos (leucotriquia) e no rápido início do quadro. Menos comumente, pode afetar dois ou mais segmentos e até ocorrer distribuição segmentar bilateral, com início simultâneo ou não.

* Formas inclassificáveis ou indeterminadas:

- a) Focal: mancha branca isolada que não apresenta disposição segmentar. Esta forma pode evoluir para as formas segmentar ou não segmentar.
- b) Mucoso: quando só uma mucosa é afetada.

Este consenso foi um grande avanço em direção à padronização da classificação do vitiligo, mas ainda existem alguns aspectos que precisarão ser melhor apreciados em uma próxima revisão, tais como: 1) a redação da classificação do antigo tipo *vulgaris* ficou confusa porque, na tabela, fala-se em tipo generalizado e, no apêndice, esta forma é citada como sendo comum; 2) no vitiligo acrofacial, também podem ocorrer lesões em genitália que não foram descritas na classificação.² Além disso, não se pode afirmar que o vitiligo acrofacial necessariamente evolua para formas mais graves da doença. Assim, estudos prospectivos, de coorte, são necessários para se investigar esta hipótese; 3) as formas raras, que foram designadas como

Recebido em 24.04.2013.

Aprovado pelo Conselho Editorial e aceito para publicação em 11.06.2013.

* Trabalho realizado na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil.

Supporte Financeiro: Nenhum.

Conflito de Interesses: Nenhum.

¹ Santa Casa de Misericórdia Hospital – Curitiba (PR), Brasil.

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) – Curitiba (PR), Brasil.

©2014 by Anais Brasileiros de Dermatologia

TABELA 1: Classificação do vitiligo

Tipos	Subtipos
Vitiligo Não Segmentar	Acrofacial Mucoso (mais de um sítio afetado) Generalizado ou comum Universal Misto (associado com vitiligo segmentar) Formas raras
Segmentar	Uni, bi ou plurissegmentar
Inclassificável ou indeterminado	Focal Mucoso (um só sítio afetado)

Adaptado de: Revised classification/terminology of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference - 2012



FIGURA 1: Vitiligo comum. O vitiligo comum caracteriza-se pela bilateralidade e frequente simetria das lesões



FIGURA 2: Vitiligo segmentar. O vitiligo segmentar caracteriza-se pela unilateralidade das lesões, que respeitam quase totalmente a linha média corporal. Existem casos raros de vitiligo segmentar bilateral

inclassificáveis, não deveriam estar no grupo VNS da tabela e, sim, no grupo inclassificável.

HISTOPATOLOGIA

Os melanócitos derivam de células da crista neural. De tais células pluripotenciais também têm origem os neurônios, células gliais, células cardíacas, tecido craniofacial e medula adrenal. Os precursores dos melanócitos, os melanoblastos, migram, proliferam e diferenciam-se no percurso até seus destinos na epiderme basal e folículos pilosos.²

Os melanócitos e queratinócitos da epiderme formam unidades funcionais e estruturais, conhecidas como unidades melanoepidérmicas, nas quais cada melanócito transporta seus melanossomos através de dendritos para, aproximadamente, 36 queratinócitos associados. A pigmentação da pele resulta desta estreita interação entre melanócitos, que produzem os melanossomos, e os queratinócitos, que os recebem.⁴ Os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme numa taxa de 1 para cada 5 queratinócitos basais.^{5,6}

A manutenção deste equilíbrio ocorre através de indução controlada da divisão dos melanócitos.⁷ Para proliferar, o melanócito desacopla-se da membrana basal e dos queratinócitos, retrai seus dendritos, divide-se, migra pela membrana basal e reacopla-se à matriz e aos queratinócitos para formar uma nova unidade melanoepidérmica.⁷

Os queratinócitos exercem efeitos nos melanócitos por meio da produção de diversos fatores que regulam sua sobrevivência.⁸ Propiciam o microambiente necessário à proliferação, à diferenciação e à migração melanocítica.⁸

A diferença histopatológica fundamental entre a pele de coloração normal e a pele com vitiligo é a ausência de melanócitos funcionantes.^{9,12} Embora possa haver melanócitos viáveis na pele lesional, mais comumente estes encontram-se ausentes, o que pode ser verificado pela coloração de Fontana-Masson, específica para melanina ou pela técnica de dihidroxi-

fenil alanina para demonstração da tirosinase.^{33,34} As técnicas que utilizam autoanticorpos para pesquisa de linhagem melanocítica e microscopia eletrônica também demonstram que as manchas acrómicas de vitiligo são desprovidas de melanócitos.³⁵ Outras colorações que podem ser úteis são: DOPA, que detecta melanócitos ativos, e HMB-45, Mel-5, NKI/beteb, que detectam melanócitos ativos e inativos.³⁶

Em lesões de longa duração, já foram identificadas alterações degenerativas em nervos cutâneos e estruturas anexiais, como glândulas sudoríparas, sebáceas ou do folículo piloso. Tais alterações foram mais proeminentes em doença de longa duração, segundo uma análise de 74 casos de vitiligo.³⁷

Alterações inflamatórias foram encontradas com mais frequência em lesões recentes. Quando presentes, as células inflamatórias identificadas foram predominantemente células T CD4+ e CD8+.³⁸ Funcionalmente, tais células isoladas de pele com vitiligo podem demonstrar citotoxicidade melanocito-específica em pele não lesional.³⁹

Nas margens de lesões recentes, pode haver um infiltrado superficial linfocitário e, ocasionalmente, liquenóide mononuclear. Na borda externa de pele com vitiligo, os melanócitos são maiores, frequentemente vacuolados e com longos processos dendríticos preenchidos com grânulos de melanina.²

A pele de coloração normal adjacente também pode apresentar focos de alterações vacuolares na junção dermoepidérmica em associação com discreto infiltrado mononuclear.⁴⁰ Em pacientes com vitiligo comum ativo, foi identificada infiltração de células T na junção dermoepidérmica de pele não lesional, com o desaparecimento dos melanócitos da área.⁴¹ Já foram encontrados depósitos de material granular extracelular e focos de degeneração vacuolar de queratinócitos basais e parabasais em análise por microscopia eletrônica de biópsias localizadas até 15 cm de distância de manchas de vitiligo.⁴²

TRATAMENTO DO VITILIGO

O tratamento do vitiligo tem como objetivo controlar o dano autoimune aos melanócitos e estimular a migração de melanócitos de seus reservatórios da pele ao redor e anexos. O tratamento pode ser dividido em farmacológico, físico e cirúrgico, por vezes podendo ser combinados.

1. Tratamento farmacológico
 - a. Tópico
 - b. Sistêmico
2. Tratamento físico
3. Tratamento cirúrgico

1. Tratamento farmacológico
 - a. Tratamento tópico

Corticosteroide

A corticoterapia tópica é considerada um tratamento de primeira linha no vitiligo, sendo de baixo custo e de fácil aplicação.² A limitação deste tratamento se dá pelo risco de efeitos adversos locais, como atrofia, estrias e telangiectasias, e sistêmicos. Por este motivo, o uso de corticosteroides tópicos de alta potência é mais adequado para o acometimento de pequenas áreas, sendo mais eficazes na face, cotovelos e joelhos. Alguns autores dão preferência ao uso dos de baixa potência na face e regiões flexurais.²

Em um estudo de metanálise, foi demonstrada a maior eficácia do uso de corticosteroides tópicos de classe 3 no tratamento do vitiligo localizado, quando comparados aos de classe 4 e inatalesional, mostrando também maior incidência de atrofia nos de classe 4.²

Um estudo retrospectivo comparou o uso de corticosteroide tópico de alta e média potência em 101 crianças. Nos dois grupos, houve repigmentação em 64% dos casos, estabilização em 24% e piora em 11%. Em análise estratificada pela potência do corticosteroide, não houve diferença entre o de moderada e o de alta potência ($p=0,03$); também não houve diferença na incidência de efeitos adversos locais ($p=0,3$). Este estudo deve ser interpretado com cuidado devido à posologia variada de aplicação do medicamento, bem como do pequeno número de casos no grupo de média potência.²

Embora estudos recomendem o uso de corticoterapia tópica de alta potência em vitiligo localizado, o seu uso deve ser limitado por 2 a 4 meses, para se diminuir o risco de efeitos adversos. O uso de corticosteroides de baixa potência ou o uso de outros imunomoduladores deve ser considerado. Se não houver resposta da corticoterapia tópica em 3 a 4 meses, esta deve ser interrompida.²

Inibidores da calcineurina

Inibidores da calcineurina são imunossuppressores usados inicialmente em pacientes transplantados. O primeiro deles, a ciclosporina, não apresenta boa absorção cutânea, não sendo usada topicamente. Posteriormente, outros inibidores da calcineurina, o tacrolimo e o pimecrolimo, apresentaram boa absorção quando usados topicamente na pele.⁴

Os corticosteroides inibem a síntese de colágeno, levando a um maior risco de atrofia cutânea, especialmente em uso prolongado. Uma vantagem dos inibidores de calcineurina é que a neocolagênese é independente da calcineurina, não levando ao risco de atrofia.²⁵

O tacrolimo tópico é um inibidor da calcineurina, que age controlando a ação dos linfócitos T por inibir citocinas pró-inflamatórias, bloqueando a transcrição de genes da IL-2 que são importantes para a

proliferação de linfócitos T citotóxicos, inibindo também a transcrição e a produção de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α .¹⁷ Em um estudo open-label não comparativo, 42 pacientes foram tratados com tacrolimo 0,1%, duas vezes ao dia, por seis meses; 76,09% dos pacientes apresentaram alguma repigmentação, crianças apresentaram resposta superiores à dos adultos e as formas clínicas com múltiplas lesões foram a vulgar e focal.¹⁸

Em um estudo randomizado, duplo-cego, o uso do tacrolimo 0,1% foi tão eficaz quanto o propionato de cicloheximol 0,5%, quando aplicado duas vezes ao dia, por 60 dias, em crianças ($P=0,05$). Ambos os tratamentos tiveram maior resposta em áreas faciais ou com alta densidade de folículos pilosos. Atrofia e telangiectasias só foram observadas no grupo que usou cicloheximol.¹⁹

O pimecrolimo 1% foi comparado ao propionato de cicloheximol 0,5% em um estudo prospectivo em hemidivíduos, sem diferenças estatísticas na repigmentação.²⁰

A associação de imunossupressor tóxico com tratamento físico foi investigada em um estudo comparativo, randomizado, cego ("single-blind"), e mostrou melhor resposta terapêutica em grupo tratado por LASER de excimer (308nm) associado a pimecrolimo tóxico 1%, quando comparado ao LASER usado isoladamente.²¹

O uso de inibidores de calcineurina sem demonstrando uma eficácia similar ao uso de corticosteroides tópicos, não apresentando o risco de atrofia cutânea no uso a longo prazo.²²

Calcipotriol e dipropionato de betametasona

O uso do calcipotriol associado a corticosteroides tópicos vem sendo relatado na literatura. Em uma série de casos, foram observados 75% de repigmentação em pacientes resistentes a tratamentos prévios, como tacrolimo e corticosteróide tópicos.²³ O uso de análogos da vitamina D tem sido associado a UVB narrowband e excimer LASER.²⁴

Tratamento sistêmico

Corticoterapia sistêmica

A corticoterapia sistêmica tem sido usada em vitiligo em casos de lesões disseminadas de rápida progressão. A diminuição da citotoxicidade mediada pelo complemento dos níveis de anticorpos contra a superfície dos melanócitos foi descrita em portadores de vitiligo instável respondentes à corticoterapia sistêmica.²⁵ Em um estudo não comparativo em 81 pacientes portadores de vitiligo, tratados com prednisona diariamente, na dose de 0,3 mg/kg/dia, por dois meses e, posteriormente, em dose regressiva até o quinto mês,

foi observado controle da progressão da doença e repigmentação em 87,2% e 74,1%, respectivamente.²⁶

Com o objetivo de minimizar os efeitos adversos inerentes a este tratamento, o uso do corticosteroide sistêmico na forma de minipulso tem sido uma alternativa. Um estudo de metanálise demonstrou menor incidência de efeitos adversos sistêmicos e maiores no esquema psicológico de minipulso, quando comparado ao uso diário desta droga.²⁷

O uso de minipulso oral, fmg de betametasona/dexametasona, por dois dias consecutivos por semana, foi avaliado em portadores de vitiligo extenso e/ou de progressão rápida, em 1 a 3 meses; 89% dos pacientes com doença progressiva tiveram estabilização de suas lesões, em 2 a 4 meses, e 80% dos pacientes apresentaram algum grau de repigmentação.²⁸

Vinte e nove portadores de vitiligo foram submetidos a dois pulso semanal de 10mg de dexametasona, em dois dias consecutivos, no máximo por 24 semanas, com controle da progressão em 88%, porém sem repigmentação em 72,4% dos pacientes.⁸ Estes estudos apoiam a viabilidade de maiores evidências nesta forma de tratamento.

2. Tratamento físico

A irradiação ultravioleta (UV), tanto no espectro de UVB quanto de UVA, vem sendo usada no tratamento do vitiligo. Seu efeito ainda não é completamente compreendido, mas pode agir levando à imunossupressão, inibindo a destruição de melanócitos ou estimulando o aumento do número e capacidade de migração de melanócitos.²⁹

UVB de banda estreita (Narrow band UVB - NB/UVB)

O tratamento com UVB de banda estreita (311nm) é considerado de primeira linha no tratamento do vitiligo, sendo uma modalidade terapêutica eficaz e segura. Por ser um tratamento que não precisa do uso associado a um psoralênico oral, não tem os efeitos adversos oculares e gastrointestinais relacionados a esta droga.

Em 1997, um estudo comparativo pioneiro entre PUVA tópico e NB/UVB mostrou 46% de repigmentação no grupo submetido ao PUVA tópico e 67% no tratado por NB/UVB. O autor ainda salienta a menor dose cumulativa no grupo submetido ao NB/UVB e menor incidência de efeitos adversos.³⁰

Um estudo duplo-cego randomizado evidenciou 64% dos pacientes com mais de 50% de repigmentação no grupo submetido ao NB/UVB, comparados a 36% do grupo submetido ao PUVA sistêmico, tornando evidências da superioridade do NB/UVB.⁷

Em um resultado preliminar, em quatro casos de vitiligo tratados com NB/UVB associado a um anti-

logo sintético de hemônio melanotrófico, o alfa-melanomide, foi obtida repigmentação difusa e rápida, porém mais estudos se faz em necessários.⁸

Fototerapia com UVA e psoralênicos (PUVAterapia)

A fotoquimioterapia é um método terapêutico que envolve o uso de uma droga que potencializa os efeitos da luz. Os psoralênicos são as drogas mais utilizadas no tratamento do vitiligo, na forma de 8-metoxipsoraleno, 5-metoxipsoraleno ou trimetopsoaleno, podendo ser usados em suas formas tópica e oral.⁹

A PUVAterapia oral foi introduzida em 1948, sendo um tratamento bastante popular para o vitiligo, e consiste na aplicação de UVA (320-400nm) e uso de uma droga fotossensibilizante. A mais utilizada é o 8-metoxipsoraleno, administrada por via oral duas horas antes da aplicação de luz, na dose de 0,6mg/kg.

Os efeitos adversos mais frequentes a curto prazo são fototoxicidade cutânea e ocular, náusea e cefaleia e, a longo prazo, são relacionados à dose total, como fotossensibilizamento e aumento do risco de câncer de pele, especialmente carcinoma espinocelular.¹⁰

A PUVAterapia tópica pode ser usada em formas localizadas de vitiligo em adultos e crianças acima de 2 anos de idade, apresentando maior segurança por utilizar doses menores de UVA e pequena absorção de psoralênico tópicos.

Os melhores resultados com NB-UVB, bem como o maior perfil de segurança quando comparado à fototerapia com UVA, vêm fazendo com que esta seja menos utilizada.^{10*}

Luz monocromática de excimer

A luz monocromática de excimer em associação com o gás de cloro de sódio emite uma luz com comprimento de onda de 308nm. Existem duas formas de se produzir esta luz: o LASER de excimer, que produz uma luz coerente e monocromática, e a lâmpada de excimer, que produz uma luz não direcional e não coerente de 308nm. Essas formas de tratamento diferem do NB-UVB na sua forma de aplicação podendo ser aplicadas de forma mais localizada nas lesões.

Dos estudos comparativos em pacientes portadores de vitiligo apresentando simetria na distribuição de lesões compararam a resposta de hemidimidia tratadas por LASER de excimer e NB-UVB, evidenciando resposta mais rápida e maior área de repigmentação no grupo submetido ao excimer.^{11*}

Estudos comparando LASER com lâmpadas de excimer não mostraram diferenças nas taxas de resposta, porém as lâmpadas são mais descomodadas para a aplicação da dose necessária. Esta duração pode ser bastante longa em pacientes com lesões disseminadas.^{12*}

3 - Tática cirúrgica

O transplante cirúrgico de melanócitos é uma importante modalidade terapêutica disponível para pacientes com doença estável e que não respondem às terapias clínicas.¹³ É indicada também para áreas tradicionalmente recalcitrantes, como extremidades distais, cotovelos, joelhos, mamilos, pálpebras e lábios.¹⁴ Além disso, a escolha adequada dos pacientes, com a exclusão de pacientes com ferimento de Koebner e doença ativa, é essencial para prevenir lesões acróncas e áreas dolorosas e alcançar melhores resultados nas áreas receptoras.¹⁵ Um teste de microexsécia pode ser realizado previamente em casos de dúvida quanto à estabilidade da doença.¹⁶

A Escarota por Patch (EP) é a técnica mais fácil e de menor custo, embora seja geralmente limitada a tratar pequenas áreas.¹⁷ A área receptora é preparada através da realização de múltiplos patches de tamanho igual ou 0,25 a 0,5mm menor do que aqueles retirados da área doadora.¹⁸ O tamanho ideal dos enxertos em EP é de até 1mm para áreas finas e até 1,2mm para outras regiões.¹⁹ Enxertos maiores produzem com frequência um efeito cosmeticamente indesejável da técnica, conhecido como *cobblestony* (aparência de pedras de calcamento). Este efeito colateral, geralmente, apresenta resolução espontânea ou através de tratamentos como a dermabrafiação.²⁰ A EP é capaz de produzir excelente repigmentação e bons resultados cosméticos. Em um estudo prospectivo com grande número de pacientes, 74,5% dos pacientes submetidos à EP obtiveram 90-100% de repigmentação.²¹ Evidências ainda sugerem que a associação da EP com fototerapia (UVB narrow-band) ou antitumorais tópicos pode aproximar os resultados terapêuticos da técnica.^{22*}

A Escarota de Bolhas Epidérmicas obtidas por sucção (EBES) é uma técnica de obtenção de áreas enxertos de pele através da separação dermoepidérmica por via da aplicação de sucção prolongada na área doadora. A área receptora é preparada através de dermabrafiação ou da aplicação de laser (Erbium:YAG ou CO₂).²³ Embora a EBES seja uma técnica demorada e restrita ao tratamento de pequenas áreas, ela pode fornecer bons resultados terapêuticos (repigmentação >75% em 89% dos pacientes), com mínimas chances de produzir cicatrizes inestéticas na área doadora, conforme demonstrou um estudo recente.²⁴

Oxentes cutâneas de espessura parcial também apresentam boas taxas de repigmentação, 90-100%, de acordo com Agarwal et al, e a vantagem de tratar grandes áreas com um único procedimento através da obtenção do enxerto com ajuda de um dermatômo, mas é um procedimento que exige habilidade e experiência.²⁵ Além disso, a incompatibilidade de áreas na área receptora e a formação de cicatrizes na área doadora são potenciais efeitos colaterais desta técnica.²⁶

A enxertia autóloga com Suspensão de Células Epidérmicas Não Cultivadas (SCENC), uma técnica de transplante celular, possui a vantagem de tratar uma área receptora cerca de 10 vezes maior que a área doadora, com excelente compatibilidade de cor.⁶⁴ Neste procedimento, um fragmento de pele é obtido através de biópsia por *shaving* e a epiderme é separada da derme utilizando-se uma solução com tripsina. Após alguns passos adicionais, uma suspensão de queratinócitos e melanócitos é obtida e transplantada na pele receptora desepitelizada.^{65,66} Em estudo randomizado com 41 pacientes, a repigmentação foi considerada excelente (90-100% de repigmentação) em 71% das lesões no grupo tratado com SCENC, em comparação a 27% das lesões no grupo tratado com a técnica de EBES.⁶⁴ O cultivo celular também tem sido utilizado como meio de aumentar o número de células viáveis e tratar áreas ainda maiores, utilizando menos tecido doador. Entretanto, esse é um método de alto custo e que requer a estrutura de um laboratório de cultivo de tecidos.⁶⁷ Além disso, o uso de alguns mitógenos presentes nos meios de cultura gerou questionamentos a respeito da segurança do procedimento.⁶⁸

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito tem sido descoberto nos últimos anos sobre a fisiopatologia da doença, direcionando a apresentação dos achados clínicos a três principais fatores: 1) um déficit de adesão em toda a epiderme, não só afetando a adesão dos melanócitos como também a dos queratinócitos; 2) aumento do estresse oxidativo local e 3) citotoxicidade mediada por linfócitos T contra os melanócitos. No entanto, a real contribuição de cada um desses fatores em cada paciente ainda precisa ser bastante investigada.

Após décadas sem um devido esforço conjunto mundial, finalmente foi publicado um artigo de consenso para classificação do vitiligo; entretanto, ainda

existem alguns subtipos de vitiligo que não foram devidamente definidos sobre sua real existência ou posição na classificação por tipos e isto deve ser objeto de uma nova revisão da classificação no futuro, principalmente associando a caracterização dos tipos e subtipos clínicos a exames genético-moleculares.

Entre os grandes desafios da genética epidemiológica moderna está a validação dos achados de associação, através de estudos independentes de replicação e, em última instância, de estudos funcionais que levem à resolução do real efeito biológico causador da associação ou ligação observadas. A tarefa está longe de ser trivial: além do desafio clássico de se estabelecer uma relação de causa e efeito a partir de um achado de associação, o cenário que emerge atualmente, a partir de estudos de larga escala de características genéticas complexas (como os GWAS), tem revelado tremendos desafios. Por exemplo, é possível que o componente genético de controle de doenças como o vitiligo, detectável em estudos observacionais, esteja pulverizado em dezenas – talvez centenas – de genes, cada um contribuindo com uma pequena parcela do risco relativo final. É possível ainda que variantes genéticas muito raras em nível populacional, mas encontradas em todo genoma, sejam responsáveis por uma grande parcela deste risco relativo. Testar esta hipótese exigirá uma capacidade de sequenciamento de genoma humano completo, só recentemente disponível aos grandes laboratórios. Finalmente, é possível que os fenótipos clínicos com os quais se trabalha classicamente, tais como “vitiligo”, sejam complexos demais – neste caso, a definição de fenótipos moleculares mais controlados, definidos a partir de sistemas biológicos *in vitro*, por exemplo, pode ser decisiva. Desenvolvimentos neste sentido começam a se tornar públicos, abrindo novas avenidas na direção do entendimento completo das bases genéticas de doenças complexas, em geral, e do vitiligo, em particular. □

REFERÊNCIAS

1. Erzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hanzavi I, Lan CC, et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:E1-13.
2. Silva de Castro CC, do Nascimento LM, Glândola M, Mira MT. A pattern of association between clinical form of vitiligo and disease-related variables in a Brazilian population. *J Dermatol Sci.* 2012;55:63-7.
3. Lin JF, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007;445:943-50.
4. Westerhof W. The discovery of the human melanocyte. *Pigment Cell Res.* 2005;19:183-93.
5. Lee AY, Kim NH, Choi W, Youm YH. Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-biopsied epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2006;124:876-83.
6. Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine.* 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1992.
7. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp. Proc.* 2006;10:153-63.
8. Carlson JA, Linette GP, Apin A, Ng B, Stornello A. Melanocyte receptors: clinical implications and therapeutic relevance. *Dermatol Clin.* 2007;25:541-57, viii-b.
9. Moretti S, Spallanzani A, Amato L, Hautmann G, Gallenzi I, Fabiani M, et al. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res.* 2002;16:87-92.
10. Le Poidec K, Das PK. Microscopic changes in vitiligo. *Clin Dermatol.* 1997;15:663-73.
11. Le Poidec K, van den Wijngaert RM, Westerhof W, Dumoux-PE, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol.* 1993;100:816-22.
12. Tobin DJ, Swanson NN, Pittelkow MR, Peters BM, Schallreuter KU. Melanocytes are not absent in lesional skin of long duration vitiligo. *J Pathol.* 2000;191:407-16.

13. Yaghoobi R, Ormian M, Bagherani N. Vitiligo: a review of the published work. *J Dermatol*. 2011;38:419-31.
14. Kim YC, Kim YJ, Kang HY, Sohn S, Lee ES. Histopathologic features in vitiligo. *Am J Dermatopathol*. 2008;30:112-6.
15. Yaghoobi R, Razi T, Fely A. Clinical image: an unusual pigmented basal cell carcinoma arising from vitiligo. *Acta Dermatovenereol Alp Panonica Adriat*. 2011;20:81-2.
16. Alkhan A, Felsten LM, Daly M, Petrovic-Rasic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:473-91.
17. Botsy RE, Dell'Anna ML, Picardo M. On the pathophysiology of Vitiligo: possible treatment options. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2012;78:24-9.
18. van den Broek JG, Krijnenberg D, Delemijn TA, van der Veen JF, Bos JD, Melief CJ, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol*. 2009;129:2220-32.
19. Winkler-Kalchauer A, van den Wijngaert FM, Tigges BJ, Westerhof W, Ogg GS, Comandré V, et al. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T cells in Type-1 like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest*. 2003;83:933-935.
20. Mostlmann G, Non-Angerer S, Scollay DA, Nordlund JJ, Lerner AB. Extracellular granular material and degeneration of keratinocytes in the normally pigmented epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*. 1982;79:321-30.
21. Kwiter J, Pfeleter J, Khambhala A, Pope E. High-potency steroid use in children with vitiligo: a retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:236-41.
22. Loti T, Berti S, Moretti S. Vitiligo therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10:2779-85.
23. Njoo MD, Spuls RI, Bos JD, Westerhof W, Botsuyt FM. Nonsurgical repigmentation therapies in vitiligo. Meta-analysis of the literature. *Arch Dermatol*. 1998;134:1532-40.
24. Falabella R, Barona ME. Update on skin repigmentation therapies in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22:42-65.
25. Kostovic K, Paris A. New treatment modalities for vitiligo: focus on topical immunomodulators. *Drugs*. 2005;65:447-59.
26. Udumapatalai M, Srinivasulu P, Srinivasan R. Effectiveness of 0.1% topical calcitriol in adult and children patients with vitiligo. *J Dermatol*. 2011;38:535-40.
27. Lopez V, Moncada B, Castaneda-Cazares JE, Torres-Avancez MB, Ortiz CA, Torres-Rubalcava AB. A double-blind randomized trial of 0.1% tacrolimus vs 0.05% clobetasol for the treatment of childhood vitiligo. *Arch Dermatol*. 2003;139:981-5.
28. Coskun B, Saral Y, Turgut D. Topical 0.05% clobetasol propionate versus 1% pimecrolimus ointment in vitiligo. *Bur J Dermatol*. 2005;15:89-91.
29. Hai-Lan Y, Xiao-Yan H, Jian-Yong F, Zong-Fang L. Combination of 308-nm excimer laser with topical pimecrolimus for the treatment of childhood vitiligo. *Pediatr Dermatol*. 2009;28:354-6.
30. Travis LB, Silverberg NB. Calcipotriene and corticosteroid combination therapy for vitiligo. *Pediatr Dermatol*. 2004;21:495-8.
31. Newman MD, Silverberg NB. Once-daily application of calcipotriene 0.0095% betamethasone dipropionate 0.054% ointment for repigmentation of facial vitiligo. *Cutis*. 2011;88:255-9.
32. Kim SM, Lee HS, Han SK. The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. *Int J Dermatol*. 1999;38:546-50.
33. Paolichia JSI, Khalil BK. Oral mini-pulse therapy with betamethasone in vitiligo patients having extensive or fast-spreading disease. *Int J Dermatol*. 1992;32:713-7.
34. Radakovic-Fijan S, Rimstein-Friedl AM, Honigsmann H, Tanev A. Oral dexamethasone pulse treatment for vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:814-7.
35. Radtke A, Leone G. Photo(chemo)therapy for vitiligo. *Photoimmunol Photomed*. 2011;27:261-77.
36. Westerhof W, Neuwelzer-Krodtova L. Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A. *Arch Dermatol*. 1997;133:1525-8.
37. Yones SS, Palmer RA, Garbalkinos TM, Hawk JL. Randomized double-blind trial of treatment of vitiligo: efficacy of psoralen-UV-A therapy vs narrowband-UV-B therapy. *Arch Dermatol*. 2007;143:78-84.
38. Grimes PE, Horowitz I, Lebowitz M, Ortonne JP, Lim HW. The efficacy of amelanotide and narrowband UVB phototherapy for repigmentation of vitiligo. *JAMA Dermatol*. 2013;149:68-73.
39. Felsten LM, Alkhan A, Petrovic-Rasic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:493-514.
40. Hong SB, Park HH, Lee MH. Short-term effects of 308-nm xenon chloride excimer laser and narrow-band ultraviolet B in the treatment of vitiligo: a comparative study. *J Korean Med Sci*. 2005;20:273-8.
41. Casado MI, Thomas R, Radtke A, Bonneviale A, Pano Videlin A, Leone G. Comparison between 308-nm monochromatic excimer light and narrowband UVB phototherapy (311-313 nm) in the treatment of vitiligo—a multicentre controlled study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21:956-63.
42. Le Du F, Fontas E, Giaccheri D, Sillard L, Lacour JP, Ortonne JP, Passeron T, et al. 308-nm excimer lamp vs. 308-nm excimer laser for treating vitiligo: a randomized study. *Br J Dermatol*. 2010;163:188-92.
43. Shi Q, Li K, Fu J, Wang Y, Mo C, Li Q, et al. Comparison of the 308-nm excimer laser with the 308-nm excimer lamp in the treatment of vitiligo—a randomized bilateral comparison study. *Photoimmunol Photomed*. 2013;29:27-33.
44. Park KK, Liao W, Murose JE. A review of monochromatic excimer light in vitiligo. *Br J Dermatol*. 2012;167:468-78.
45. Njoo MD, Westerhof W, Bos JD, Botsuyt FM. A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. *Arch Dermatol*. 1993;124:1548-9.
46. Patel NS, Faghdal KV, Cohen GE. Advanced treatment modalities for vitiligo. *Dermatol Surg*. 2012;38:381-91.
47. Fongers A, Welkenhorst A, Neuwelzer-Krodtova L, Krawczyk P, Tóth GS, van der Veen JF. Long term results of 2-mm punch grafting in patients with vitiligo vulgaris and segmental vitiligo: effect of disease activity. *Br J Dermatol*. 2009;161:1105-11.
48. Parsad D, Gupta S, IADVL Dermatological Task Force. Standard guidelines of care for vitiligo surgery. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74:537-46.
49. Taleb A, Akmar A, Ertim M, Dell'Anna ML, De Paes A, Belthradou V, et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. *Br J Dermatol*. 2013;169:5-19.
50. Falabella R. Surgical treatment of vitiligo: why, when and how. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003;17:515-20.
51. Lohri K, Malakar S, Samra N, Banerjee U. Repigmentation of vitiligo with punch grafting and narrow-band UV-B (311 nm)—a prospective study. *Int J Dermatol*. 2005;43:649-53.
52. Sakthia KD, Machado Ribeiro CD, Paschoa FM. Action of topical mometasone on the pigmented halo of micrografting in patients with vitiligo. *An Bras Dermatol*. 2012;87:885-93.
53. Agrawal K, Agrawal A. Vitiligo: repigmentation with dermabrasion and thin split-thickness skin graft. *Dermatol Surg*. 1995;21:295-300.
54. Budania A, Parsad D, Kanwar AJ, Dogra S. Comparison between autologous non-cultured epidermal cell suspension and suction blister epidermal grafting in stable vitiligo: a randomized study. *Br J Dermatol*. 2012;167:295-301.
55. Czajkowski R, Polkrywczyńska M, Flacok W, Zegarska B, Tadrowski T, Droza T. Transplantation of cultured autologous melanocytes: hope or danger? *Cell Transplant*. 2010;19:639-43.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Caio Cesar Silva de Castro
Praça Rui Barbosa, 245
80010-030 - Curitiba - PR
Brasil
E-mail: caio.castro@puccpr.br

Como citar este artigo: Reichert-Faria A, Tarlé RG, Dellatorre G, Mium MT, Silva de Castro CC. Vitiligo: classificação, histopatologia e tratamento - Parte 2. *An Bras Dermatol*. 2014;89(5):785-91.

10.5 ANEXO 5 – Tabela da Influência das variáveis na associação do polimorfismo do genes estudados e vitiligo na população de trios.

Gene	Fenótipo		Idade				Autoimunidade		Tipo Clínico		História Familiar		Köebner	
	Marçador	Allelo	< 18 anos	≥ 18 anos	< 25 anos	≥ 25 anos	Sim	Não	Segmentar	Não segmentar	Sim	Não	Sim	Não
CDH1	rs10431924	T	0.2 1.23 (0.9-1.7)	0.23 0.7 (0.39-1.27)	0.41 1.33 (0.67-2.62)	0.32 0.71 (0.366-1.393)	0.03 1.56 (1.04-2.37)	0.38 1.34 (0.69-2.58)	0.7 1.22 (0.45-3.32)	1.72 (1.03-2.79)	0.24 1.29 (0.84-1.97)	0.45 0.69 (0.362-1.81)	0.56 0.85 (0.49-1.48)	0.14 1.34 (0.91-1.98)
	rs1801552	T	0.46 1.64 (0.71-1.53)	0.8 0.64 (0.44-6.03)	0.42 1.35 (0.64-2.85)	0.37 1.36 (0.69-2.68)	0.73 1.07 (0.69-1.98)	0.77 1.45 (0.63-3.32)	0.12 1.69 (0.87-3.27)	1.29 (0.8-2.06)	0.51 1.51 (0.81-2.84)	0.37 1.4 (0.67-2.94)	0.40 1.23 (0.76-1.97)	0.83 0.96 (0.64-1.43)
	rs7186333	T	0.63 0.89 (0.56-1.42)	0.32 0.8 (0.53-1.24)	0.8 1.09 (0.32-3.70)	0.29 1.84 (0.58-5.81)	0.67 0.89 (0.51-1.54)	0.23 0.73 (0.43-1.23)	0.12 2.5 (0.78-7.97)	0.92 (0.47-1.78)	0.36 0.5 (0.27-1.92)	0.45 0.65 (0.21-2.02)	0.21 0.52 (0.28-1.94)	0.42 1.24 (0.73-2.1)
	rs7196495	G	0.45 0.8 (0.44-1.44)	0.41 0.8 (0.46-1.37)	0.6 0.7 (0.19-2.61)	0.86 1.12 (0.28-4.36)	0.32 0.71 (0.37-1.39)	0.41 1.88 (0.4-8.74)	0.17 0.44 (0.14-1.44)	0.23 0.39 (0.08-1.83)	0.59 1.69 (0.17-2.69)	0.23 0.69 (0.38-1.26)	0.73 1.11 (0.58-2.15)	0.15 0.62 (0.33-1.19)
NOV	rs8056633	C	0.63 0.89 (0.56-1.42)	0.32 0.80 (0.52-1.24)	0.88 1.09 (0.32-3.7)	0.3 1.84 (0.58-5.81)	0.26 2.44 (0.51-11.73)	0.23 0.72 (0.43-1.23)	0.12 1.83 (0.58-5.81)	0.29 3.18 (0.7-14.47)	0.13 1.03 (0.62-1.70)	0.89 2.24 (0.02-2.45)	0.22 1.24 (0.73-2.1)	0.42 1.24 (0.73-2.1)
	rs8059139	G	0.38 1.36 (0.88-2.70)	0.23 1.57 (0.74-3.33)	0.74 0.66 (0.06-7.35)	0.51 1.24 (0.64-2.37)	0.65 1.22 (0.50-2.95)	0.29 1.52 (0.69-3.34)	0.14 2.67 (0.70-10.05)	0.33 1.78 (0.55-5.89)	0.33 1.79 (0.54-5.88)	0.73 1.12 (0.57-2.21)	0.67 0.83 (0.36-1.93)	0.2 1.63 (0.77-3.46)
	rs9927789	T	0.14 4.99 (0.58-42.78)	0.62 0.85 (0.44-1.62)	0.85 0.93 (0.47-1.87)	0.69 1.12 (0.61-2.07)	0.78 1.38 (0.13-14.15)	0.73 0.89 (0.45-1.74)	0.62 1.75 (0.18-16.48)	0.51 0.75 (0.32-1.78)	0.51 0.86 (0.48-1.83)	0.86 0.93 (0.46-1.89)	0.69 0.85 (0.39-1.85)	0.69 0.85 (0.39-1.85)
	rs2071519	A	0.28 0.77 (0.485-1.14)	0.22 0.78 (0.52-1.16)	0.64 1.35 (0.37-4.9)	0.22 0.78 (0.52-1.16)	0.65 1.35 (0.37-4.9)	0.14 1.42 (0.88-2.31)	0.80 0.88 (0.33-2.34)	0.34 1.84 (0.52-6.53)	0.38 0.81 (0.49-1.31)	0.64 1.11 (0.706-1.76)	0.46 1.60 (0.44-5.81)	0.30 1.26 (0.80-1.98)
IL1B	rs7014927	T	0.74 0.92 (0.60-1.43)	0.56 0.89 (0.61-1.30)	0.75 0.92 (0.56-1.51)	0.4 1.45 (0.56-3.71)	0.12 0.7 (0.45-1.09)	0.07 1.53 (0.96-2.43)	0.41 1.4 (0.62-3.15)	0.34 0.79 (0.49-1.27)	0.34 0.79 (0.49-1.27)	0.11 1.42 (0.91-2.22)	0.25 0.74 (0.44-1.23)	0.19 1.32 (0.86-2.02)
	rs1143633	C	0.2 2.00 (0.95-4.67)	0.06 1.58 (0.95-2.63)	0.1 1.45 (0.91-2.29)	0.9 0.94 (0.38-2.38)	0.19 0.54 (0.22-1.35)	0.42 1.24 (0.73-2.1)	0.12 0.51 (0.21-1.21)	0.83 1.09 (0.48-2.51)	0.12 0.58 (0.27-1.27)	0.41 1.21 (0.76-1.92)	0.12 0.5 (0.207-1.20)	0.69 1.10 (0.66-1.84)
	rs1143634	G	0.15 0.65 (0.36-1.16)	0.35 0.78 (0.46-1.31)	0.05 0.66 (0.28-0.98)	0.32 0.74 (0.40-1.34)	0.31 1.45 (0.7-3.02)	0.88 1.04 (0.58-1.88)	0.5 0.82 (0.41-1.66)	0.31 1.45 (0.70-3.03)	0.73 1.12 (0.57-2.20)	0.87 1.05 (0.57-1.90)	0.51 1.23 (0.65-2.34)	0.74 1.11 (0.58-2.1)

F BAT, Family based association test. p, valor de p. OR, Odds Ratio. IC, Intervalo de confiança