

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE ANHANGUERA
MAURICIO BARBAN

PADRÃO DE RESPOSTA DE LINFÓCITOS DE PACIENTES
PORTADORES DE VITILIGO AO TRATAMENTO COM TACROLIMUS

SÃO PAULO
2013

MAURICIO BARBAN
UNIVERSIDADE BANDEIRANTE ANHANGUERA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA

PADRÃO DE RESPOSTA DE LINFÓCITOS DE PACIENTES
PORTADORES DE VITILIGO AO TRATAMENTO COM TACROLIMUS

Dissertação de Mestrado apresentada
para obtenção da qualificação em
Farmácia pelo Programa de Pós-
graduação em Farmácia da Universidade
Bandeirante Anhanguera

Orientadora: Prof^a. Dra. Susana Nogueira
Diniz.

SÃO PAULO
2013

Barban, Mauricio

Padrão de resposta de linfócitos de pacientes portadores de vitiligo ao tratamento com tacrolimus / Maurício Barban. -- São Paulo: [s.n.], 2013.

45 f.; il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado em Farmácia (*Stricto sensu*) –
Universidade Bandeirante Anhanguera, Curso de pós-graduação.
Orientadora: Profa. Dra. Susana Nogueira Diniz

1. Resposta imune 2. Vitiligo 3. PBMC 4. Autoanticorpos 5.
Tacrolimus. I Título

RESUMO

BARBAN, M. **Padrão de resposta de linfócitos de pacientes portadores de vitiligo ao tratamento com tacrolimus**. 2013. 45 f. Programa de Mestrado em Farmácia apresentado a Universidade Bandeirante Anhanguera, São Paulo, 2013.

O vitiligo é uma doença dermatológica adquirida que apresenta máculas acromicas do tecido cutâneo, de etiopatogenia desconhecida. O portador dessa doença pode apresentar alterações no sistema imunológico, geralmente associadas com um fenótipo autoimune. Fatores genéticos e atualmente fatores epigenéticos têm sido associados ao desenvolvimento do vitiligo e de doenças autoimunes. O tratamento do vitiligo com imunomoduladores, como o tacrolimus, tem apresentado resultados controversos fazendo-se necessários estudos mais aprofundados sobre a resposta ao tratamento com esse imunossupressor. Neste estudo foram avaliados os efeitos farmacológicos do tratamento *in vitro* com tacrolimus, como proliferação celular e produção de IL-2 pelas metodologias do MTT e ELISA, o que permitiu classificar os pacientes em dois grupos: portadores de vitiligo respondedores e não respondedores ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus. Os resultados gerados *in vitro* foram comparados com a resposta clínica *in vivo* ao tacrolimus 0,1% pomada. Foi mostrado que os pacientes classificados como respondedores *in vitro* apresentaram títulos elevados de autoanticorpos (anti-tireoglobulinas e anti-peroxidase) e iniciaram a repigmentação parcial na região avaliada na pele, afetada pelo vitiligo *in vivo*. Por outro lado, pacientes não respondedores *in vitro* não apresentaram anticorpos autoimunes associados e não repigmentaram a lesão afetada, com exceção do paciente V4 que apresentou uma repigmentação parcial da lesão. Os resultados apresentados sugerem que a avaliação de parâmetros farmacológicos *in vitro* e o monitoramento de autoanticorpos podem ser úteis para a predição de resposta clínica ao tratamento com drogas imunossupressoras comumente utilizadas na prática clínica, no caso o tacrolimus. Este processo serviria com objetivo de se avaliar *ex vivo*, o impacto do fármaco no paciente, antes mesmo de se iniciar o tratamento.

Palavras-chave: Resposta imune, vitiligo, PBMC, autoanticorpos, tacrolimus.

ABSTRACT

BARBAN, M. **Immune response pattern of lymphocytes from vitiligo patients to the treatment with tacrolimus.** 2013. 45 f. Programa de Mestrado em Farmácia apresentado a Universidade Bandeirante Anhanguera, São Paulo, 2013.

Vitiligo is a skin disease that has acquired achromatic patches of skin tissue and some patients could have an immune response deregulation usually associated with an autoimmune phenotype. Genetic factors are associated with vitiligo development and currently epigenetic factors have been correlated with autoimmune diseases and also with vitiligo. Since the response to vitiligo treatment with immunomodulators such as tacrolimus has shown controversial results further studies has been necessary. This study evaluated the pharmacological effects, such as, cell proliferation and IL-2 production *in vitro* tacrolimus treatment in PBMC from vitiligo patients, by ELISA and MTT methodology. Thus, it was possible to classify patients into two groups of cells: responders (R) and non-responders (NR) to tacrolimus treatment. The results generated *in vitro* were compared with clinical response *in vivo* to tacrolimus 0,1%. It was shown that patients classified as R *in vitro* showed elevated titers of autoantibodies (anti-tireoglobulins and anti-peroxidase) and presented a partial repigmentation of skin affected by vitiligo. Moreover, patients that do not respond *in vitro* also do not repigmented skin lesions and were not associated with detection of autoantibodies. However, V4 patient classified as NR *in vitro*, showed a partial repigmentation *in vivo*. The results presented here suggest that assessing pharmacological parameters *in vitro* and monitoring autoantibodies may be useful to predict clinical response to treatment with immunosuppressive drugs commonly used in clinical practice, in the case tacrolimus. This process could be usefull to evaluate the impact of *ex vivo* drug action before patient treatment.

Keywords: immune response, vitiligo, PBMC, autoantibodies, tacrolimus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo da pele demonstrando camada basal, melanócitos e melanina	12
Quadro 1 – Classificação dos fototipos de Fitzpatrick	13
Figura 2 – Fotografia representativa dos dois tipos de vitiligo: segmentar (A) e não segmentar(B)	15
Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação dos inibidores da calcineurina (tacrolimus e ciclosporina)	20
Figura 4 – Representação da separação de células mononucleares do sangue periférico(PBMC)	25
Gráfico 1 – Quantificação de células mononucleares isoladas de indivíduos voluntários (número de células x 10 ⁵ / mL)	28
Figura 5 – Coloração do meio de cultura RPMI contendo vermelho de fenol como indicador de pH	29
Gráfico 2 – Proliferação de células do sistema imune proveniente de voluntários (V1 a V6) após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) e tratamento com o imunossupressor tacrolimus (FK)	30
Gráfico 3 – Quantificação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC provenientes de paciente portadores de vitiligo (V1 a V6) após estímulo com (PHA) e tratamento com o imunossupressor FK	32
ANEXO I - Dados de absorvância (densidade óptica DO) de proliferação celular com PHA, FK e controle	42
ANEXO II – Dados de absorvância (densidade óptica DO) de quantificação de IL-2 por Elisa	43
ANEXO III – Cálculo da concentração (pg/mL) de IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC	44
ANEXO IV – Fotografias representativas dos pacientes portadores de vitiligo utilizados nesse trabalho	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínicos de pacientes portadores de vitiligo (V1-V6)	24
Tabela 2 – Dados da avaliação clínicas dos pacientes (V1-V6) <i>in vivo</i>	33
Tabela 3 – Classificação de pacientes portadores de vitiligo respondedores (R) e não respondedores (NR) ao tratamento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com tacrolimus.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTIPO	Antiperoxidase (antimicrosomal)
ANTITG	Antitireoglobulina
ACP	Célula apresentadora de antígeno
C	Controle
C3	Componente do sistema complemento 3
C4	Componente do sistema complemento 4
CCR6	CC Chemokine Ligands 6
CCR7	CC Chemokine Ligands 7
CCR8	CC Chemokine Ligands 8
CD3	Cluster de diferenciação 3
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD103	Cluster de diferenciação 103
CD25	Cluster de diferenciação 25
CD27	Cluster de diferenciação 27
CD45RA	Cluster de diferenciação 45 de LT
CD45RO	Cluster de diferenciação 45 de LT de memória
CD62L	CL Cluster de diferenciação 62L
CLA	Antígeno cutâneo linfocitário
CLT	Linfócitos T citotóxicos
CpG	Dinucleotídeo citosina e guanina
CTLA4	Cytotoxic L Lymphocyte Antigen 4
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Acido dextrorribonucléico
D.O	Densidade óptica
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimático
E-selectina	Selectina Endotelial
Fas	Receptor celular da família do TNF

FK506	Tacrolimus
FNAT	Fator nuclear de células T ativadas
FOXP3	Fator de transcrição "Forhead Box P3"
GITR	Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor R
HEPES	Tampão N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid)
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen classe II
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecula 1 OU CD54
IF	Imunofilina
IFN- α	Interferon Alfa
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Interleucina 2 Receptor
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1
LTCD8	Linfócitos T citotóxicos
MCHR1	Melanin Concentraing Hormone Receptor 1
MHC	Genes do complexo de histocompatibilidade
MHC II	Major Histocompatibility Complex Class II
MTT	3-4,5 Dimethiazol 2 YL 2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromide
NF-AT	Fator de transcrição
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
P	Fósforo
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato
PHA	Fitohemaglutinina

PLC	Fosfolipase
Pmel17	Premelanosome Protein
PUVA	Psoraleno com ultravioleta
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TCR	Receptor da célula T
TK	Tirosinaquinase.
TNF	Tumor Necrosis Factors
TNF- β	Tumor Necrosis Factors Beta
TNFR-2	Tumor Necrosis Factor Receptor 2
Tregs	Linfócitos T reguladores
TRP	Proteína relacionada à tirosinase
TRP1	Proteína relacionada à tirosinase 1
TRP2	Proteína relacionada à tirosinase 2
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UVB	Ultravioleta B
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VIT	Antígenos associados ao vitiligo
VIT1	Proteína vitiligo associado 1
VIT40	Proteína vitiligo associado 40
VIT75	Proteína vitiligo associado 75
VIT90	Proteína vitiligo associado 90
VLA-4	Very Late Antigen 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISAO DE LITERATURA	13
2.1	Aspectos clínicos do vitiligo	13
2.2	Aspectos imunológicos do vitiligo	16
2.3	Tratamento do vitiligo	19
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Definição de caso	23
4.2	Cultura de células mononucleares	25
4.3	Proliferação celular	26
4.4	Quantificação de IL-2 no sobrenadante de cultura	27
4.5	Análise estatística	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Cultura de células mononucleares de pacientes com vitiligo e analise colorimétrica do sobrenadante	28
5.2	Avaliação da resposta ao tratamento com o imunossupressor tacrolimus <i>in vitro</i>	29
5.2.1	Medida de proliferação celular	29
5.2.2	Quantificação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura	31
5.3	Avaliação clínica da resposta ao tratamento <i>in vivo</i> com tacrolimus	33
5.4	Correlação da resposta ao tratamento <i>in vitro</i> com resposta com clinica em <i>in vivo</i> em pacientes com vitiligo	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
	ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

Vitiligo é uma doença cutânea sistêmica crônica, multifatorial e poligênica, que ocorre em qualquer parte da pele e/ou mucosas e/ou pêlos e cabelos (Figura 1), caracterizada por máculas acrômicas, que atinge 0,5% a 2% (LERNER & NORDLUND, 1978) da população mundial e ambos os sexos. A doença geralmente começa na infância ou na idade adulta jovem com pico de início entre 10 e 30 anos (HALDER & CHAPELL, 2009). Todas as raças são afetadas pela doença, não havendo estudos que evidenciam maior prevalência entre fototipos cutâneos ou etnia (ORTONNE, 2008).

A etiologia é pouco conhecida e discutida, sendo a mais aceita atualmente o modelo da autoimunidade uma vez que pacientes portadores de vitiligo, podem também manifestar doenças autoimunes como: tireoidites, doença de Addison, anemia perniciosa, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico e outras (KEMP et al., 2001). Entretanto, existem também descritas causas neurais, genéticas, bioquímica, oxidativas, virais, ambientais e outras que levam a redução funcional e/ou física dos melanócitos e com isso a despigmentação que se traduz na clínica como acromia. Foi mostrado que pacientes com vitiligo apresentam células T ativadas em lesões periféricas, além de autoanticorpos circulantes contra antígenos presentes na superfície de melanócitos e outros (KEMP et al., 2001). Embora ainda não esteja claro o mecanismo de lesão dos melanócitos e conseqüente perda da sua função, estes achados demonstram a presença de uma resposta imune celular e humoral contra autoantígenos, na doença vitiligo. Por isso, o uso de imunomoduladores, medicamentos que atuam na inibição da ativação, maturação dos linfócitos T e inibição da produção das interleucinas, pode atuar na repigmentação da pele lesada devido a sua ação moduladora nos linfócitos autorreativos.

A resposta clínica ao tratamento com tacrolimus apresenta resultados variados dependendo de fatores ainda não totalmente elucidados, fazendo-se necessários estudos mais aprofundados sobre a resposta ao tratamento com esse imunossupressor. Trabalhos demonstram que pacientes com vitiligo tratados com tacrolimus creme 0,03% para crianças de 2 a 15 anos de idade e tacrolimus creme 0,1% para indivíduos maiores de 16 anos de idade, aplicados duas vezes ao dia,

para todas as lesões acromicas, apresentam alguma recuperação das lesões em qualquer tipo de pele da classificação de Fitzpatrick. Entretanto, observou-se um maior benefício na pele tipo 3-4 e com repigmentação das lesões na cabeça e pescoço mais significantes do que a repigmentação do corpo e extremidades, a despeito da raça do paciente (SILVERBERG & SILVERBERG, 2011).

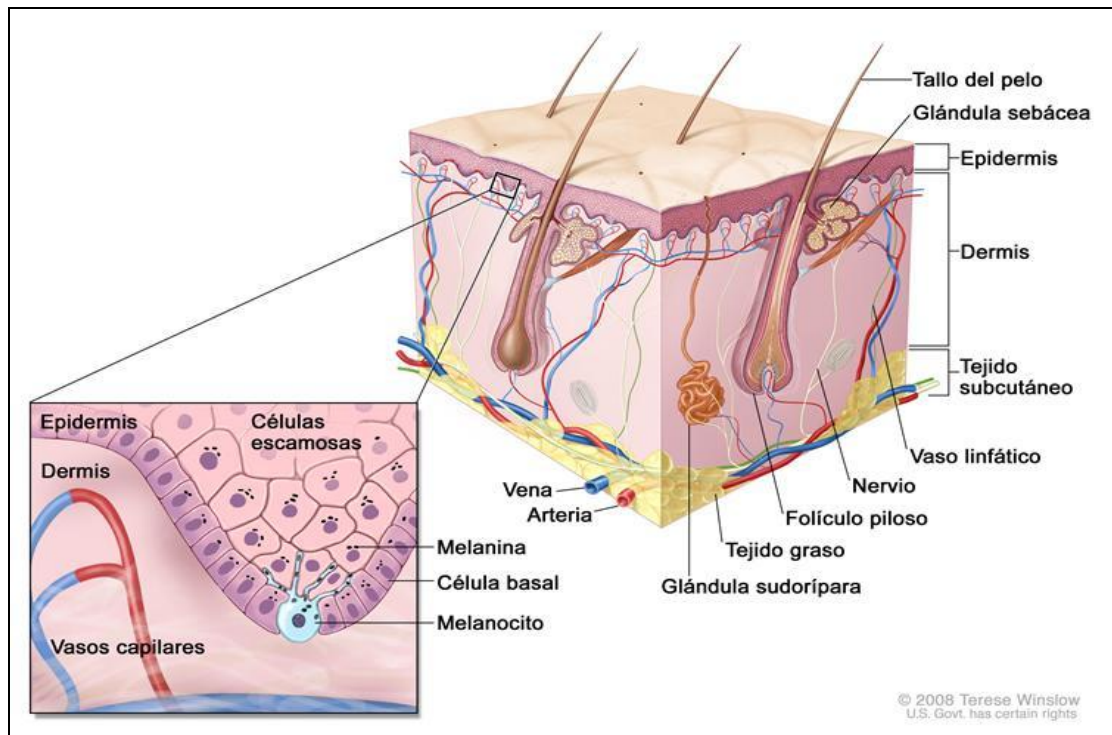


Figura 1 – Esquema representativo da pele demonstrando camada basal, melanócitos e melanina.

Fonte: WINSLOW, 2008.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Aspectos clínicos do vitiligo

O vitiligo é uma doença cutânea sistêmica crônica, multifatorial e poligênica, que ocorre em qualquer parte da pele e/ou mucosas e/ou pêlos e cabelos, caracterizada por máculas acromicas adquiridas de diversas formas e tamanhos, de evolução clínica imprevisível que atinge 0,5% a 2% da população mundial (LERNER & NORDLUND, 1978).

Todos os grupos étnicos e fototipos (Quadro 1) são afetados pela doença e igualmente em ambos os sexos. Geralmente a doença inicia na infância ou na idade adulta jovem, com pico entre 10 e 30 anos, doença que pode ser desfigurante, influenciando na autoestima individual, na qualidade de vida e no convívio social, apesar de não levar a incapacidade funcional. (NORDLUND & MAJUMDER, 1997).

Fototipos	Características	Sensibilidade ao Sol
I – Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II – Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III – Morena Clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV – Morena Moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V – Morena Escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI - Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

Quadro 1 – Classificação dos fototipos de Fitzpatrick
Fonte: FITZPATRICK, THOMAS B., 2001.

A etiopatogenia do vitiligo ainda é pouco conhecida, acredita-se que doença pode ser decorrente de fatores genéticos (NATH *et al.*, 1994) autoimunes (BYSTRYNY, 1997), oxidativos, neurais (REEDY *et al.*, 1998), bioquímicos (SCHALLREUTER *et al.* 1994), virais e ambientais, que por mecanismos não conhecidos levam a diminuição, ausência ou não funcionalidade dos melanócitos,

ocorrendo a despigmentação da pele ou mucosas (NATH *et al.*, 1994; BYSTRYN,1997; REEDY *et al.*, 1998), (SCHALLREUTER *et al.* 1994),

As lesões discrômicas acometem mais a face, pescoço e áreas onde ocorrem traumatismos de repetição (fenômeno de Koebner), entretanto podem ocorrer em qualquer localização da pele, incluindo mucosas. Há uma predileção por orifícios: olhos, narinas, boca, mamilos, umbigo, ânus e genitália.

Nas últimas décadas propôs-se um sistema de classificação ao vitiligo, em decorrência de casos clínicos não se comportarem da mesma maneira. Koga (KOGA, 1977) classifica o vitiligo baseado em parâmetros clínicos e patogênicos dividindo-o em duas formas clínicas: não segmentar (tipo A) e segmentar (tipo B) (Figura 1). O vitiligo não segmentar inicia em qualquer idade, com surgimentos de novas lesões ao longo da vida do paciente, caracteriza-se por máculas distribuídas simetricamente, sendo a forma mais comum, geralmente de evolução instável e crônica. Apresenta características que podem estar associadas às doenças autoimunes. Observa-se agregação familiar, sugerindo existência de componente genético. Essa forma clínica é mais sujeita aos fenômenos de Koebner. O vitiligo segmentar acomete jovens, as máculas distribuem-se mais unilateralmente acompanhando dermatômos, linhas de Blaschko ou linhas de acupuntura, sendo mais raro, com início precoce, rápida evolução com persistência das lesões, interrupção da progressão das lesões após um ano e tem menor associação a doenças de etiologia endócrinas, autoimune e alérgicas. Apresenta grande variação inter-étnica na proporção total dos pacientes portadores. O nevo halo ou nevo de Sutton incluiria-se como fator adjunto (SILVA *et al.*, 2007).

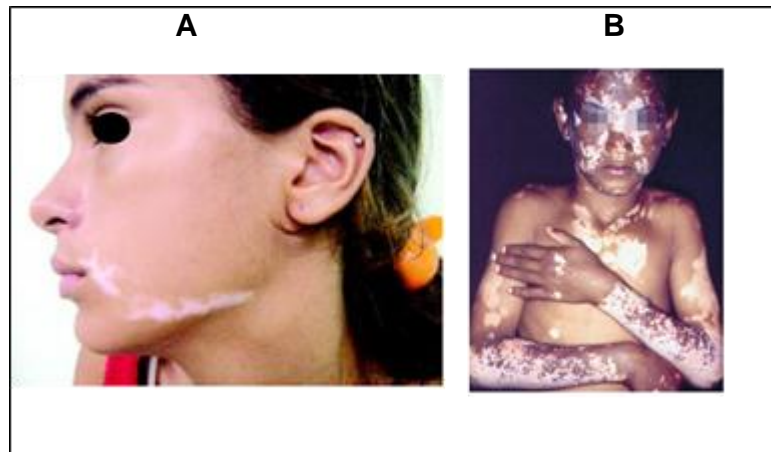


Figura 2 – Fotografia representativa dos tipos de vitiligo: segmentar (A) e não segmentar(B).
Fonte: SANTOS, 2006.

Além dessa classificação o vitiligo pode se subdividir em diversos e diferentes subtipos clínicos (LERNER, 1978) de acordo com áreas anatômicas ou quantidade de lesões, a seguir:

- vitiligo segmentar: máculas acrômicas agrupadas em um ou mais dermatômos.
- vitiligo acrofacial: máculas acrômicas limitadas a face, região periorifical em genitais e extremidades distais pés e mãos.
- vitiligo focal: máculas acrômicas em geral isoladas e limitadas em tamanho e número ocorrendo de forma não dermatomal.
- vitiligo vulgar ou generalizado: máculas acrômicas que ocorrem em diversas áreas: acrofacial, tórax, abdome, membros superiores, membros inferiores, de maneira simétrica.
- vitiligo universal: toda ou quase toda pele comprometida com máculas acromicas.

O diagnóstico do vitiligo caracteriza-se pela presença de máculas acromicas de diagnóstico clínico, de maneira geral, não tão difícil. Na dúvida recorre-se a biópsia e a lâmpada de Wood, que é muito útil para caracterizar a área da despigmentação, observando-se as bordas da lesão. O diagnóstico diferencial é feito com outras patologias dermatológicas que também levam a discromias tais como: piebaldismo, hipomelanose de Ito, nevo acromico, pitiríase versicolor, pitiríase alba, líquen escleroso e atrófico, hipomelanose gutata, hipopigmentações residuais, sarcoidose, sífilis, nevo halo, hanseníase e outras (HALDER & CHAPPELL, 2009).

2.2 Aspectos imunológicos do vitiligo

Quando algum mecanismo de tolerância falha pode ocorrer uma responsividade do sistema imune adaptativo contra o próprio indivíduo, com produção de autoanticorpos, lesando células, destruindo tecidos saudáveis e estabelecendo as doenças autoimunes, como Vitiligo, Doença de Addison, Doença Celíaca, Dermatomiosite, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto, Esclerose Múltipla, Miastenia Grave, Anemia Perniciosa, Artrite Reativa, Artrite Reumatoide, Alopecia Areata, Síndrome de Sjögren, Diabetes tipo 1, Anemia Aplástica, Artrite Psoriática, Dermatite Herpetiforme, Doença de Behçet, Doença de Kawasaki, Granulomatose de Wegener, Pênfigo Foliáceo e outras (LABERGE *et al.*, 2005). As doenças autoimunes tireoidianas são caracterizadas pela presença de anticorpos antitireóide, principalmente antitireoglobulina e antiperoxidase. A tireoglobulina é uma proteína, armazenada sob a forma de colóide no folículo tireoidiano, produzida pelas células da tireóide, sendo esta proteína precursora na síntese dos hormônios T3 e T4. Os anticorpos antiperoxidase eram antigamente conhecidos por antimicrosomal. A peroxidase tireoidiana é a enzima com função de adicionar o iodo ao resíduo de tirosina, para a produção dos hormônios tireoidianos. Entretanto, anticorpos antitireoidianos podem aparecer em pacientes sem manifestação clínica. Pacientes com doença tireoidiana autoimune possuem células T no sangue periférico e na própria tireóide que reconhecem moléculas tireoidianas específicas (tireoglobulina, tireoperoxidase e o receptor de TSH). Parte dessas células podem levar a destruição de células tireoidianas e ao mesmo tempo ativar células B para a secreção dos mesmos anticorpos contra antígenos tireoidianos perpetuando o ciclo. Esses anticorpos antitireoidianos podem servir como marcadores de doença autoimune decorrente da ativação de células B (GONÇALVES, 2009).

A etiopatogenia da doença vitiligo ainda não é totalmente conhecida. Pacientes portadores de vitiligo, podem também manifestar doenças autoimunes como: tireoidites, doença de Addison, anemia perniciosa, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico e outras (KEMP *et al.*, 2001). Foi mostrado que pacientes com vitiligo apresentam células T ativadas em lesões periféricas, além de autoanticorpos circulantes contra antígenos presentes na superfície de melanócitos e outros (KEMP

et al., 2001). Embora ainda não esteja claro o mecanismo de lesão dos melanócitos e consequente perda da sua função, estes achados demonstram a presença de uma resposta imune celular e humoral contra autoantígenos, na doença vitiligo. Por isso, o uso de imunomoduladores, medicamentos que atuam na inibição da ativação, maturação dos linfócitos T e inibição da produção das interleucinas, pode atuar na repigmentação da pele lesada devido a sua ação moduladora nos linfócitos autoreativos.

A presença de autoanticorpos contra antígenos de superfície celular nos melanócitos foi detectada através das técnicas de imunoprecipitação, imunofluorescência indireta, *immunoblotting* e ELISA. Os níveis desses anticorpos parecem estar relacionados com a atividade e extensão do vitiligo (NAUGHTON & REGGIARDO, 1986), sendo que 80% dos pacientes têm autoanticorpo circulantes contra antígenos de superfície dos melanócitos, que são citotóxicos para essas células (MORGAN *et al.*, 1986). Foram identificados em pacientes antígenos imunodominantes VIT40 (antígenos associados ao vitiligo), VIT75 e VIT90 (exclusivo de células pigmentadas). Outros antígenos TRP-1, TRP-2 e tirosinases foram também identificados em pacientes com melanoma, principalmente na forma metastática (KEMP *et al.*, 1998).

Autoanticorpos circulantes no soro de pacientes com vitiligo, dirigidos contra a tireoglobulina e/ou peroxidase estão presentes em 10 a 17% dos referidos pacientes (ORTONNE *et al.*, 2003). E ainda, pacientes portadores de vitiligo podem apresentar uma redução dos componentes C3 e C4 do sistema complementos. IgG de pacientes com vitiligo quando injetados em camundongos transplantados com pele humana levam a destruição dos melanócitos, entendendo indicando que existe uma citotoxicidade mediada por anticorpos (GILHAR A. *et al.*, 1995). Recentemente foi descoberto o anticorpo Pmel17 da classe IgG contra o receptor de superfície MCHR1 (*melanin concentraing hormone receptor 1*) de alta especificidade em pacientes com vitiligo. Discute-se, se esse anticorpo, é fundamental na gênese da doença ou se apareceu secundariamente ao processo de destruição dos melanócitos (KEMP, *et al.*, 1998).

Provavelmente ações imunológicas do tipo humoral e celular atuam de forma sinérgica na destruição dos melanócitos no vitiligo. As interleucinas ou citocinas emitem varios sinais que estimulam, modulam ou inibem diferentes células do

sistema imunológico. Podem atuar na própria célula que a produziu, ou atuar em células próximas e também à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica. É produzida principalmente por células T ativadas, principalmente T CD4+ e em menor quantidade podem ser produzidas por células B e monócitos. São necessários sinais, principalmente presença de IFN- α e IL-1 que induzem a ativação de fatores de transcrição para que haja máxima produção de IL-2. A síntese desta citocina pode ser inibida por fármacos imunossupressores como a ciclosporina, FK506 e dexametasona dentre outros (WAXMAN & BALKWILL, 1992). Suas atividades são mediadas por um receptor de membrana expresso em células T ativadas, em menor número em T não ativadas e B ativadas. Existem três tipos de receptores de afinidades: alta, baixa e intermediária (HATAKYAMA *et al.* 1989). A IL-2 é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T. Atua também em células B juntamente com outros fatores como a IL-4 (WEI *et al.*, 2008).

Diversas moléculas de adesão estão envolvidas na migração de células T dos linfonodos e vasos para os tecidos, mas a célula T de memórias CD45RO+ que infiltram a pele expressa um determinante antigênico único chamado de antígeno cutâneo linfocitário (CLA), sendo uma glicoproteína que é expressa no momento da transição das células T não ativadas para as células T de memória. O CLA além de atuar como marcador das células T de memória também atua como molécula de adesão no endotélio dos vasos cutâneo. Sob o efeito da IL1 e TNF a expressão de CLA ampliando a interação CLA/E-selectina, entre linfócitos e o endotélio. Outras interações também ocorrem: VLA-4/VCAM-1 (Very Late Antigen 4 / Vascular Cell Adhesion Molecule 1) e LFA-1/ICAM-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen 1 / Intercellular Adhesion Molecule 1). Na imunidade celular os CLA circulantes são 10 a 20% dos linfócitos no sangue. As células T de memória (CD45RO+) que expressam o CLA são geradas nos linfonodos indo para a pele e recrutadas no processo inflamatório. As células CD45RO+ não somente estão envolvidas na vigilância imunológica, mas também em outras doenças dermatológicas como dermatite de contato alérgica, psoríase, farmacodermia, líquen plano, doença enxerto contra hospedeiro e linfoma cutâneo de células T (SANTAMARIA-BABÍ, 2004). Células T *naive* (CD45RA+) são as células que nunca entraram em contato com o antígeno e são direcionadas dos linfonodos para o endotélio através da L-selectina, e quando

as células T *naive* encontram seu antígeno específico transformam-se em células T de memória (CD45RO+) expressando o CLA (Antígeno Cutâneo Linfocitário) saindo do linfonodo pelos linfáticos eferentes, atingem a pele, onde encontram as células apresentadoras de antígeno (GILHAR *et al.*, 1995). No vitiligo autoimune as células T citotóxicas autoreativas melanócito-específicas expressam o CLA e eliminam os melanocitos na área perilesiona (ANTELO, 2006).

2.3 Tratamento do vitiligo

Diversas formas de tratamento são preconizadas para o tratamento do vitiligo tais como: esteróides, PUVA, despigmentação, terapia cirúrgica, laser de UVB, imunomoduladores dentre outros (STEINER *et al.*, 2004). No grupo de imunomoduladores pode-se destacar o uso tópico de tacrolimus, um macrolídeo da classe de inibidores da calcineurina, que tem sido utilizado com frequência para o tratamento de pacientes com vitiligo. Esse fármaco tem afinidade à proteína imunofilina FK506-binding (JANEWAY, 2005). O bloqueio dessa imunofilina impede a ligação da calcineurina e a consequente inibição da interleucina IL2 e seu receptor de alta afinidade (CD25) no linfócitos T (ABBAS & LICHTMAN, 2004). Tacrolimus é o nome genérico do imunossupressor macrolídeo FK506, elaborado a partir do *Streptomyces tsukabaensis*, bactéria encontrado no Japão. Faz parte dos inibidores da calcineurina que é uma fosfatase cálcio-ativada, com mecanismo semelhante à ciclosporina. O mecanismo molecular de inibição ocorre da seguinte maneira: os linfócitos T são ativados através da interação do seu receptor de superfície (receptor da célula T = TCR) com o antígeno na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) via apresentação por MHC classe II. Os sinais de ativação do complexo CD3 levam ao aumento no cálcio intracelular e promovem a síntese da subunidade FNATn (fator nuclear de células T ativadas). O cálcio livre intracelular liga-se a calmodulina, que se liga e ativa a calcineurina. A calcineurina causa a defosforilação da subunidade citoplasmática do FNAT (FNATc) e esse migra para o núcleo e promove a transcrição de várias citocinas, tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e TNF. O tacrolimus bloqueia esse mecanismo normal de ativação inibindo a atividade da calcineurina, não havendo a defosforilação do fator FNAT e consequente migração para o núcleo. Assim, na presença desse imunossupressor não há expressão de citocinas como IL-2 (Figura 2).

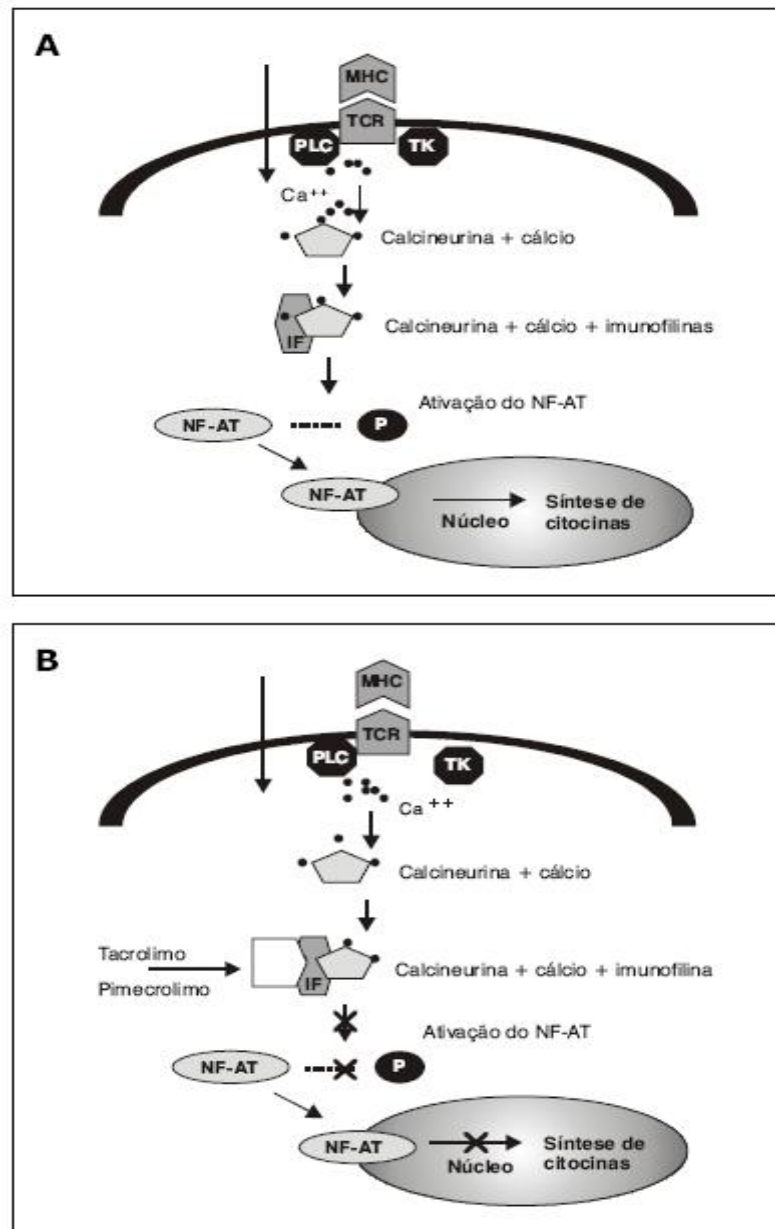


Figura 3 – A) Ação do fator de transcrição NF-AT via calcineurina, B) Ação dos inibidores da calcineurina. IF= imunofilina; NF-AT = FNAT = fator nuclear de células T ativadas; P = fósforo; PLC = fosfolipase C; TK = tirosina quinase.
Fonte: CASTRO, 2006

O tacrolimus pode ser usado tópico, oral e intravenoso. O uso tópico é aplicado em diversas doenças dermatológicas, via oral e intravenosa para prevenção de rejeição em transplantados. Em pacientes com vitiligo esse inibidor da calcineurina além de agir na borda da lesão onde se encontram as células T, possuem também efeito antiinflamatório e no sítio de aplicação (SIMON, 2005), reduz o número de células e de citocinas inflamatórias, sendo inclusive mais efetivo de que alguns glicocorticóides na redução da expressão de moléculas de adesão

vascular para a diapedese das células (CAPRONI *et al.*, 2006). Além disso, já foi relatada uma ação desse imunossupressor nos melanócitos (LAN *et al.*, 2005). Foi observado que o tratamento com tacrolimus aumenta o conteúdo de melanina, a expressão e atividade da tirosinase e a migração de melanócitos. Observou-se que altas doses desse fármaco inibem o desenvolvimento de Tregs e baixas doses o estimulam. As Tregs são uma subpopulação de células T caracterizadas pela expressão da molécula CD25+ e do fator nuclear FOXP3, sendo componentes essenciais na tolerância imunológica, pois bloqueiam a ativação e a função desses linfócitos, sendo importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não próprios. A IL-2 parece ter um papel importante no desenvolvimento das Tregs. Em murinos foi demonstrado que a deficiência de IL-2 no receptor resultou em defeitos graves de Tregs, as quais também foram evidenciadas em pacientes com deficiência congênita da molécula CD25. As Tregs além do marcador CD25 expressam outros não específicos tais como: CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*) e HLA-DR (*human leucocyte antigen*), CD27, Fas, CD62L; e os receptores de quimiocina CCR6, CCR7, CCR8 e CD103, o que permite a migração das Tregs até o local de inflamação (READ *et al.* 2006). O FOXP3 é composto por 3 domínios: repressor, central e ligante de DNA. O domínio repressor suprime a transcrição gênica mediada pelo fator nuclear de células T ativadas (NFAT – nuclear factor of activated T-cells). A sinalização nuclear pela FOXP3 nas Tregs não está bem definida, entretanto estudos experimentais, após a ligação do antígeno com o TCR, mostram uma atenuação na sinalização celular em decorrência da interação do FOXP3 com o NFAT reprimindo os genes de transcrição das citocinas IL-2, IL-4 e INF- γ . A escassez de Tregs, na pele de paciente com vitiligo, é provavelmente crucial, para perpetuar a atividade antimelanocítica na doença progressiva, que envolve uma resposta autoimune mediada por CLT (linfócitos T citotóxicos) (CAMPBELL *et al.*, 2007) (COFFER *et al.*, 2004).

O tacrolimus é hidrofílico com absorção sistêmica mínima e a outra vantagem é que a calcineurina não é necessária para sintetizar o colágeno não ocorrendo atrofia cutânea fato esse que não ocorre com os glicocorticóides. Efeitos colaterais do tacrolimus; ardência, foliculite, prurido, infecção cutânea, acne e hiperestesia. Não é fototóxico, fotosensibilizante e nem fotoalergênico. Há descrição de fotocarcinogênese, mas este fato é discutível.

A resposta clínica ao tratamento com tacrolimus apresenta resultados variados dependendo de fatores ainda não totalmente elucidados. Trabalhos demonstram que pacientes com vitiligo, tratados com tacrolimus creme 0,03% para crianças de 2 a 15 anos de idade e tacrolimus creme 0,1% para indivíduos maiores de 16 anos de idade, aplicados duas vezes ao dia, para todas as lesões acromicas, apresentam alguma recuperação das lesões em qualquer tipo de pele da classificação de Fitzpatrick. Entretanto, observou-se um maior benefício na pele tipo 3-4 e com repigmentação das lesões na cabeça e pescoço mais significantes do que a repigmentação do corpo e extremidades, a despeito da raça do paciente (SILVERBERG & SILVERBERG, 2011). Nesse trabalho foi sugerido que em áreas tratadas com tacrolimus (FK506) ocorre supressão da expressão da molécula TNF, que estaria envolvida no processo de repigmentação (GRIMES *et al.*, 1982).

Como descrito anteriormente o mecanismo de ação de imunomoduladores como o tacrolimus se dá pela sua ligação com a proteína FK506-binding, e o bloqueio da ligação da calcineurina no fator de transcrição NFAT (fator nuclear de ativação de linfócitos) e a conseqüente inibição da síntese de IL-2 e seu receptor de alta afinidade nos linfócitos T (ABBAS & LICHTMAN, 2004). Os inibidores da calcineurina reduzem o numero de células e de citocinas inflamatórias no sitio de aplicação (SIMON *et al.*, 2005). Mais recentemente foi notado ação dessas drogas na modulação da resposta imune pelos Tregs (VUKMANOVIC-STEJIC *et al.*, 2005).

É provável também, que os inibidores da calcineurina, além do bloqueio da produção de citocinas inflamatórias pelo linfócito T, promovam uma interferência na melanogênese. Em 2005, Lan e colaboradores (LAN *et al.*, 2005) observaram crescimento e migração de melanócitos e melanoblastos *in vitro* sob ação do tacrolimus. Em 2006 outros pesquisadores confirmaram, em cultura de melanócitos, aumento da biossíntese de melanina, pela maior atividade da tirosinase, além do aumento de migração dos melanócitos (KANG *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o padrão de resposta imune de células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de vitiligo selecionados com e sem anticorpos autorreativos ao tratamento com o imunomodulador tacrolimus

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e cultivar células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de vitiligo.

- Determinar a resposta ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus de células de pacientes com vitiligo, através da medida de proliferação celular e produção de IL-2.

- Correlacionar o padrão de resposta ao tratamento *in vitro* com a resposta clínica, após o tratamento tópico, com tacrolimus 0,1% creme, nas lesões acrómicas *in vivo*, durante 4 meses, verificando se houve repigmentação total ou parcial das áreas acrómicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Definição de caso

Através de anamnese e exame clínico dermatológico selecionou-se o indivíduo portador. Para esta pesquisa, foi criado um banco de células mononucleares do sangue periférico de seis (n=6) indivíduos portadores de vitiligo (Tabela 1), que foram subdivididos em pacientes portadores de anticorpos antitireoglobulina e/ou antiperoxidase (n=3) e de indivíduos não portadores (n=3), de ambos os sexos. Estes pacientes foram avaliados no período de setembro de 2012 a março de 2013 no consultório de dermatologia a Rua Américo Salvador Novelli 154, Sala 704, São Paulo, Capital, local de trabalho do pesquisador Mauricio Barban. As amostras de sangue foram coletadas antes do tratamento tópico com o imunossupressor tacrolimus (0,1% creme). Os dados clínicos, de localização,

quantidade e extensão das lesões e os dados terapêuticos de repigmentação das lesões, estão sendo coletados durante o período de 4 meses após o tratamento. Os dados coletados foram utilizados para determinar a eficácia do tratamento *in vivo* com tacrolimus em pacientes portadores de vitiligo para análise de correlação com os dados *in vitro*.

Tabela 1 – Dados clínicos de pacientes portadores de vitiligo (V1-V6)

Pacientes	Sexo	Idade	Raça	Tipo clínico	Valor TSH*	Ac AntiTG**	Ac AntiPO***
V1	F	58	Fitz 3	vulgar	206,78	165	63
V2	F	57	Fitz 2	vulgar	4,2	N	96,2
V3	F	37	Fitz 2	focal	0,02	319	N
V4	F	43	Fitz 3	focal	N	N	N
V5	M	31	Fitz 3	focal	N	N	N
V6	M	46	Fitz 3	focal	N	N	N

F = feminino, M = masculino, N = normal. * Valor referencia TSH (0,40 - 4,20 μ UI/mL). ** Valor referencia anticorpos antitireoglobulinas (AntiTG) (até 40 UI/mL). *** Valor referencia anticorpos antiperoxidase (AntiPO) (0,4-0,5 UI/mL).

Fonte: acervo pessoal

O sangue (30 mL) foi coletado de veia periférica da fossa cubital por enfermeira no Laboratório Nasa, SP, em tubos de heparina em local apropriado e supervisionado pelo pesquisador responsável pelo projeto e transportados devidamente para os laboratórios de pesquisa da UNIBAN. Através de tubos previamente identificados com números, as amostras colhidas foram identificadas, e por anamnese, foram colhidos os dados clínicos do doador. Os potenciais riscos para os sujeitos, de danos à sua dimensão física, são mínimos. Não se considerou haver risco do uso de informações derivadas deste estudo contra o sujeito doador da amostra, inclusive risco de constrangimento em seu ambiente de trabalho. O termo de consentimento livre e esclarecido que foi utilizado nessa pesquisa está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/ MS. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos da UNIBAN sob o número 283/12 em 19/07/12.

4.2 Cultura de células mononucleares

O sangue colhido foi transferido para tubos contendo ficoll hypaque (GE Healthcare) e após centrifugação (ALC – refrigerador centrifuge PK 120R) a 1400 rpm por 40 minutos separou-se os componentes do sangue em 3 fases: o plasma na parte superior do tubo; logo abaixo o anel de células mononucleares seguido do ficoll e no fundo por precipitação foram depositadas as células mais pesadas: hemáceas e células polimorfonucleares (Figura 3).

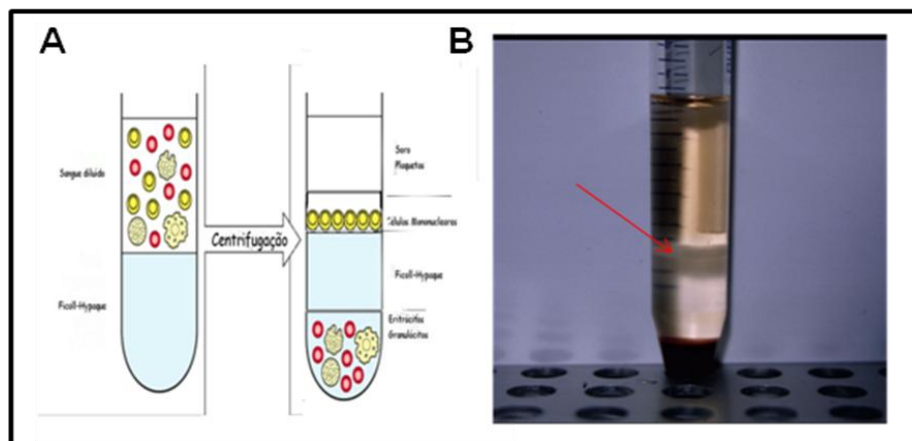


Figura 4 - Representação da separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O sangue total é colocado sob gradiente de Ficoll-Hypaque (A) e após centrifugação os componentes são separados estabelecendo-se na seguinte ordem de densidade: plasma na camada superior, seguido de anel de células de mononucleares (seta vermelha), o reagente ficoll e finalmente os componentes mais densos, polimorfonucleares e hemáceas (A e B).

Fonte: Biblioteca Digital Unicamp.

O anel de células mononucleares foi então coletado para um novo tubo e lavado duas vezes com tampão fosfato (PBS – “phosphate buffered saline”) por centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. As células foram finalmente ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) completo, composto por RPMI-1640, enriquecido com glutamina 2 mM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 mM, HEPES 20 mM, 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (10000 U/mL de penicilina e 10000 μ g/mL de estreptomicina) e Garamicina 30 mg/mL (Schering-Plough) e feita a contagem das células na câmara de Neubauer.

O meio RPMI é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Além disso, possui o vermelho de fenol como indicador de pH. Assim, o meio em pH ácido apresenta-se a cor amarela, em pH fisiológico (7.4) cor vermelho alaranjado e em pH básico um tom rosa.

Após a contagem, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC–*peripheral blood mononuclear cells*) de 6 pacientes portadores de vitiligo (V1, V2, V3, V4, V5 e V6) foram cultivadas (1×10^5) em placas de plástico (96 poços; marca Nunck) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células controle não foram ativadas (C) e as células teste foram ativadas com 100ng/μL de fitohemaglutinina (PHA). Destas ativadas metade foram tratadas com 10 ng/mL de tacrolimus e as restantes não foram tratadas com o fármaco por 120 h.

Os parâmetros farmacodinâmicos do efeito do tratamento foram avaliados pela medida de proliferação celular e pela produção de IL-2. Utilizou-se a análise desses efeitos farmacológicos para determinar a resposta ao tratamento *in vitro*, com o imunossupressor tacrolimus, nas células de pacientes portadores de vitiligo. Utilizou-se também esses dados para correlacionar com os dados clínicos avaliados pela repigmentação das áreas acrómicas, com o tratamento tópico, *in vivo* desse imunossupressor, o tacrolimus 0,1% creme.

4.3 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo método do “MTT” (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, da Sigma-Aldrich), que utiliza tetrazolium (MTT) bio-reduzido pelas células gerando um produto colorido chamado de formazona. A absorbância foi medida a 540 nm no aparelho de ELISA. A medida da formazona formada correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis na cultura. Após 120 h foram adicionados 50 microlitros de MTT em cada poço e deixou-se na estufa a 5% de CO₂ durante 4 horas à 37° C. Após esse período as células foram lisadas com DMSO e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A medida da formazona formada correlaciona diretamente com o número de células viáveis na cultura.

4.4 Quantificação de IL-2 no sobrenadante de cultura

A produção de IL-2 foi medida no sobrenadante de cultura por ELISA (ELISA Kit HU – QuantikineR – R&D Systems) após 120 h de cultura.

De acordo com recomendação do fabricante todos os reagentes foram colocados à temperatura ambiente antes do uso e preparados conforme indicado nas seções anteriores do manual de protocolo do fabricante. Todos os testes foram realizados em duplicata. A cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 100µl de diluente RD1W, fornecido pelo fabricante, acrescido de 100µl da amostra padrão (IL-2 recombinante em diluição seriada), ou das amostras obtidas do sobrenadante de cultura das células ou tampão (controle) por poço, e incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o volume foi aspirado de cada cavidade e lavou-se a cavidade com tampão de lavagem (400µL), repetindo o processo duas vezes para um total de três lavagens. Foi feita a remoção completa do líquido remanescente após a última lavagem por aspiração ou decantação, e a placa foi invertida e seca por papel toalha limpa.

Adicionou-se 200µL de anticorpo anti-IL-2 conjugado a cada poço e cobriu-se a placa com uma fita adesiva nova. Incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente, e repetiu-se a aspiração \ lavagem como no passo anterior. Finalmente adicionou-se 200µL de solução de substrato a cada poço e incubou-se a placa durante 20 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. A cada poço foram adicionados 50µL de solução de bloqueio da reação e a cor nos poços que era azul modificou-se para amarelo. A leitura, para determinar a densidade óptica de cada poço foi realizada no prazo de 30 minutos, utilizando um leitor de microplacas ajustado para 450nm.

4.5 Análise estatística

Para comparação entre os grupos tratados e não tratados com o imunossupressor foi utilizado o teste t de student pareado e considerado significante valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultura de células mononucleares de pacientes com vitiligo e análise colorimétrica do sobrenadante

As células mononucleares (PBMC) dos seis indivíduos com vitiligo (V1-V6) obtidas foram contadas em câmara de Neubauer e obteve-se os resultados apresentados no gráfico 1. Pode-se observar que a recuperação das células mononucleares apresentou um bom rendimento.

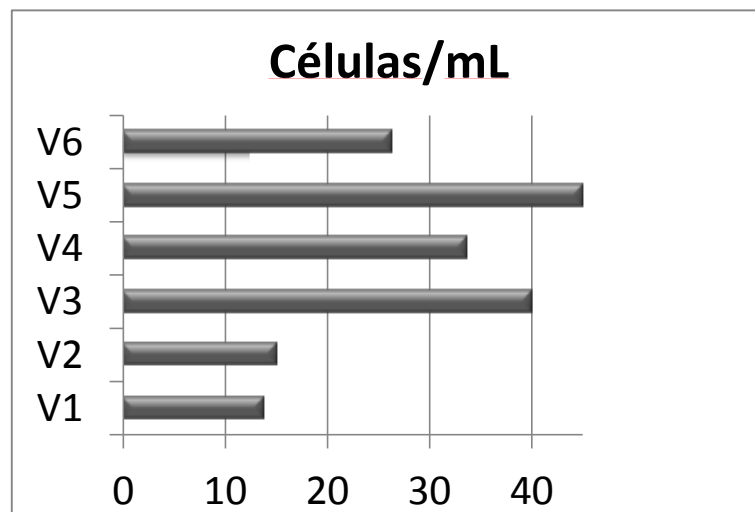


Gráfico 1 – Quantificação de células mononucleares isoladas de pacientes portadores de vitiligo (V1 a V6) contadas em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos em número de células $\times 10^5$ / mL.

Fonte: acervo pessoal

Após a contagem, as células (1×10^5) foram cultivadas em placas de plástico (96 poços; marca Nunck), a proliferação avaliada e o sobrenadante foi recolhido para dosagem de IL-2 por ELISA.

A análise colorimétrica visual do sobrenadante da cultura mostrou que o meio de cultura se apresentou com pH neutro nos poços controle (C), devido a baixa proliferação dessas células, pH ácido nos poços estimulados (PHA), devido a alta taxa de proliferação das células e nos poços tratados com o imunossupressor

tacrolimus (FK), foi observado tanto pH neutro, nas células responsivas ao imunossupressor, indicando a ação do FK no bloqueio da proliferação celular, quanto pH ácido, nas células não responsivas ao imunossupressor, indicando que o FK não inibiu a proliferação celular (Figura 4).

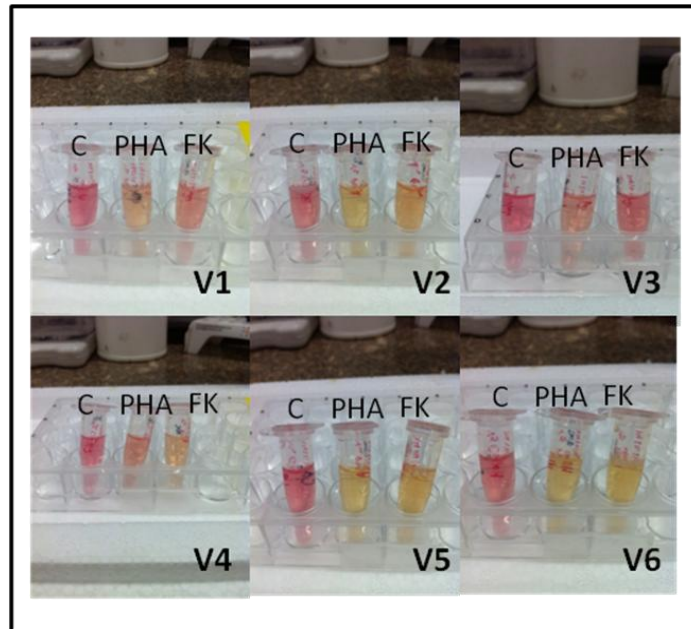


Figura 5 – Coloração do meio de cultura RPMI contendo vermelho de fenol como indicador de pH após 120 h de cultivo de células do sistema imune provenientes de 6 pacientes portadores de vitiligo (V1-V6), sem estímulo, controle (C), estimuladas com mitógeno (PHA) e tratadas com o imunossupressor tacrolimus (FK).

Fonte: acervo pessoal

5.2 Avaliação da resposta ao tratamento com o imunossupressor tacrolimus *in vitro*

5.2.1 Medida de proliferação celular

Os dados de absorvância (densidade óptica - D.O.) da medida em triplicata da viabilidade celular obtidos neste estudo estão apresentados no ANEXO I, onde se observa os dados dos seis pacientes (V1 – V6) dos grupos controle (C), estimulado com mitógeno (PHA) e tratado com tacrolimus (FK). Na tabela também estão representados as médias e o desvio padrão para cada grupo.

Nesse estudo foi mostrado que o tratamento *in vitro* de linfócitos humanos ativados com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e tratados com o imunossupressor tacrolimus inibiu significativamente ($p < 0,05$, teste t de student pareado) a proliferação dos linfócitos de 2 indivíduos (V1 e V3) dos 6 indivíduos testados. O indivíduo V2 apresentou um valor de $p = 0,07$, muito próximo do significativo, mostrando uma tendencia a inibição da proliferação celular (Gráfico 2). Por outro lado, a proliferação das células dos outros 3 indivíduos (V4, V5 e V6) não sofreu uma inibição da proliferação quando tratadas com tacrolimus ($p=0,292$, $p=0,465$ e $p=0,42$, respectivamente), mostrando que estes indivíduos não responderam ao tratamento com esse fármaco *in vitro*. Isto indica que 50% dos indivíduos testados responderam ao tratamento, ou seja, seus linfócitos tiveram sua proliferação inibida pelo imunossupressor. Por outro lado, 50% dos indivíduos testados não responderam ao tratamento com o fármaco imunossupressor (Gráfico 2).

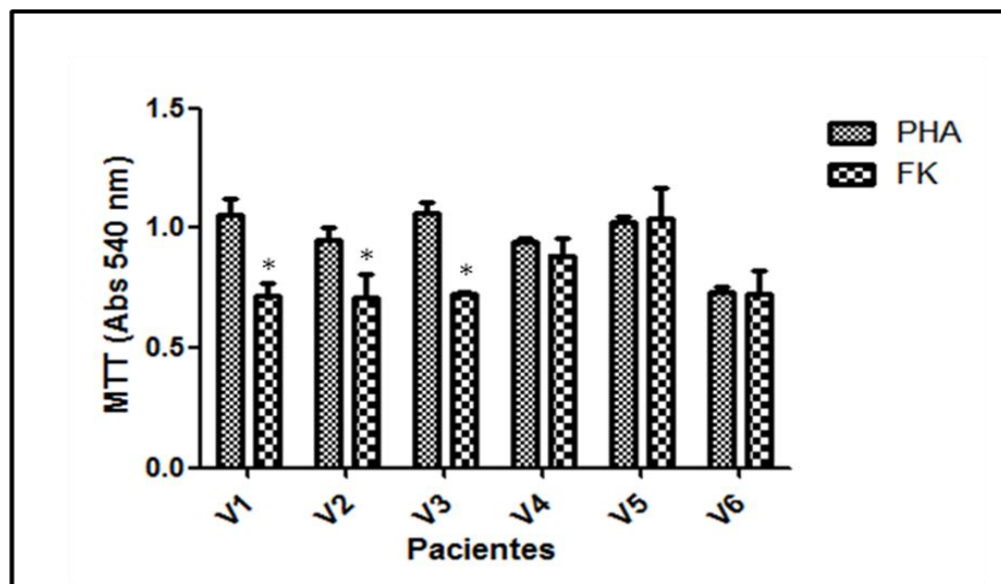


Gráfico 2 – Proliferação de células do sistema imune proveniente de voluntários (V1 a V6) após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) e tratamento com o imunossupressor tacrolimus (FK). Os resultados foram expressos em absorbância obtida a 540nm em espectrofotômetro após metabolização do MTT. * $p < 0,05$ (teste t student pareado).

Fonte: acervo pessoal

5.2.2 Quantificação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura

Os dados de absorvância (densidade óptica - D.O.) da medida em duplicata de IL-2 obtidos neste estudo estão apresentados no ANEXO II, onde se observa os dados dos seis pacientes (V1 – V6) dos grupos controle (C), estimulado com mitógeno (PHA) e tratado com FK506. Estão representados também os dados de D.O. da curva padrão em duplicata para cada concentração de IL-2 (7 pontos: 31,5; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 pg/mL).

Através da análise da regressão linear entre as variantes concentrações de IL-2 versus D.O. foi possível calcular a equação da reta e posteriormente calcular a concentração de IL-2 em pg/mL de cada grupo de células dos pacientes (ANEXO II e III).

No presente trabalho foi mostrado que o tratamento *in vitro* de linfócitos humanos ativados com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e tratados com o imunossupressor tacrolimus (FK) inibiu significativamente ($p < 0,05$, teste t de student pareado) a produção de IL-2 no sobrenadante de cultura de 3 pacientes com vitiligo (V1, V2 e V3). Por outro lado, os pacientes V4, V5 e V6 não tiveram a produção de IL-2 inibida por esse imunossupressor ($p = 0,33$, $p = 0,26$ e $p = 0,35$, respectivamente) (Gráfico 3) Os dados numéricos da quantificação da citocina IL-2 estão representados no anexo II.

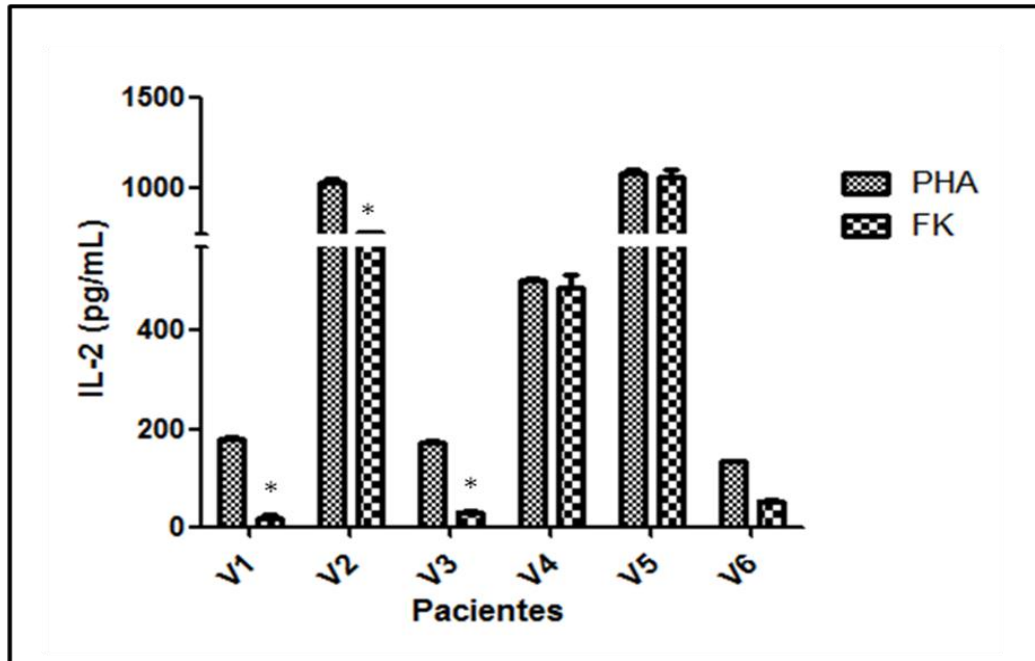


Gráfico 3 – Quantificação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC provenientes de paciente portadores de vitiligo (V1 a V6) após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) e tratamento com o imunossupressor tacrolimus (FK). Os resultados foram expressos em pg/mL. * $p < 0,05$ (teste t student pareado)

Fonte: acervo pessoal

Desta forma, através da análise dos efeitos farmacológicos de inibição da proliferação celular e modulação da expressão de IL-2, dois grupos de células foram caracterizadas: (1) pacientes não respondedores e (2) pacientes respondedores ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor. Neste trabalho obtivemos um total de 3 pacientes que se apresentaram com o fenótipo de não respondedores (NR) ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus e 3 pacientes com o fenótipo de respondedor (R) ao tratamento. Interessante foi que se observou que os pacientes respondedores ao tratamento apresentaram títulos de auto-anticorpos (anti-peroxidase e anti-tireoglobulina) elevados.

No vitiligo ocorre uma alteração da pigmentação pela destruição dos melanócitos. Sua etiopatogenia ainda não foi evidenciada (DANESHPAZHOOH *et al.*, 2006). Existem muitas teorias, que passam pela doença autoimune, bioquímica, neural, autotóxica de melanócitos e genética. A etiologia autoimune parece ser a mais plausível, sendo a destruição dos melanócitos secundária a autoanticorpos, os quais estão relacionados à extensão e à atividade da doença. Essa teoria se

fundamenta na observação da ocorrência concomitante de vitiligo e doenças autoimunes. A maior associação evidenciada é com doenças autoimunes da tireóide (ZETTINIG *et al.*, 2003). É notável a pesquisa da presença de doenças autoimunes, principalmente, da tireoide em pacientes com vitiligo, visto que os dados deste estudo, analogamente aos de outros autores, também exibiram alta frequência de doença autoimune da tireóide quando da presença de vitiligo. Esta acometeu 32,8% dos pacientes com vitiligo. (NUNES; ESSER, 2011).

O FK506, com base no sítio de ação imunorregulatório, classificado como inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T (GRAHAM, 1994), através da calcineurina, já descrito anteriormente na Figura 2. Verifica-se que pela inibição na produção da IL-2, não haverá resposta clonal ao linfócito T, com isso não ocorrendo a autoimunidade, podendo ocorrer a repigmentação, pois as células responsáveis pela produção de melanina não estariam sendo “atacadas”.

5.3 Avaliação clínica da resposta ao tratamento *in vivo* com tacrolimus

Os seis pacientes iniciaram o tratamento com tacrolimus pomada 0,1% duas vezes ao dia, em áreas definidas e específicas da pele, conforme descrito no Quadro 2. Estes pacientes foram acompanhados por um período de quatro meses e foi avaliada a repigmentação da lesão acrômica. Assim, estabeleceu-se que pacientes que apresentaram repigmentação inicial foram classificados clinicamente como respondedores ao tratamento com FK e aqueles onde não houve repigmentação observada nesse período foram classificados como não respondedores ao tratamento.

Tabela 2 - Dados da avaliação clínicas dos pacientes (V1-V6) *in vivo*.

Pacientes	Tempo tratamento	Local lesão tratado	Repigmentação	Classificação Clínica
V1	4 meses	dorso do pé	sim	R
V2	4 meses	Abdômen superior	sim	R
V3	4 meses	perioral	sim	R
V4	4 meses	face	sim	R
V5	4 meses	bolsa escrotal	não	NR
V6	4 meses	bolsa escrotal	não	NR

R respondedor NR não respondedor baseado no parâmetro repigmentação

Fonte: acervo pessoal

5.4 Correlação da resposta ao tratamento *in vitro* com resposta com clinica em *in vivo* em pacientes com vitiligo

Com o objetivo de se predizer a resposta ao tratamento com esse fármaco antes mesmo de se iniciar o tratamento *in vivo*, foi investigado se existe correlação entre a resposta do FK *in vitro* e *in vivo*. De acordo com os dados obtidos nos sub-ítem 5.2 e 5.3 construiu-se uma tabela para comparação da classificação dos pacientes em R e NR pelos parâmetros avaliados *in vitro* e *in vivo* (Quadro 3). Conforme o Quadro 3 existe uma correlação entre a resposta *in vitro* e *in vivo* de cinco pacientes (V1, V2, V3, V5 e V6). Para o paciente V4, houve discordância entre os dois resultados. A região da lesão avaliada nesse caso foi a face, região esta onde foi mostrado uma repigmentação mais significativa após o tratamento em relação a outras áreas acometidas pelo vitiligo (SILVERBERG JI, SILVERBERG NB, 2011).

Tabela 3 – Classificação dos pacientes portadores de vitiligo respondedores (R) e não respondedor (NR) ao tratamento *in vitro* e *in vivo* com FK.

Pacientes	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
V1	R	R
V2	R	R
V3	R	R
V4	NR	R
V5	NR	NR
V6	NR	NR

Fonte: acervo pessoal

Nos pacientes responsivos *in vitro* ao FK506 (V1, V2 e V3), houve uma produção diminuída das IL-2 e da proliferação dos linfócitos mostrando que o FK506 atuou no bloqueio da expressão da IL-2 como mostrado no Gráfico 3 e em trabalhos já relatados anteriormente (ABBAS AK, LICHTMAN AH, 2004). O tratamento *in vivo* desses mesmos pacientes demonstrou uma repigmentação parcial das lesões, mostrando que pacientes que apresentam alterações de fenótipo autoimune (presença de autoanticorpos) poderiam ser beneficiados com o uso clínico do tacrolimus, através da modulação desses parâmetros imunológicos (produção de IL-

2 e de autoanticorpos). Entretanto, recomenda-se manter o tratamento por um período maior, do que o realizado, para melhor análise.

As IL-2 que são produzidas pelas células T CD4+ e em menor quantidade pelos CD8+ atuam sobre as mesmas células T, que as produzem, isto é, funcionam como um fator de crescimento autócrino e ainda incrementam, como já descrevemos sobre os linfócitos B, a produção de anticorpos e neste caso os autoanticorpos, ocorrendo assim as doenças autoimunes, especificamente em tela, o vitiligo.

Sabe-se, também, que as imunofilinas ligadoras do FK506 (FKBPs) se associam a receptores de glicocorticóides ou de progesterona através da ação de proteínas de fase aguda da inflamação (heat shock proteins). A ligação do FK506, aos receptores de glicocorticóides, o protege contra a degradação ou inativação, promovendo a sua translocação para o núcleo e potencializando a sua ligação no DNA, inibindo a transcrição de diversas citocinas inflamatórias e mimetizando o efeito dos corticoides (THOMSON *et al.*, 1995). Essa pode ser a razão farmacodinâmica, pela qual os pacientes com doença autoimune, poderiam responder melhor ao tratamento com o imunossupressor em tela, mesmo quando usado em conjunto com os glicocorticóides e que na interrupção deste, em pacientes recebendo FK506, obteria-se sucesso no tratamento (CHAKRABARTI, P. *et al.*, 2000).

Por outro lado, nos pacientes não responsivos, *in vitro*, ao FK506, e que não apresentam fenótipo de doença autoimune (V4, V5 e V6) não responderam ao tratamento clínico. Exceção se fez ao paciente V4, que respondeu ao tratamento *in vivo*. Segundo afirma Thomas P. Habif, em seu livro Dermatologia Clínica, 2012: “a face e o pescoço respondem melhor a todas abordagens terapêuticas”, o que poderia explicar a repigmentação, no paciente V4, que apresenta lesão facial, sugerindo que pode-se ocorrer maior benefício ao tratamento pela localização da lesão. Pacientes não responsivos, *in vitro*, ao FK506 não responderiam ao tratamento clínico com o imunossupressor FK506 e poderiam estar enquadrados nos vitiligos de etiopatogenia neural, bioquímica, oxidativos, genéticos e outras que não autoimunes.

É importante ressaltar que foi utilizado um número pequeno de pacientes, mas os resultados preliminares gerados nessa pesquisa apontam para estudos futuros do uso de marcadores moleculares, de resposta específica ao tratamento com imunossupressores, com o objetivo de se prever resposta em larga escala, com maior número de pacientes, facilitando assim os procedimentos protocolares que indiretamente estariam beneficiando os pacientes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi demonstrado, através da análise dos efeitos farmacológicos de inibição da proliferação celular e da expressão de IL-2, que pacientes portadores de vitiligo foram classificados em dois grupos de indivíduos, os que responderam e os que não responderam adequadamente ao tratamento *in vitro* com tacrolimus.

Em relação aos dados clínicos conclui-se que o FK atua seletivamente em pacientes com auto-anticorpos, sugerindo que esse fármaco poderia ter indicação para pacientes com vitiligo de causa autoimune. Pacientes com vitiligo de causas neural, bioquímica e outras provavelmente não seriam beneficiados pelo uso do FK. Entretanto, estudos com maior número de pacientes e tempo de avaliação clínica ainda são necessários.

A avaliação clínica do tratamento permitiu correlacionar a resposta ao tratamento *in vitro* com a resposta *in vivo* nesses pacientes, podendo futuramente prever a eficácia da resposta terapêutica antes mesmo de se iniciar o tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. 2. ed .Philadelphia: Saunders, 2004. 320 p.
- ANTELO, D.P. Vitiligo: análise de marcadores linfocitário e do antígeno cutâneo linfocitário (CLA), Dissertação de Mestrado - UFRJ Faculdade Medicina, 2006
- BYSTRYN, J.C. Immune mechanisms in vitiligo. **Clin Dermatol**. v. 15, p. 853-861. 1997.
- CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat Rev Immunology**. v. 7, n. 4, p. 305-310. 2007.
- CAPRONI, M.; TORCHIA, D.; ANTIGA, E.; VOLPI, W.; FABBRI, P. Expression of adhesion molecules in atopic dermatitis is reduced by tacrolimus, but not by hydrocortisone butyrate: a randomized immunohistochemical study. **Clin Exp Dermatol**. v. 31, p. 813-817. 2006.
- CASTRO, Ana Paula Beltran Moschione. Inibidores de calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. **Jornal Pediatr, (Rio J)**. v. 82, n. 5, nov. 2006.
- CHAKRABARTI, P. et al. Outcome after steroid withdrawal in paediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. **Transplantation**. v. 70, n. 5, p. 760-764. 2000.
- COFFER, P.J.; BURGERING, B.M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat Rev Immunology**. v. 4, n. 11 p. 889-899. 2004.
- DANESHPAZHOOH, M.; MOSTOFIZADEH, G.M.; BEHJATI, J.; AKHYANI, M.; ROBATI, R.M. Antithyroid peroxidase antibody and vitiligo: a controlled study. **BMC Dermatol**. v. 10, p. 1-5. 2006.
- FITZPATRICK, D.R.; THOMAS, B. Compendio de Dermatologia, efeitos agudos e crônicos do sol, pag 1606, tab 138-5, cap. 138, v.1 , 5 ed, 2001.
- GILHAR, A.; ZELICKSON, B.; ULMAN, Y.; ETZIONI, A. *In vivo* destruction of melanocytes by the IgG fraction of serum from patients with vitiligo. **J Invest Dermatol**. v. 105, p.683-686. 1995.
- GONÇALVES, A.P. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**. v.13, n. 3, p.36. 2009.
- GRAHAM, R.M. **Cyclosporine: mechanism of action and toxicity**. **Cleve Clin J Med**. v. 61, n. 4, p. 308-313. 1994.
- GRIMES, P.E.; MINUS, H.R. *et al*. **Determination of optimal topical photochemotherapy for vitiligo**. **J Am Acad Dermatol**, 1982. v. 7, n.6, p.771-778.

HALDER, R.M.; CHAPPELL, J.L. Vitiligo update. **Semin Cutan Med Surg.** v. 28, p. 86-92. 2009.

HATAKYAMA, M. Interaction of IL-2. **Science.** v. 252, p. 1523-1528. 1989.

JANEWAY, C. **Immunobiology:** the immune system in health and disease. 6 ed. New York: Garland Science, 2005. p. 908.

KANG, H.Y.; CHOI, Y.M. FK506 increases pigmentation and migration of human melanocytes. **Br J Dermatol.** v.155, p. 1037-1040. 2006.

KEMP, E.H.; GAWKRODGER, D.J.; WATSON, P.F.; WEETMAN, A.P. Autoantibodies to human melanocyte-specific protein Pmel17 in the sera vitiligo patients: a sensitive and quantitative radioimmunoassay (RIA). **Clin Exp Immunol.** v. 114, p. 333-338. 1998.

KEMP, E.H.; WATERMAN, E.A.; WEETMAN, A.P. Autoimmune aspects of vitiligo. **Autoimmunity.** v. 34, p. 65-77. 2001.

KOGA, M. Vitiligo: A new classification and therapy. **Br J Dermatol.** v. 97, p. 255-261. 1997.

LABERGE, G.; MAILLOUX, C.M.; GOWAN, K.; HOLLAND, P.; BENNERTT, D.C.; FAIND, P.R. et al. Early disease onset and increased risk of other autoimmune disease in familial generalized vitiligo. **Pigment Cell Res.** v. 18, p. 300-305.2005.

LAN, C.C.; CHEN, G.S.; CHIOU, M.H.; WU, C.S.; CHANG, C.H.; YU, H.S. FK506 promotes melanocyte and melanoblast growth and creates a favourable milieu for cell migration via keratinocytes: possible mechanisms of how tacrolimus ointment induces repigmentation in patients with vitiligo. **Br J Dermatol.** v. 153, p. 498-505. 2005.

LERNER, A.B.; NORDLUND, J.J. Vitiligo. What is it? Is it important? **JAMA.** v.239, p. 1183-1187. 1978.

MORGAN, M.; CASTELLS, A.; RAMÍREZ, A. Anticuerpos en vitiligo. Significado clínico. **Med CUT ILA.** v. 14, p. 139-142. 1986.

NATH, S.K.; MANJUMDER, P.P.; NORDLUND, J.J. Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. **Am J Hum Genet.** v. 55, p. 981-990. 1994.

NAUGHTON, G.; REGGIARDO, D.; BYSTRYN, J. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. **J Am Acad Dermatology.** v. 15, p. 978-981. 1986.

NORDLUND, J.J.; MANJUMDER, P.P. Recent investigations on vitiligo vulgaris: advances in clinical research. **Dermatol Clin.** v. 15, p. 69-78. 1997.

NUNES, D.H.; ESSER, L.M.H. **Anais Brasileiro de Dermatologia.** v. 86, n. 2, 2011.

ORTONNE, J.P. **Vitiligo and other disorders of hypopigmentation.** In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology*, 2 ed. Mosby Elsevier: St Louis, 2008. p. 913-920.

ORTONNE, J.P.; BAHADORAN, P.; FITZPATRICK, T.B.; MOSHER, D.B.; HORI, Y. **Hypomelanoses and Hypermelanoses.** In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2003, p. 839-847.

READ, S.; GREENWALD, R.; IZCUE, A.; ROBINSON, N.; MANDELBROT, D.; FRANCISCO, L.; SHARPE, A.H.; POWRIE, F. Blockade of CTLA-4 and CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. **J Immunol.** v. 177, n. 7, p. 4376-83. 2006.

REEDY, M.V. *et al.* **Regulation of melanoblast migration and differentiation.** In: *The Pigmentary System Physiology And Pathophysiology*. New York: Oxford University Press, 1998. p. 75-95.

SANTAMARIA-BABÍ, L.F. CLA+ T cells in cutaneous diseases. **Eur J Dermatol.** v. 14, p.13-18. 2004.

SANTOS, R.L.I. **Revista brasileira de cirurgia plástica.** v. 21, n. 1. 2006.

SCHALLREUTER, K.U. *et al.* Vitiligo and other disease: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. **Dermatology.** v. 188, p.269-275. 1994.

SILVA, C.M.R.; PEREIRA, L.B.; GONTIJO, B.; RIBEIRO, G.B. Vitiligo na infância: características clínicas e epidemiológicas. **An. Bras. Dermatol.** v. 82, n. 1. 2007.

SILVERBERG, J.I.; SILVERBERG, N.B. Topical tacrolimus is more effective for treatment of vitiligo in patients of skin of color. **Journal of Drugs in Dermatology.** v. 10, n. 5, p. 507-510. 2011.

SIMON, D.; VASSINA, E.; YOUSELFI, S.; BRAATHEB, L.R.; SIMON, H.U. Inflammatory cell numbers and cytokine expression in atopic dermatitis after topical pimecrolimus treatment. **Allergy**, v.60, p.944-951. 2005.

STEINER, D. Vitiligo. **Revista Anais Brasileiro de Dermatologia.** v.79, n. 3. 2004. Não paginado. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0365-05962004000300010&script=sci_arttext>. Acesso em: 27 jun. 2013.

THOMSON, A.W.; BONHAM, C.A.; ZEEVI, A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. **Ther Drug Monit.** v.17, p. 584-591. 1995.

VUKMANOVIC-STEJIC, M.; MCQUAID, A.; BIRCH, K.E.; REED, J.R.; MACGREGOR, C.; RUSTIN, M.H. *et al.* Relative impact of CD4+CD25+ regulatory T

cells and tacrolimus on inhibition of T-cell proliferation in patients with atopic dermatitis. **Br J Dermatol.** v. 153, p. 750-757. 2005.

WAXMAN. J.; BALKWILL, F. (eds). Interleukin 2. **Black-well Sci Publ.** Oxford,1992.

WEI, L.H. IL4 and IL13. *Am.J.Physiol.* **Cell Physiol.** v. 294,n. 5. 2008.

ZETTINIG, G.; TANEW, A.; FISCHER, G.; MAYR, W.; DUDCZAK, R.; WEISSEL, M. Autoimmune diseases in vitiligo: do anti-nuclear antibodies decrease thyroid volume? **Clin Exp Immunol.** v.131, p.347-354. 2003.

ANEXO I

Dados de absorvância (densidade óptica DO) de proliferação celular com PHA, FK e controle.

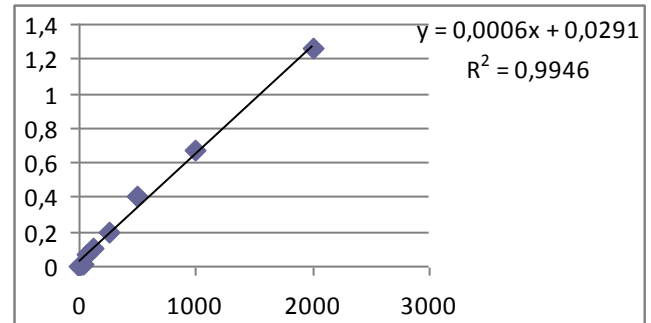
V1_C	0,819141	0,807961	0,865637
V1_PHA	0,937783	1,0958	1,13994
V1_FK	0,806638	0,626477	0,716558
V2_C	0,55603	0,370345	0,427872
V2_PHA	1,02661	0,971179	0,850229
V2_FK	0,508865	0,827799	0,78416
V3_C	0,694478	0,822219	0,719723
V3_PHA	1,03792	1,14634	1,00665
V3_FK	0,724921	0,731918	0,717923
V4_C	0,588383	0,489862	0,540767
V4_PHA	0,908185	0,979213	0,931996
V4_FK	0,864086	0,774938	1,01715
V5_C	0,44352	0,485426	0,516825
V5_PHA	1,05742	1,03886	0,977247
V5_FK	0,835255	1,28666	0,991177
V6_C	0,479703	0,455343	0,497435
V6_PHA	0,742192	0,690624	0,766889
V6_FK	0,880877	0,53533	0,756101

ANEXO II

Dados de absorvância (densidade óptica DO) de quantificação de IL-2 por Elisa.

	D.O.		MEDIA
0 pg/mL	0	0	0
31,5 pg/mL	0,019171	0,009689	0,01443
62,5 pg/mL	0,076638	0,060325	0,068482
125 pg/mL	0,105079	0,099062	0,102071
250 pg/mL	0,201899	0,199428	0,200664
500 pg/mL	0,42539	0,387571	0,406481
1000 pg/mL	0,659222	0,690204	0,674713
2000 pg/mL	1,237004	1,285794	1,261399

	D.O.		MEDIA
v1 controle	-0,02152	-0,01217	0,091056
v1 pha	0,139169	0,132205	0,251745
v1 fk	0,037127	0,044341	0,149703
v2 controle	-0,01979	0,000249	0,092788
v2 pha	0,665382	0,63783	0,777958
v2 fk	0,487989	0,479361	0,600565
v3 controle	-0,02981	-0,00678	0,082765
v3 pha	0,130224	0,133484	0,2428
v3 fk	0,02156	0,047291	0,134136
v4 controle	-0,01283	0,011599	0,099746
v4 pha	0,327422	0,332198	0,439998
v4 fk	0,305401	0,338528	0,417977
v5 controle	-0,00497	0,006873	0,107604
v5 pha	0,672983	0,693227	0,785559
v5 fk	0,638692	0,694624	0,751268
v6 controle	-0,01336	-0,00192	0,099213
v6 pha	0,109164	0,108448	0,22174
v6 fk	0,061824	0,060046	0,1744



ANEXO III

Cálculo da concentração (pg/mL) de IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC.

	pg ml	
v1 controle	-84,367	-68,7867
v1 pha	183,4483	171,8417
v1 fk	13,37833	25,40167
v2 controle	-81,4803	-48,085
v2 pha	1060,47	1014,55
v2 fk	764,815	750,435
v3 controle	-98,1857	-59,8017
v3 pha	168,54	173,9733
v3 fk	-12,5667	30,31833
v4 controle	-69,8832	-29,1683
v4 pha	497,2033	505,1633
v4 fk	460,5017	515,7133
v5 controle	-56,7867	-37,045
v5 pha	1073,138	1106,878
v5 fk	1015,987	1109,207
v6 controle	-70,7723	-51,7033
v6 pha	133,44	132,2467
v6 fk	54,54	51,57667

ANEXO IV

Fotografias representativas dos pacientes portadores de vitiligo utilizados nesse trabalho.

