MONIQUE KOWALSKI SCHMITZ

**Participação do hormônio liberador de corticotropina
(CRH) e dos hormônios da pró-opiomelanocortina
(POMC) no lúpus eritematoso sistêmico com
envolvimento cutâneo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana Beatriz
Veríssimo de Mello

**SÃO PAULO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Schmitz, Monique Kowalski

Participação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e dos hormônios da
pró-opiomelanocortina (POMC) no lúpus eritematoso com envolvimento cutâneo /
Monique Kowalski Schmitz. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientadora: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello.

Descritores: 1.Alfa-MSH 2.Hormônio liberador da corticotropina 3.Hormônio
adrenocorticotrópico 4.Citocinas 5.Lúpus eritematoso sistêmico 6.Pele

USP/FM/DBD-286/14

Aos meus pais, Russel e Bete, pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs, Mirelle e Simone, pela amizade e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Suzana Beatriz Veríssimo de Melo, uma brilhante profissional, que passei a admirar desde o primeiro dia que a conheci, atenciosa, exigente, sempre presente, e acima de tudo, uma grande amiga.

Ao meu grande colega e amigo Domingos Alexandre C. Botte, agora doutor, que caminhou comigo nesta jornada, sempre disposto a ajudar de uma forma alegre e descontraída e com quem muito aprendi ao longo de todos esses anos.

À Prof^a. Dr^a. Eloísa Bonfá, pela ajuda e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba, pelos ensinamentos, ajuda na avaliação dos pacientes e na confecção do trabalho.

À Prof^a. Mirian Nacagami Sotto, pelo auxílio na elaboração do artigo e na parte experimental do estudo.

À Maria Aurora Gomes e Maria de Fátima Almeida, pelo carinho e ajuda na realização dos experimentos, sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso.

À Prof^a. Valéria Aoki e aos funcionários do laboratório de dermatologia, pela ajuda na preparação das lâminas e análise das imunofluorescências.

Ao Dr. Mateus Saito, que nos ajudou na busca do grupo controle.

À colega Patrícia Martin, pelos ensinamentos para a realização das biópsias de pele.

À Fernanda Guedes Luiz, pela ajuda na confecção das lâminas.

Ao Prof. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo auxílio com o sistema computacional de quantificação de imagens.

Aos Professores doutores Rosa Maria, Clóvis Artur Almeida da Silva e Gilberto Santos Novaes, pelo auxílio na elaboração do artigo para publicação.

Às enfermeiras Sandra e Neide, que auxiliaram na coleta do material a ser analisado.

Aos preceptores e professores da Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Muitas pessoas desprenderam tempo e esforço, sem os quais esse projeto não teria tido êxito: Ângela Maria de Souza, Angélica de Belém, Cristina Maria Nazareth, Cláudia Reis Oliveira, Cleonice Bueno, Elaine Pires Leon, Elenice Mantovani, Elislaine Fiori G. Dos Reis, Iná Sílvia Santos Santiago, Juraci Pereira, Margarete Vendramini, Marta Janete Pereira, Solange Carrasco, Valéria de Falco Caparbo, Vilma dos Santos T. Viana, Walcy Rosolia Teodoro, Walkíria Aparecida Schneider. A todos o meu muito obrigada.

Aos grandes amigos reumatologistas Diogo Souza Domiciano, Gabriela Mendonça, Luciana Parente Costa, Danielle Martins, Levi Higino Jales Neto, Patrícia Macedo de Andrade, Carolina Garcia Sasdelli, Juliane Aline Paupitz, Rafael Tomita, Zilcem Costa Arruda Jr.

À minha família pelo estímulo durante toda essa trajetória e por todas as alegrias que me proporcionaram.

Ao Ronaldo Pavanelli Galvão, pelo incentivo e carinho que recebi ao longo desses anos e que foram fundamentais para a concretização desse sonho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho, pela confiança e disponibilidade na participação deste estudo.

À FAPESP por apoiar o financiamento deste projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Neuroimunoendocrinologia.....	11
1.2	Melanocortinas e o Eixo Neuroimonoendócrino	11
1.3	A Pele Como Um Órgão Neuroendócrino	12
1.4	O papel do CRH, α -MSH e MC-R	13
1.5	Papel Fisiológico do Sistema Imune da Pele	18
1.6	Esteroidogênese na Pele	18
1.7	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal na Pele e Sistema de Resposta ao Estresse Cutâneo	19
1.8	Participação do CRH e das Melanocortinas nas Doenças Humanas Inflamatórias e Autoimunes	21
2	OBJETIVO	24
3	MÉTODOS	26
3.1	Casuística.....	27
3.2	Protocolo de Estudo	28
3.3	Parâmetros Laboratoriais	29
3.3.1	Detecção de autoanticorpos.....	29
3.3.2	Citocinas séricas	29
3.3.3	Cortisol, ACTH e α -MSH	30
3.4	Avaliação da Pele	31
3.4.1	Imunofluorescência direta: IgG, IgA, IgM e C3.....	31
3.4.2	Marcações imunohistoquímicas das biópsias de pele	31
3.4.3	Leitura das lâminas	33
3.5	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Caracterização das Lesões de Pele por Imunofluorescência Direta (IFD).....	38
4.2	Análise Imunohistoquímica da Expressão de ACTH, CRH, α - MSH e MC-1R na Pele	40
4.3	Citocinas Séricas.....	41
4.4	Níveis de Cortisol, ACTH e α -MSH.....	43
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	50

7	ANEXOS	52
8	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICE.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	- <i>American College of Rheumatology</i>
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
AR	- Artrite reumatoide
CRH	- Hormônio liberador de corticotropina
CRH-R	- Receptor do hormônio liberador de corticotropina
DCs	- Células dendríticas
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FR	- Fator reumatoide
HPA	- Hipotálamo- hipófise- adrenal
IFD	- Imunofluorescência Direta
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
IMC	- Índice de massa corporal
LEC	- Lúpus eritematoso cutâneo
LECS	- Lúpus eritematoso cutâneo subgudo
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
MC	- Melanocortina
MC-R	- Receptor de melanocortina
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
NF κ B	- Fator nuclear kappa beta
NK	- Células <i>natural killer</i>
p	- Nível de significância
POMC	- Pró-opiomelanocortina
SLEDAI	- <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SNC	- Sistema Nervoso Central
TCR	- Receptor de célula T
Th	- <i>T helper</i>
TNF	- Fator de necrose tumoral
UV	- Ultravioleta
α -MSH	- Hormônio estimulador de melanócito α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico. Paineis a, fatores genéticos, ambientais, hormonais, epigenética, e fatores imunorregulatórios que podem atuar sequencialmente ou simultaneamente sobre o sistema imunológico. Paineis b, fatores patogênicos, produção de autoanticorpos, complexos imunes, células e citocinas inflamatórias que podem iniciar e amplificar a inflamação e lesão	2
Figura 2 -	Interação celular da célula B e T.....	4
Figura 3 -	Efeitos do sistema neuroendócrino na pele	13
Figura 4 -	Efeito do estresse sobre a pele com aumento da produção de cortisol relacionado à reação inflamatória mediada por IL-1 β	21
Figura 5 -	Paciente portadora de lúpus eritematoso sistêmico com atividade cutânea em região de face (a) e membro superior (b).....	38
Figura 6 -	Imunofluorescência direta (IgM, IgG, IgA e C3) da pele de pacientes com LES (n = 17) e controles (n = 17). Paineis 6a, dados da frequência de positividade no LES com acometimento cutâneo; 6b, fluorescência direta negativa para IgM na biópsia de pele de um controle saudável e 6c, fluorescência direta positiva para IgM na biópsia da pele afetada de uma paciente com LES com acometimento cutâneo.....	39
Figura 7 -	Depósitos de IgM (a) e IgG (b) na zona de membrana basal num fragmento de pele (área afetada) de uma paciente com lúpus eritematoso com acometimento cutâneo	39
Figura 8 -	Avaliação Imunohistoquímica da expressão do CRH na epiderme (a) e derme profunda (b) de uma paciente com LES com acometimento cutâneo. Na figura, as setas indicam algumas das áreas coradas pelo marcador.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios do <i>American College of Rheumatology</i> (ACR) para diagnóstico e classificação do LES.....	3
Quadro 2 - Receptores para melanocortinas e seus efeitos biológicos	16
Quadro 3 - Medicações utilizadas pelos pacientes portadores de LES em atividade cutânea no início do estudo	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Expressão do CRH na epiderme e derme profunda na pele dos pacientes com LES com acometimento cutâneo e controles. Os resultados estão expressos como mediana, $*p < 0,05$41
- Gráfico 2 - Representação gráfica dos valores de interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-17 (IL-17).....42
- Gráfico 3 - Correlação entre os níveis séricos de IL-17 e IFN- γ em 17 pacientes com LES com envolvimento cutâneo. $*p < 0,05$ pelo teste de correlação de *Spearman*43

RESUMO

Schmitz MK. *Participação do CRH e hormônios da pró-opiomelanocortina (POMC) no lúpus eritematoso sistêmico com envolvimento cutâneo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A ativação do eixo hormônio liberador de corticotropina (CRH) e da pró-opiomelanocortina (POMC) leva a produção de vários derivados bioativos que incluem o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o hormônio estimulador de melanócito α (α -MSH). Estudos avaliando a participação desse eixo no lúpus eritematoso sistêmico (LES) são escassos, particularmente no envolvimento cutâneo da doença. **Objetivo:** Avaliar a participação do CRH e das melanocortinas (MCs) na fisiopatologia do lúpus eritematoso sistêmico com envolvimento cutâneo. **Métodos:** Dezesete pacientes com LES com envolvimento cutâneo foram avaliados clinicamente e biópsias da pele afetada e não afetada e do sangue periférico foram obtidas. Dezesete indivíduos saudáveis foram pareados por idade e gênero. Os fragmentos de pele foram submetidos à análise imuno-histoquímica para avaliação da expressão de CRH, ACTH, α -MSH, e receptor de melanocortina tipo 1 (MC-1R). Os níveis séricos de α -MSH, IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , e IFN- γ foram determinados pelo método Multiplex. **Resultados:** A pele afetada de pacientes com LES apresentaram maior expressão CRH na derme profunda quando comparada à pele não afetada dos mesmos doentes e a pele saudável dos controles ($p = 0,024$). Níveis séricos de α -MSH foram similares entre LES e controles. Dentre as citocinas avaliadas, IFN- γ , TNF- α e IL-6 foram mais elevadas nos pacientes com LES em relação aos controles ($p = 0,041$, $p = 0,001$ e $p = 0,049$, respectivamente). Embora não significativamente, os níveis de IL-17 também foram mais altos nos pacientes ($p = 0,099$). A expressão tecidual de ACTH, cortisol, α -MSH e seu receptor MC-1R foram semelhantes entre os pacientes e controles. **Conclusões:** Nossos resultados mostram, pela primeira vez a participação do eixo CRH-POMC na patogênese das lesões cutâneas do LES.

Descritores: Alfa-MSH. Hormônio liberador de corticotropina. Hormônio adrenocorticotrófico. Citocinas. Lúpus eritematoso sistêmico. Pele.

SUMMARY

Schmitz MK. *CRH and pro-opiomelanocortin (POMC) participation in systemic lupus erythematosus with skin involvement* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Corticotropin-releasing hormone (CRH) and pro-opiomelanocortin (POMC) axis activation leads to the production of several bioactive hormones including adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and the neuropeptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). There are scarce data regarding their role in systemic lupus erythematosus (SLE) particularly in cutaneous involvement of this disease. **Objective:** To evaluate the role of CRH and melanocortins (MCs) in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus with skin involvement. **Methods:** Seventeen patients with SLE with skin involvement were evaluated clinically and biopsies of affected and unaffected skin and peripheral blood were obtained. Seventeen healthy subjects were matched for age and gender. The skin fragments were subjected to immunohistochemical analysis for the expression of CRH, ACTH, α -MSH and melanocortin receptor type 1 (MC-1R). Serum levels of α -MSH, IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α and IFN- γ were determined by multiplex. **Results:** The affected skin of SLE patients exhibited greater CRH expression in the deep dermis compared to unaffected skin of the same patients and the control's healthy skin ($p = 0.024$). α -MSH were similar between SLE and controls. Among the evaluated cytokines, IFN- γ , TNF- α and IL-6 were significantly higher in SLE patients compared to controls ($p = 0.041$, $p = 0.001$ and $p = 0.049$, respectively). Although not significant, levels of IL-17 were also higher in patients ($p = 0.099$). Tissue expression of ACTH, cortisol, α -MSH and its receptor MC-1R were similar between patients and controls. **Conclusions:** Our results show for the first time the involvement of CRH-POMC axis in the pathogenesis of SLE cutaneous lesions through interactions between the brain-skin axis.

Descriptors: Alpha-MSH. Corticotropin-releasing hormone. Adrenocorticotrophic hormone. Cytokines. Systemic lupus erythematosus. Skin.

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que apresentam manifestações sistêmicas inflamatórias salienta-se o lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença autoimune que pode envolver diversos órgãos (pele, articulações, coração, pulmões, sangue, rins e cérebro) e cujo início pode se dar de maneira aguda ou insidiosa, com posteriores manifestações clínicas polimórficas^{1,2}.

Sua etiologia é multifatorial e fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais, como luz ultravioleta e medicamentos, podem contribuir para a exacerbação dos sintomas³ (Figura1).

Figura 1 - Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico. Painel a, fatores genéticos, ambientais, hormonais, epigenética, e fatores imunorregulatórios que podem atuar sequencialmente ou simultaneamente sobre o sistema imunológico. Painel b, fatores patogênicos, produção de autoanticorpos, complexos imunes, células e citocinas inflamatórias que podem iniciar e amplificar a inflamação e lesão [Adaptado de Tsokos³]

A doença é predominantemente presente em mulheres, especialmente na segunda década de vida, mas também pode ocorrer em crianças e em pessoas mais velhas².

Dentre as manifestações prevalentes durante todo o curso da doença lúpica, as cutâneas estão presentes em 85% dos pacientes enquanto as anormalidades musculoesqueléticas em aproximadamente 95%².

O diagnóstico do LES baseia-se numa combinação de características clínicas e alterações laboratoriais (Quadro 1). Para o diagnóstico, pelo menos quatro dos 11 fatores apresentados devem estar presentes no momento do atendimento médico ou relatados durante a anamnese do paciente⁴.

Quadro 1 - Critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) para diagnóstico e classificação do LES

1. Eritema malar	
2. Erupção discoide	
3. Fotossensibilidade	
4. Úlceras orais	
5. Artrite	
6. Serosite	a) Pleurite b) Pericardite
7. Alterações renais	a) Proteinúria acima de 0,5 g/24 h b) Cilindros celulares:
8. Alterações neurológicas	a) Convulsões b) Psicoses
9. Alterações hematológicas	a) Anemia hemolítica b) Leucopenia c) Linfopenia d) Trombocitopenia
10. Alterações imunológicas	a) Anticorpo anti-DNA b) Anticorpo anti-Sm c) Anticorpo anti-fosfolípide
11. Anticorpo	FAN em valores elevados

A condição lúpica tem em comum uma resposta imune direcionada contra antígenos próprios, que parecem ocorrer por meio de vias de transdução de sinal mediadas por receptores de células T (TCR). A célula apresentadora liga o antígeno a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Este complexo interage com o TCR. Duas interações alternativas podem ocorrer: B7 com CD28, que é estimulante, e B7 com CTLA-4, inibitória. Se o sinal positivo dominar, a célula T é ativada, levando a liberação de citocinas e inflamação⁵.

Embora a fisiopatologia do LES não esteja completamente elucidada, acredita-se que as células B atuem como células apresentadoras de antígeno, por meio de uma coestimulação via interação entre CD40 e CD40 ligante. Esta interação estimula as células T a produzirem uma série de citocinas que agem nas células B promovendo a formação de anticorpos⁵ (Figura 2).

Figura 2 - Interação celular da célula B e T [Adaptado de Rahman⁵]

Várias citocinas têm sido relacionadas com a patogênese do LES⁶. Elas apresentam um papel importante na diferenciação, maturação e ativação de várias células imunes e estão envolvidas direta e indiretamente na inflamação tecidual⁶. Citocinas inflamatórias, como o interferon (IFN) tipo I e II e interleucina (IL)-6, IL-1 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), assim como as citocinas imunomodulatórias, são importantes na sua fisiopatologia. Além destas, IL-21 e IL-17 foram recentemente identificadas como muito relevantes no mecanismo de autoimunidade⁷.

O TNF- α é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias com funções pleiotrópicas. Ele regula a diferenciação celular, proliferação e morte, agindo também na inflamação, resposta inata e adaptativa e desenvolvimento tecidual. Vários tipos de células incluindo os queratinócitos produzem TNF- α . O TNF- α está ainda implicado na patogênese de doenças autoimunes graves como artrite reumatoide inflamatória, doença inflamatória intestinal e esclerose múltipla⁶.

O IFN- γ exerce um importante papel na imunidade celular, sendo também envolvido na ativação macrofágica, inflamação, defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, resposta *T helper* (Th) 1 e vigilância. Esta citocina exerce uma função regulatória para limitar o dano tecidual associado com inflamação e modular a diferenciação de células *T helper* e células T regulatórias⁶. O IFN- γ pode promover aumento ou supressão da autoimunidade. Esta citocina é produzida pelas células NK durante o início da resposta imune, e por células Th1 ativadas durante a resposta imune adaptativa⁶. Na literatura, alguns estudos demonstram

relação entre IFN- γ e atividade de doença e uma correlação entre a expressão de IFN- γ e gravidade de nefrite lúpica. O IFN- γ pode ter um efeito patogênico na nefrite lúpica decorrente do aumento da atividade das células B e da secreção de autoanticorpos que leva a um dano tecidual mediado por imunocomplexo^{6,7}. Adicionalmente, o IFN- γ pode levar a inflamação local pela ativação de monócitos e macrófagos. Outros estudos, de forma contraditória, mostraram níveis de IFN- γ diminuídos na nefrite lúpica⁷. Pouco se sabe sobre o comportamento do IFN- γ nos pacientes com LES em atividade cutânea. Aumento dos níveis de expressão de RNAm de IFN- γ foram detectadas em lesões de pele *lúpus-like* ou induzidas experimentalmente em camundongos⁸.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que exerce efeitos pleiotrópicos em numerosos tipos de células⁹. Ela estimula a produção de proteínas de fase aguda durante a inflamação e afeta respostas imunes variadas por meio da indução, diferenciação e maturação de células B, secreção de imunoglobulina (Ig) e diferenciação de células T citotóxicas¹⁰. Em pacientes com LES, níveis elevados de IL-6 foram observados e correlacionados com atividade de doença¹¹. Células B e monócitos de pacientes lúpicos produzem grande quantidade de IL-6¹². A habilidade da IL-6 em estimular a diferenciação de células B pode contribuir para a patologia do LES. A irradiação de luz ultravioleta aumenta a expressão de RNAm nos níveis de IL-6 na pele, assim como IL-1 e TNF- α ⁶. A IL-6 é produzida em muitos tipos de células, como monócitos, fibroblastos, células endoteliais¹³. Pacientes com LES em atividade têm um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 que,

em alguns estudos correlacionam-se com atividade de doença ou níveis de anti-DNA^{11,14}. Níveis elevados de IL-6 estão associados com hiperatividade de células B e produção de autoanticorpos¹⁴. Adicionalmente aos efeitos sistêmicos, a IL-6 tem um papel na inflamação local, como por exemplo, na nefrite lúpica, onde acredita-se estar envolvida na proliferação de células mesangiais, um dos marcadores da nefrite lúpica proliferativa¹⁰. Pacientes com nefrite lúpica ativa mostraram secreção urinária elevada de IL-6¹⁵, além disso, a expressão de IL-6 é aumentada ao longo dos tecidos tubulares e glomerulares nos rins de pacientes com nefrite lúpica *in situ*¹⁶. A IL-6 encontra-se aumentada durante as complicações cardiopulmonares do LES¹⁷. Pacientes com síndromes neuropsiquiátricas mostraram elevações dos níveis de IL-6 no fluido cérebro espinhal¹⁸. Investigações recentes também indicam o envolvimento da IL-6 do dano articular em pacientes com LES^{7,19}.

A IL-17 é produzida por alguns tipos de células T incluindo células *T helper* (células T CD4+), células T citotóxicas (Células T CD8+), células T CD4-CD8-CD3+, células T gama-delta, células *natural killer* (NK) e neutrófilos^{7,20,21}. Um novo subtipo de células T CD4+, que preferencialmente produz IL-17, mas não IL-4 ou IFN- γ é denominado células Th17. Além da IL-17a e IL-17f estas células produzem IL-22 e IL-21. Fatores importantes de diferenciação das células Th17 incluem IL-6, IL-21 e IL-1 β , juntos com TGF- β ²². Além disso, as células Th17 estão envolvidas na resposta imune contra bactérias, como *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Borrelia burgdoerferi* e contra fungos como *Candida albicans*^{7,23}. Além dessas funções de proteção,

a IL-17 contribui para a inflamação tecidual e dano ao órgão em doenças autoimunes por desencadeamento de inflamação crônica^{7,20}. Os receptores de IL-17 são difusamente expressos não apenas em células imunes, mas também em células epiteliais e endoteliais. A IL-17 também induz a secreção de muitas proteínas pró-inflamatórias, entre elas, a prostaglandina E₂, o GM-CSF, bem como outras citocinas que induzem a um *feedback* positivo, levando a produção de mais IL-17, assim como IL-6, IL-1 β e IL-21²⁴. Recentes estudos mostraram evidências que IL-17 sozinha ou com um sinergismo para o BAFF também promovem diferenciação de células β e produção de autoanticorpos^{25,26}. Pacientes com LES apresentam níveis aumentados de IL-17⁷. Porcentagens aumentadas de células produtoras de IL-17 e níveis plasmáticos elevados de IL-17 correlacionam-se com atividade de doença^{7,27}. Assim, além das ações pró-inflamatórias, a IL-17 tem um importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares, e também promove doença inflamatória nas doenças autoimunes. As células Th17, um novo subtipo de células Th, foram recentemente identificadas como o principal sítio da IL-17. O envolvimento de Th17 e IL-17 no LES tem sido especulado em modelos murinos e em humanos. Uma população substancial de células T infiltrativas nas lesões cutâneas de pacientes com LES foram positivas para IL-17⁶.

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória produzida por diversas células imunes incluindo células B e células T CD4⁺regulatórias. A função supressora da IL-10 envolve a inativação de macrófagos e células dendríticas e efeitos supressores diretos nas células Th1. Ela ainda promove

a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B. Em muitos estudos, pacientes com LES exibiram um aumento dos níveis séricos de IL-10 e houve uma correlação positiva entre IL-10 sérica e atividade de doença^{28,29}.

A presença de autoanticorpos é uma importante característica do LES e frequentemente um fator que auxilia em seu diagnóstico. Autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos ocorrem com surpreendente variedade no LES, sendo que quase 100% dos pacientes em atividade apresentam fatores antinucleares e citoplasmáticos (FAN). No LES ocorre uma produção anormal de um amplo grupo heterogêneo de autoanticorpos³⁰. Entre eles podemos destacar o anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La e anti-P³⁰. O anti-DNA de dupla hélice está presente em aproximadamente 70% de pacientes com LES e é altamente específico para a doença. Ele se correlaciona com atividade da doença e pode desaparecer quando a doença entra em remissão. Os anticorpos anti-Sm são também altamente específicos para o LES, mas encontram-se presentes em apenas 25% dos pacientes. Ao contrário dos anticorpos anti-DNA, os anticorpos anti-Sm estão presentes por todo o curso da doença. Outros anticorpos, tais como anti-La e anti-Ro são encontradas em pacientes com LES e Síndrome de Sjögren². O anti-SSA/Ro geralmente associado a fotossensibilidade é encontrado com relativa frequência nos pacientes com lúpus cutâneo subagudo (LECS)³¹. O antígeno SSA/Ro52 é superexpresso em lesões espontâneas de lúpus eritematoso cutâneo (LEC) ou induzidas experimentalmente por raios UV. Acredita-se que os anticorpos

circulantes anti-SSA/Ro e anti-SSB/La ligam-se a esses antígenos e possam causar exacerbação do LECS e LES após exposição a luz solar³¹⁻³³. Recentes estudos sugerem que o anti-SSA/Ro52 tenha um papel regulatório na inflamação³³. O antígeno SSA/Ro é um importante regulador negativo da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IFN- γ , IFN- β e IL-12³⁴.

Anormalidades hematológicas podem estar presentes numa grande parcela dos pacientes com LES com doença ativa. É comum observarmos presença de anemia normocítica normocrômica. Leucopenia leve a moderada está presente em cerca de 17% dos pacientes. A linfopenia também costuma estar presente durante a atividade da doença. Trombocitopenia leve pode ser encontrada em aproximadamente um terço dos pacientes, mas uma contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³ costuma ser vista em apenas 5% dos casos. A taxa de sedimentação de eritrócitos é elevada em quase todos os pacientes com LES e normalmente cai para níveis normais quando a doença torna-se inativa. Níveis de proteína C-reativa podem estar elevados durante a doença em atividade e em pacientes infectados².

Dentre os marcadores séricos, C3 e C4 estão frequentemente baixos durante os períodos de atividade e doença e tendem a retornar aos seus níveis normais durante a remissão da doença².

1.1 Neuroimunoendocrinologia

Neuroimunoendocrinologia é o estudo das interações moleculares, celulares e fisiológicas entre os sistemas nervoso, imune e endócrino³⁵. Essa área do conhecimento foi bastante reconhecida após o Nobel de 1949, quando Hench *et al.*³⁶ demonstraram os efeitos anti-inflamatórios da cortisona e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na artrite reumatoide (AR). Atualmente sabe-se que um grande número de neuropeptídeos e seus receptores são compartilhados entre esses três sistemas, sugerindo a participação do sistema nervoso central (SNC), como imunomodulador de diferentes condições patológicas^{37,38}.

1.2 Melanocortinas e o Eixo Neuroimonoendócrino

O sistema de melanocortinas representa uma das maiores classes de neuropeptídeos característicos da pele humana. As melanocortinas (MCs) estão envolvidas na regulação de alguns processos incluindo a resposta inflamatória.

As melanocortinas são derivadas da pró-opiomelancortina (POMC)³⁹. A ativação do eixo hormônio liberador de corticotropina (CRH)-POMC inicia com a produção hipotalâmica do neuropeptídeo que, na hipófise anterior, ativa o receptor tipo I do CRH, levando a produção de derivados da POMC como ACTH, hormônio estimulador de melanócito α (α -MSH) e β -endorfinas⁴⁰.

Apesar do sítio principal da produção dos peptídeos ser na hipófise, o α -MSH e o ACTH são também produzidos, em condições específicas como o estresse⁴¹, em outros sítios que incluem a pele. Queratinócitos e melanócitos são os maiores produtores desses peptídeos⁴² cujos efeitos são

mediados através da ligação com um dos cinco receptores das melanocortinas (MC-1R-MC-5R)⁴³. É importante salientar que a síntese na epiderme tem sua exposição regulada pelos raios ultravioleta (UV)^{43,44}.

1.3 A Pele Como Um Órgão Neuroendócrino

Por mais de uma década evidências foram se acumulando, de que a resposta endócrina ao estresse não era necessariamente decorrente do controle do SNC, mas também poderia ocorrer nos tecidos periféricos fora do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) clássico³⁹. Dessa forma, a pele humana seria um sítio interessante para o estudo das melanocortinas⁴⁵. Sabe-se que a pele é continuamente exposta a muitos fatores hostis sejam eles comportamentais, químicos e biológicos⁴⁶. Em parte, como um mecanismo de defesa, as células da pele produzem hormônios neurotransmissores, neuropeptídeos e expressam receptores funcionais^{41,47}. Slominski, um estudioso do assunto, propôs que o próprio estresse da pele poderia ativar o eixo HPA clássico⁴⁸⁻⁵⁰. Os raios UV atingiriam a pele e ativariam receptores sensoriais estimulando a produção de mensageiros humorais. Esses sinais seriam liberados por rotas ascendentes para o cérebro. Alternativamente, os fatores cutâneos poderiam atravessar esse eixo e entrar na glândula adrenal diretamente através da circulação⁵⁰.

Assim, em resposta a estímulos nocivos, o sistema neuroendócrino da pele responde de forma progressiva. No caso de estímulos de grande magnitude, os sinais gerados viajam através de vias humorais ou neurais para atingir o sistema nervoso central, sistema imune e outros órgãos (Figura 3).

Figura 3 - Efeitos do sistema neuroendócrino na pele [Adaptado de Slominski⁵⁰]

Dessa forma, a pele poderia expressar um eixo similar ao hipotálamo-hipófise-adrenal clássico, que funcionaria como um sistema de defesa cutâneo, operando na coordenação e execução das respostas ao estresse local, além de sua função normal de preservação da homeostase corporal⁵¹.

1.4 O papel do CRH, α -MSH e MC-R

Além do hipotálamo, o CRH pode ser encontrado na glândula adrenal, gônadas, placenta, trato gastrointestinal e pele^{41,52}. O hormônio liberador de corticotropina tecidual parece ser capaz de controlar várias funções da pele, agindo como uma molécula pró-inflamatória ativando o fator nuclear kappa beta (NF κ β)⁵³. De fato, o CRH afeta a produção de citocinas em queratinócitos

humanos estimulando a secreção de interleucina-6 (IL-6) e IL-11⁵⁴.

O hormônio liberador de corticotropina é o maior regulador do eixo HPA em resposta ao estresse, com importante atividade pró-inflamatória sobre a pele⁵⁵. Ele estimula o CRHR que induz a secreção de peptídeos como ACTH, melanotrofinas, lipotrofinas e endorfinas⁵¹. A pele normal humana expressa o gene da POMC e contém a transcrição de ambos CRH e CRHRs. De fato, um equivalente do eixo central HPA é ativado na pele em resposta ao estresse. Considerando o papel do CRH na etiologia das doenças inflamatórias da pele, este hormônio se mostrou altamente expresso na acne vulgar⁵³ e na pele de pacientes com psoríase autoimune⁵⁶. A expressão do CRH na pele de pacientes com psoríase está aumentada na epiderme e anexos da pele⁵⁶. Adicionalmente, em outro estudo com psoríase, o CRH se mostrou expresso não apenas na epiderme, mas também na vasculatura dérmica⁵⁷, enquanto a expressão de ACTH e α -MSH não se alterou.

Contrabalançado o efeito do CRH, os estudos com α -MSH apontam o neuropeptídeo como uma potente proteína anti-inflamatória com relevante papel na resposta inata⁵⁸. Nos queratinócitos, a ligação do α -MSH ao receptor de melanocortina (MC-R) leva a inibição da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 β , IL-1 α , IL-6, assim como IL-8, IFN- γ e TNF- α ⁵⁹⁻⁶¹. Além disso, o α -MSH aumenta a expressão de IL-10 nos queratinócitos humanos, células B e T, macrófagos, monócitos e células mastocitárias^{62,63}. Adicionalmente, o α -MSH media também a indução das células T CD25+CD4+ (células Treg)⁶⁴ que são importantes na modulação

da autoimunidade e nas doenças de pele imunomoduladas. O neuropeptídeo α -MSH é também um mediador bem conhecido de pigmentação da pele. O α -MSH pode ser detectado em diversos tipos de células como os melanócitos, queratinócitos, células epiteliais, células B, células *natural killer* e outros subtipos de células T^{65,66}. Apesar de originalmente ter sido descoberto na hipófise e nomeado por seus efeitos na pigmentação, estudos recentes revelaram que o α -MSH interage com células imunes exercendo atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e imunomodulatórias⁶⁷⁻⁶⁹.

Os efeitos biológicos do α -MSH são mediados pela ligação de um dos cinco receptores de melanocortinas, MC-1R ao MC-5R (Quadro 2), que pertencem à subfamília da proteína G, acoplados a receptores com sete domínios transmembrana⁴⁴. O receptor de melanocortina ligado ao α -MSH leva a ativação da adenilato ciclase e a subsequente elevação dos níveis de AMP cíclico intracelular⁷⁰. O MC-1R foi o primeiro receptor de melanocortinas clonado a partir de melanócitos e mostrou ter um papel crucial na pigmentação. Além disso, o MC-1R não é apenas expresso nos melanócitos, mas é também detectável na maioria dos tipos de células não melanocíticas como as células da mucosa do trato gastrointestinal, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs), células mastocitárias e neutrófilos, sugerindo várias funções para esse receptor^{68,71,72}.

Quadro 2 - Receptores para melanocortinas e seus efeitos biológicos

Receptor	Principais locais de expressão	Agonista e afinidade	Efeito biológico
MC-1R	SNC, melanócitos, testículos, glândulas epidérmicas, células endoteliais, podócitos, fibroblastos, neutrófilos, células dendríticas, monócitos, linfócitos e macrófagos	NDP-MSH > α -MSH $\geq$ ACTH > β -MSH > γ -MSH	Pigmentação, antipirético, imunidade antimicrobiana, respostas anti-inflamatória, imunomodulação
MC-2R	Adipócitos, rins, adrenais, osteoblastos	Somente ACTH	Estereoidogênese, proteção óssea
MC-3R	SNC, rins, placenta, trato gastrointestinal, pâncreas, linfócitos B, macrófagos	NDP-MSH > γ -MSH $\geq$ ACTH $\geq$ α/β -MSH	Homeostasia energética, respostas anti-inflamatória e imunomodulação, comportamental
MC-4R	SNC, rins	Igual ao MC-1R	Homeostasia energética, regulação do apetite, antipirético e comportamento sexual
MC-5R	Rins, glândulas exócrinas, linfonodos, leucócitos, tecido adiposo e muscular	Igual ao MC-1R	Modulação de funções exócrinas e imunomodulação

Além de melhorar a inflamação gastrointestinal, o α -MSH demonstrou reduzir respostas de hipersensibilidade na pele e inibir o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental ou inflamação alérgica, indicando um papel na regulação das respostas imunes inflamatórias⁷³⁻⁷⁵. Entretanto, os mecanismos de atividade anti-inflamatória e imunomodulatória do α -MSH ainda não foram completamente elucidados.

O α -MSH é capaz de aumentar a liberação de IL-10 por monócitos e diminuir a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. Adicionalmente o neuropeptídeo também suprime significativamente a expressão de CD86 e CD40 em monócitos e DCs⁷⁶. Num estudo recente realizado em 2012, foi demonstrado que o α -MSH é capaz de induzir DCs tolerogênicas, assim como aumentar a capacidade de

expansão funcional das células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3 (Tregs). Essas Tregs foram capazes ainda, de suprimir a proliferação e secreção das células patogênicas Th17 em peles de rato com *psoríase-like* e em células Th17 de indivíduos com psoríase. Esses efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e *in vitro*, indicam que as melanocortinas são potenciais drogas para o tratamento de doenças inflamatórias⁷⁷.

O hormônio estimulador de melanócito α possui, ainda, papel na manutenção da homeostase epidérmica e estabilidade genética após a irradiação UVB, protegendo os melanócitos da apoptose induzida por UV⁶⁶. Embora esse efeito ainda não seja totalmente compreendido, sabe-se que é decorrente ao aumento da atividade de proteínas melanogênicas, como a tirosinase, e a produção de eumelanina cutânea. A eumelanina promove uma barreira parcial à penetração dos raios UV eliminando espécies reativas do oxigênio (ROS) que degradam o material genético⁷⁸⁻⁸⁰. Corroborando esses achados, estudos clínicos demonstram que injeções subcutâneas de α -MSH reduzem em 59% a formação de dímeros de timidina e em mais de 50% o número de células epidérmicas com queimaduras solares⁸¹. Certas drogas parecem interagir com o hormônio α -MSH. Em inflamação induzida por IL1- β em ratos, o α -MSH reduziu a processo e esse efeito antagonizado pela injeção do bloqueador beta-adrenérgico, propranolol, ou pela administração de um antagonista β 2⁸². A administração intravenosa de clonidina, um estimulador do receptor α -2 seletivo parece reduzir a concentração plasmática de α -MSH. Adicionalmente, a dopamina pode também inibir a produção de α -MSH em humanos⁵⁸.

1.5 Papel Fisiológico do Sistema Imune da Pele

O sistema imune da pele é composto em grande parte por citocinas que medeiam a conexão entre o sistema inato e adaptativo. Na pele, as citocinas IL-1 α e β , IL-6, TNF- α são, classicamente, as pró-inflamatórias. Os INF- α e β suprimem infecções virais e IL-10 inibe a imunidade celular. TGF β suprime Th1 e Th2 na resposta imune e ainda a IL-12 facilita a resposta celular Th-1. Estas citocinas têm efeitos locais e sistêmicos⁸³.

1.6 Esteroidogênese na Pele

A pele pode ser considerada um órgão apto a esteroidogênese após se sensibilizar e interagir com fatores ambientais⁸⁴.

As células da pele humana, incluindo queratinócitos e fibroblastos, são aptas a produzir e processar a POMC, CRH e expressam CRH-R1⁸⁵. Sabe-se ainda que a pele também tem uma atividade corticoesteroidogênica, sugerindo uma conexão funcional entre esses elementos⁸⁵. Em condições favoráveis, as células da pele humana são capazes de produzir corticoesteroides incluindo deoxicorticoesterona, 18(OH) deoxicorticoesterona e cortisol⁸⁵. Além disso, na pele também são geradas todas as enzimas, receptores e proteínas de transporte necessárias para a produção destes corticoesteroides como CYP11A1, 3 β HSD, CYP11B1, CYP17, CYP21A2, MC2, StAR e proteínas relacionadas como StAR⁸⁶. A expressão de CYP11A1 foi mostrada não apenas em melanócitos normais, queratinócitos e fibroblastos mas também em um número de células tumorais de origem cutânea e não cutânea, incluindo melanomas⁸³.

Apesar da expressão de CYP17A, CYP21A2, CYP11B1 e HSD11B1 terem sido recentemente bem documentados na pele humana normal e células da pele, esses genes também foram expressos de forma considerável em todas as linhagens de melanoma, assim como em carcinomas de mama, carcinoma de células escamosas, osteosarcomas, gliomas e células leucêmicas⁸³. Isto sugere que os melanomas e outros tumores podem utilizar os glucocorticoides para modificar o seu comportamento local, facilitando a sobrevida tumoral no hospedeiro.

1.7 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal na Pele e Sistema de Resposta ao Estresse Cutâneo

A pele é também sujeita a regulação do eixo HPA por meio de mecanismos centrais e locais⁸⁷. Especificamente o CRH e os peptídeos derivados da POMC, incluindo o ACTH e seus receptores correspondentes, são expressos na pele⁵⁵. Adicionalmente, estudos funcionais demonstraram o papel desses hormônios na regulação da homeostase da pele^{55,84}. Por exemplo, a aplicação de CRH e ACTH estimula a produção de cortisol pelo folículo capilar e queratinócitos foliculares e melanócitos⁸⁸.

Foi observado que a IL-1 é um regulador positivo do CRH e expressão da POMC⁵⁵. Assim, estudos adicionais de comunicação entre citocinas cutâneas e elementos diferentes do eixo HPA são necessários para entender melhor os mecanismos que regulam a resposta epidérmica ao estresse.

É reconhecido que o sistema imune cutâneo está sujeito a vários fatores positivos e negativos que resultam na defesa contra patógenos. A hipersensibilidade e a insuficiência da função imune da pele resultam em patologias cutâneas como acne vulgar, psoríase, dermatite atópica, lúpus eritematoso e outras doenças autoimunes⁸⁹. Além das citocinas e células imunes, a contribuição dos esteroides locais nos diferentes acontecimentos cutâneos são também emergentes⁸⁹. Os glucocorticoides produzidos localmente podem cointeragir com citocinas próinflamatórias, CRH e neuropeptídeos⁵⁵. A deficiência da produção local de glucocorticoides ou da função de seus receptores pode, pelo menos parcialmente, ser responsável pelo desenvolvimento de dermatite atópica, psoríase e alopecia aerata⁹⁰. Um estudo recente mostra que o aumento da produção de cortisol local é mediado por IL-1 β ⁸⁷, que é consistente com a hipótese que as citocinas inflamatórias são reguladores importantes na produção local de cortisol^{84,89} (Figura 4). Fatores de estresse como baixa umidade da pele, luz UV, trauma e oncogênese, podem resultar num aumento da produção local de cortisol⁸⁷. Os mecanismos de regulação incluem diferentes elementos do eixo HPA e IL-1 β . Assim, a regulação do sistema de esteroidogênese local tem um papel importante da fisiopatologia das diversas doenças cutâneas.

Figura 4 - Efeito do estresse sobre a pele com aumento da produção de cortisol relacionado à reação inflamatória mediada por IL-1 β [Adaptado de Zhu⁸⁹]

1.8 Participação do CRH e das Melanocortinas nas Doenças Humanas Inflamatórias e Autoimunes

A participação do eixo HPA central e periférico foi descrito em várias doenças⁹¹. Em estudos com pacientes portadores do HIV, foi observado um aumento dos níveis de α -MSH nos grupos III e IV do centro de controle de doenças⁹². A relação entre a concentração de α -MSH e a progressão da doença foi explorada em um estudo prospectivo que mostrou altas concentrações de α -MSH associadas com redução da progressão da doença ou morte⁹³. As citocinas pró-inflamatórias que promoviam replicação do HIV em células infectadas estavam todas inibidas pelo α -MSH⁵⁸. O mesmo hormônio foi analisado no líquido sinovial de pacientes com artrite, e níveis mais altos foram registrados nas formas marcadas por intensa atividade inflamatória⁹⁴. Ainda em

relação às doenças reumáticas, existe uma maior concentração deste peptídeo no fluido sinovial de pacientes com artrite idiopática juvenil e adultos enquanto concentrações menores foram observadas no líquido sinovial de pacientes com osteoartrose⁹⁴. Nesse grupo de pacientes não ocorreu variação entre os níveis plasmáticos de α -MSH, sugerindo que possa ocorrer a produção de α -MSH dentro da articulação inflamada⁵⁸.

Além disso, pacientes com infarto agudo do miocárdio que receberam terapia trombolítica apresentam níveis séricos aumentados de α -MSH⁹⁵ assim como pacientes em hemodiálise crônica com endotoxina plasmática detectável⁹⁶. Estas observações sugerem que, na vigência de um processo inflamatório, exista um aumento das concentrações de α -MSH como uma reação compensatória. Acredita-se que, se esse aumento não ocorrer ou for insuficiente, o processo será mais grave⁵⁸.

Existem poucos estudos na literatura sobre α -MSH e doenças autoimunes. O papel do α -MSH na encefalopatia autoimune experimental foi investigado tendo sido observados resultados promissores para o tratamento dessa patologia inflamatória. Estudos avaliando níveis plasmáticos de α -MSH em pacientes com doença autoimune são ainda mais escassos. Nenhuma diferença foi encontrada nos níveis séricos de α -MSH e ACTH entre diabetes mellitus tipo I (insulinodependente) e controles⁹⁷. Na esclerose múltipla, que pode ser considerada uma doença imune mediada, níveis plasmáticos baixos ou indetectáveis foram encontrados em dois terços dos pacientes⁹⁸. Entretanto, outro estudo não confirmou estes achados em um grupo de 16 pacientes com a mesma enfermidade⁹⁹.

Pichler *et al.*¹⁰⁰ avaliaram o soro de pacientes com vitiligo e constataram níveis de α -MSH mais baixos que os dos controles saudáveis. Os autores atribuíram o achado a despigmentação característica da doença, e a própria condição de tolerância periférica.

Em avaliações de biópsias de pele de pacientes com psoríase foi encontrado um aumento da expressão de CRH na epiderme e anexos da pele com lesão em relação aos controles. Embora não se tenha verificado qualquer variação subtipo dependente, os autores consideraram o CRH um fator crucial na patogênese da doença⁵⁶.

Biópsias de pele com acne vulgar⁵³ e melanoma¹⁰¹, não apresentaram aumento na expressão de CRH.

No LES, que é o protótipo de doença autoimune com uma alta frequência de envolvimento cutâneo¹⁰², não existe nenhum estudo demonstrando a participação do CRH e das MCs na sua fisiopatologia. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação do CRH e do eixo da POMC na resposta inflamatória cutânea dos pacientes com lúpus.

2 OBJETIVO

Avaliar a participação do CRH e das melanocortinas na fisiopatologia do LES com envolvimento cutâneo.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Entre janeiro de 2010 e janeiro de 2012, 17 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de LES com envolvimento cutâneo foram incluídos no protocolo de pesquisa (Anexo A). Todos estavam em seguimento regular no ambulatório de LES da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Dezesete controles saudáveis foram pareados por sexo e idade.

Os prontuários médicos foram cuidadosamente revisados para avaliação de dados prévios clínicos, imunológicos e terapêuticos. Manifestações do LES foram definidas como: lesões mucocutâneas (rash malar ou discoide, úlceras mucosas ou fotossensibilidade), comprometimento renal (proteinúria $\geq 0,5$ g/24 h, presença de cilindros, hematúria persistente com ≥ 10 hemácias por campo e/ou insuficiência renal), envolvimento articular (artrite não erosiva), doença neuropsiquiátrica (psicose ou convulsão), serosite (pleurite ou pericardite) e anormalidades hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia com leucócitos $< 4.000/\text{mm}^3$, linfopenia com linfócitos $< 1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões e trombocitopenia com plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$, desde que excluídas causas infecciosas e/ou medicamentosas. A atividade da doença foi avaliada através do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)*¹⁰³.

Todos os sujeitos incluídos no presente estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (CAPPesq 0612/09) (Anexos B e C).

Crítérios de inclusão: mulheres que preenchiam os critérios de classificação para LES do Colégio Americano de Reumatologia⁴, com presença de lesões cutâneas novas (lúpus subagudo) ou piora de lesões pré-existentes em relação a consulta anterior.

Crítérios de exclusão: drogas e outros fatores que pudessem interferir na produção de melanocortinas: uso de beta-bloqueadores ou clonidina⁵⁸, gravidez¹⁰⁴, história de infecção aguda nos últimos seis meses⁵⁸, infarto agudo do miocárdio prévio⁹², sorologia positiva para o HIV⁹², outras doenças inflamatórias ou reumáticas^{58,92}, índice de massa corporal (IMC) > 30 kg/m²¹⁰⁵, dermatite (acne grau III e IV) e prednisona em doses maiores que 15 mg por dia. Pacientes com Fator Reumatoide (FR) foram também excluídos uma vez que a presença do anticorpo (anticorpos heterófilos) pode promover resultados falso positivos na análise pelo método multiplex¹⁰⁶.

3.2 Protocolo de Estudo

Após entrar no estudo, biópsias de fragmentos de pele (4 mm) da área afetada (membros superiores) e área não afetada (tronco) foram realizadas. Fragmentos de pele dos membros superiores de controles saudáveis também foram obtidos. Foi feito um botão anestésico, com injeção intradérmica de 1 a 2 mL de lidocaína a 1% sem vasoconstrictor com agulha de insulina. A incisão posteriormente foi ocluída através de um ponto cirúrgico. Amostras de 10 mL de sangue por punção venosa foram coletadas no mesmo período.

3.3 Parâmetros Laboratoriais

3.3.1 Detecção de autoanticorpos

FAN e anti-DNA de dupla hélice foram detectados através da imunofluorescência indireta usando *Crithidia lucilliae* como substrato¹⁰⁷. Ensaio de hemaglutinação com extrato de timo de coelho foi usado para avaliar a presença de anticorpos contra RNP e Sm. A detecção de anticorpos contra antígenos salino-solúveis, Ro/SS-A e La/SS-B, foi realizada através de contraimuno eletroforese contra extrato salino de baço de cachorro^{108,109}. Anticorpos contra proteína P ribossomal (anti-P) foram detectados por *Western blotting* usando como substrato frações ribossomais purificadas extraídas de hepatócitos de ratos.

3.3.2 Citocinas séricas

As citocinas séricas (IL-1, IL-1Ra, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , IFN- γ) foram avaliadas simultaneamente pelo método de imunoensaio *Multiplex bead-based* (Millipore, MA, USA).

As amostras de soro foram incubadas durante à noite (16-18 h) a 4 °C com anticorpo anti-citocina acoplado as *beads*. Após lavagem, as *beads* foram incubadas com anticorpo de detecção por 60 minutos. Posteriormente foi adicionado streptavidina-ficoeritrina. Nova lavagem com *sheat fluid* foi realizada e a média da fluorescência foi avaliada. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.3.3 Cortisol, ACTH e α -MSH

A concentração plasmática de ACTH foi determinada pelo método imunoquimioluminométrico. O sangue foi coletado sempre no período da manhã e colocado em tubo plástico com EDTA no gelo, sendo encaminhado imediatamente para análises. Após a separação, ao plasma foi adicionado 25 μ L de NEM (inibidor enzimático) para prevenir a degradação da molécula. A amostra de plasma foi mantida congelada a uma temperatura abaixo de -8 °C.

O cortisol foi determinado pelo Método de Químio-imunoensaio DPC Immulite. O sangue foi colhido e encaminhado ao laboratório à temperatura ambiente. Na conservação pré-analítica o soro foi conservado em temperatura de 2 a 8 °C até 48 h; sendo estocado abaixo de -8 °C.

Os níveis séricos de α -MSH foram determinados pelo sistema multiplex (HNP-35K Kit, Millipore, Billerica, MA, USA). O protocolo incluiu extração através de precipitação de acetonitrilo. Após reconstrução da amostra com *assay buffer*, o anticorpo primário (HNP- 1035P) foi adicionado e incubado à temperatura ambiente por duas horas. À seguir, as *beads* foram adicionadas em cada poço da placa e incubadas durante à noite (16- 18 h) a 4 °C. Posteriormente duas lavagens foram realizadas e o anticorpo de detecção (HNP- 1035D) foi adicionado. Nova incubação de uma hora à temperatura ambiente foi realizada, seguida da adição de Streptavidina- ficoeritrina por 30 minutos. Em seguida, duas novas lavagens foram realizadas com *sheat fluid*. A leitura foi feita em Luminex (50 *bead/bead/set*). Os resultados séricos foram expressos em pg/mL.

3.4 Avaliação da Pele

3.4.1 Imunofluorescência direta: IgG, IgA, IgM e C3

A biópsia de pele colhida do doente foi armazenada com crioprotetor em freezer (-20 °C). Em criostato a -20 °C o fragmento da pele foi cortado a 4 µm de espessura e o fragmento de tecido aderido em lâmina silanizada (três cortes por lâmina).

Para a reação, os cortes receberam o conjugado (anti-imunoglobulina humana produzida em animal imunizado e associada a um fluorocromo = conjugado FITC) diluído em Azul de Evans. Os conjugados utilizados foram: anti-IgG, anti-IgM e anti-C3c (todos adquiridos comercialmente [Sigma Aldrich, USA]). Os cortes permaneceram com o conjugado por 30 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente, protegidos da luz, para ligação ao imunocomplexo. A seguir, as lâminas foram lavadas com TBS (tampão trizma base com cloreto de cálcio) pH 7,5 por 20 minutos. Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina tamponada (pH 8,5) e lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência HBO 50w (filtro CB12), marca Carl Zeiss, com oculares de 10X e objetivas de 16X e 40X. O resultado foi dado de acordo com o padrão e localização da fluorescência.

3.4.2 Marcações imunohistoquímicas das biópsias de pele

Cortes histológicos de quatro µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva 2% de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). A seguir, os cortes histológicos foram

desparafinizados em dois banhos de xilol à temperatura ambiente durante 20 minutos cada. Posteriormente, foram hidratados em sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada. O bloqueio de peroxidase endógena (H_2O_2) foi feito em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Fez-se a exposição antigênica em calor úmido (banho-maria) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9,0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95 °C ou em panela de pressão no tampão citrato pH 6,0, durante três minutos. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em tampão PBS pH 7,4.

O bloqueio de biotina foi feito em tecido de baço com bloqueador de biotina/avidina (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. X0590), conforme instruções do fabricante. O bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido foi feito com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de albumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7,4, “over-night” a 4 °C. Os anticorpos utilizados foram anticorpo monoclonal primário anti-ACTH na diluição de 1:200 (Abcam, Cambridge, U.K.), anticorpo primário policlonal anti-CRH na diluição de 1: 250 (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA), anticorpo primário policlonal anti α -MSH na diluição de 1:250 (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) e anticorpo primário policlonal anti-MC-1R na diluição de 1:400 (Antibodies-online Inc., Atlanta, GA, USA).

Os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,05% acrescida de 1,2 mL de água oxigenada 3%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico por meio dos controles positivos que acompanharam as reações.

Os controles positivos aos antígenos estudados foram: fragmentos de hipófise para ACTH e fragmentos de hipotálamo para CRH, MC-1R e α -MSH. Os controles negativos das reações foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

Os cortes assim processados foram lavados em água corrente por cinco minutos, contracorados com Hematoxilina de Carazzi por 10 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

3.4.3 Leitura das lâminas

As lâminas foram arquivadas digitalmente usando um instrumento de digitalização Panoramic (versão de software 1.11.25.0, 3DHistech, Budapeste, Hungria), com foco 20X objetiva e expandida para assegurar uma melhor resolução de imagem.

A expressão de ACTH, MC-1R, α -MSH e CRH foram analisadas na epiderme e derme. Todas as marcações foram quantificadas por meio do *software* Image-ProPlus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD.) através da relação de área corada positivamente pela área total (em micrômetros quadrados - μm^2).

A expressão do MC-1R foi determinada pelo próprio programa, que mostrava a área expressa/corada dividida pela área total (μm^2). As áreas de coloração positiva foram determinadas por limiar de cor. Estes procedimentos geraram um arquivo que contém todos os dados de cor de seleção, que foram depois aplicadas a todas as amostras coradas do anticorpo.

Para avaliação do CRH e α -MSH, a contagem das células coradas foi realizada manualmente perfazendo toda a extensão da epiderme e 10 áreas sequenciais da derme.

3.5 Análise Estatística

Todos os testes de significância foram realizadas com o programa InStat (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os dados foram expressos em média $\pm$ SE. Os testes t Student ou Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre grupos. Correlações foram expressas através da utilização do coeficiente de correlação de Spearman. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a expressão de marcadores na pele. Em todos os testes estatísticos o nível de significância da variável independente foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Todos os pacientes e controles desse estudo foram seguidos, após a biópsia de pele, sem apresentarem nenhuma repercussão clínica.

As pacientes com LES e os controles saudáveis apresentaram média de idade similares ($43 \pm 10,9$ vs $41 \pm 13,9$ anos; $p = 0,65$), IMC ($26,0 \pm 3,1$ vs $24,8 \pm 2,9$ kg/m²; $p = 0,27$), bem como prevalência de menopausa ($47,0$ vs $37,5\%$; $p = 0,73$) (Tabela 1).

A média da duração de doença foi de $15,4 \pm 8,7$ anos. Todos os pacientes tinham um histórico prévio de acometimento articular e cutâneo, 50% hematológico, 31,2% renal e de sistema nervoso central e 25% de serosite.

Ao entrar no estudo a média do escore SLEDAI foi de $7,8 \pm 5,3$. Aproximadamente um quarto dos pacientes tinham positividade para anticorpos anti-dsDNA e anti-Ro/SS-A e aproximadamente 40% tinham níveis de complemento baixos C3 ou C4 (Tabela 1).

Aproximadamente metade dos pacientes lúpicos faziam uso de Azatioprina (47,0%), 76,5% de prednisona (média de $5,9 \pm 4,6$ mg/dia) e 52,9% de antimalárico (Quadro 3).

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES com manifestação cutânea e controles saudáveis

Parâmetros	LES (n = 17)	Controles (n = 17)	p
Idade, anos	43,0 ± 10,9	41,0 ± 13,9	0,65
IMC, kg/m ²	26,0 ± 3,1	24,8 ± 2,9	0,27
Menopausa (%)	47,0	37,5	0,73
Duração da doença, anos	15,4 ± 8,7	-	
SLEDAI	7,8 ± 5,3	-	
FAN- positivo (%)	100,0	-	
Anti-dsDNA-positivo (%)	23,5	-	
Anti-Sm positivo (%)	11,8	-	
Anti-ENA positivo (%)	29,4	-	
Anti-Ro positivo (%)	23,5	-	
Anti-La positivo (%)	5,9	-	
Anti-P positivo (%)	23,5	-	
Diminuição de C3, mg/L, média (%)	37,3	-	
Diminuição de C4, mg/L, média (%)	43,7	-	
Diminuição de C3 e C4 (%)	29,4	-	

Valores expressos em média ± SD ou porcentagens.

LES: Lúpus eritematoso sistêmico; SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*;

FAN: Fator antinuclear.

Quadro 3 - Medicações utilizadas pelos pacientes portadores de LES em atividade cutânea no início do estudo

Paciente	Medicações em uso
1	Azatioprina 100mg, Prednisona 10 mg
2	Prednisona 5mg
3	Azatioprina 100mg, Cloroquina 250 mg
4	Azatioprina 100mg, Prednisona 12,5 mg
5	Azatioprina 150mg, Prednisona 10 mg
6	Azatioprina 150mg, Prednisona 10 mg, Cloroquina 250 mg
7	Cloroquina 250 mg
8	Cloroquina 250 mg
9	Prednisona 10 mg
10	Azatioprina 200 mg, Prednisona 7,5 mg, Cloroquina 250 mg, Ciclosporina 50 mg
11	Azatioprina 75 mg, Prednisona 7,5 mg, Cloroquina 250 mg
12	Cloroquina 250 mg
13	Prednisona 10 mg
14	Prednisona 5 mg, Cloroquina 250 mg, Talidomida 100 mg
15	Prednisona 10mg, Cloroquina 250 mg
16	Prednisona 5 mg
17	Azatioprina 150mg/d, Prednisona 5 mg/d

Todas as pacientes apresentavam LES com atividade cutânea (lúpus subagudo) no momento do estudo (Figura 5). Um fragmento da pele lesionada, como mostra a Figura 5b, foi retirado da área afetada, um segundo fragmento de pele de área não afetada (dorso) foi retirado de cada paciente.

Figura 5 - Paciente portadora de lúpus eritematoso sistêmico com atividade cutânea em região de face (a) e membro superior (b).

4.1 Caracterização das Lesões de Pele por Imunofluorescência Direta (IFD)

A imunoglobulina mais frequentemente detectada nas lesões de pele dos pacientes com LES foi a IgM (88,2%), seguida da IgG (52,9%). IgA e C3 foram detectadas em 17,6% e 23,5% dos casos, respectivamente (Figura 6a). Todos os pacientes expressaram pelo menos um marcador, enquanto que os controles saudáveis não expressaram nenhuma imunoglobulina ou C3. A Figura 6b demonstra pele com fluorescência negativa para IgM num controle saudável e a Figura 6b, uma fluorescência positiva para IgM na pele de um paciente com lúpus.

a	% de positividade (LES)	b
IgG	52,94
IgM	88,23	
IgA	17,64	
C3	23,52	

Figura 6 - Imunofluorescência direta (IgM, IgG, IgA e C3) da pele de pacientes com LES (n = 17) e controles (n = 17). Painei 6a, dados da frequência de positividade no LES com acometimento cutâneo; 6b, fluorescência direta negativa para IgM na biópsia de pele de um controle saudável e 6c, fluorescência direta positiva para IgM na biópsia da pele afetada de uma paciente com LES com acometimento cutâneo

Na Figura 7 podemos observar a positividade da imunofluorescência para IgM (Figura 7a) e IgG (Figura 7 b) em uma mesma paciente portadora de LES com atividade cutânea. Em ambas as figuras observa-se um padrão de imunofluorescência homogênea, intensa e contínua na zona de membrana basal.

Figura 7 - Depósitos de IgM (a) e IgG (b) na zona de membrana basal num fragmento de pele (área afetada) de uma paciente com lúpus eritematoso com acometimento cutâneo

4.2 Análise Imunohistoquímica da Expressão de ACTH, CRH, α -MSH e MC-1R na Pele

Uma análise imunohistoquímica de cada marcador (ACTH, CRH, α -MSH e MC-1R) foi realizada. Na Figura 8, observa-se a expressão de CRH na epiderme e derme profunda de uma paciente com LES em acometimento cutâneo.

Figura 8 - Avaliação Imunohistoquímica da expressão do CRH na epiderme (a) e derme profunda (b) de uma paciente com LES com acometimento cutâneo. Na figura, as setas indicam algumas das áreas coradas pelo marcador

A derme profunda da pele afetada apresentou uma maior expressão do CRH que a pele não afetada dos pacientes com lúpus e a pele de controles saudáveis ($p = 0,024$) (Gráfico 1). Nenhuma diferença, no entanto, foi observada quando foi avaliada a expressão do CRH na epiderme entre os três tipos de pele ($p = 0,353$).

Não foram observadas diferenças na expressão epidermal de α -MSH entre os três tipos de pele ($p = 0,388$). Resultados similares foram obtidos na análise da derme profunda ($p = 0,6074$). Nenhuma diferença na expressão do MC-1R na epiderme ($p = 0,383$) e derme profunda ($p = 0,962$) foi registrada entre os diferentes tipos de pele.

Gráfico 1 - Expressão do CRH na epiderme e derme profunda na pele dos pacientes com LES com acometimento cutâneo e controles. Os resultados estão expressos como mediana, *p < 0,05

4.3 Citocinas Séricas

Os pacientes com LES e envolvimento cutâneo apresentaram níveis significativamente mais altos de IFN- γ ($21,0 \pm 7,1$ vs $5,2 \pm 1,5$ pg/mL, $p = 0,041$, TNF- α ($18,6 \pm 2,8$ vs $5,7 \pm 0,4$ pg/mL, $p = 0,001$) e IL-6 ($5,4 \pm 2,5$ vs $1,7 \pm 1,2$ pg/mL, $p = 0,049$) quando comparados com os controles saudáveis. (Tabela 2). Para melhor compreensão segue o Gráfico 2.

Tabela 2 - Níveis séricos de citocinas (INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17) em pacientes lúpicos com envolvimento cutâneo e controles saudáveis (resultados expressos como média $\pm$ SE)

Citocinas	LES (n = 17)	Controles (n = 17)	p
IFN- γ (pg/mL)	$21,0 \pm 7,1$	$5,2 \pm 1,5$	0,041
TNF- α (pg/mL)	$18,6 \pm 2,8$	$5,7 \pm 0,4$	0,001
IL-6 (pg/mL)	$5,4 \pm 2,5$	$1,7 \pm 1,$	0,049
IL-17 (pg/mL)	$5,7 \pm 2,0$	$1,3 \pm 0,4$	0,099

Gráfico 2 - Representação gráfica dos valores de interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-17 (IL-17)

Os níveis de IL-17 ($5,7 \pm 2,0$ vs $1,3 \pm 0,4$ pg/mL, $p = 0,099$), apesar de mais altos que os controles, não apresentaram significância estatística.

Dentre as correlações investigadas, salienta-se no Gráfico 3 que os níveis de IL-17 e IFN- γ apresentaram uma correlação positiva ($r = 0,585$, $p = 0,015$). Não foram observadas outras correlações entre outras citocinas.

Gráfico 3 - Correlação entre os níveis séricos de IL-17 e IFN- γ em 17 pacientes com LES com envolvimento cutâneo. * $p < 0,05$ pelo teste de correlação de *Spearman*

Em pacientes com LES com acometimento cutâneo e controles os níveis séricos de IL-10, IL-1 β , IL1-ra e IL-12p70 foram indetectáveis.

4.4 Níveis de Cortisol, ACTH e α -MSH

Os valores plasmáticos de ACTH foram similares entre os pacientes com LES e controles ($25,6 \pm 43,7$ vs $16,7 \pm 11,9$ pg/mL; $p = 0,92$), da mesma forma que os valores de cortisol matinal ($7,2 \pm 5,6$ vs $10,1 \pm 3,8$ μ g/mL; $p = 0,07$).

A média do α -MSH foi comparável entre os pacientes com LES e controles saudáveis ($194,1 \pm 28,0$ vs $181,5 \pm 14,6$ pg/mL; $p = 0,70$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece novas evidências de que os hormônios do eixo HPA periférico têm participação na patogênese da LES com envolvimento cutâneo.

Em nosso desenho experimental, estabelecemos rigorosos critérios de seleção, excluindo pacientes usuários de determinados medicamentos que pudessem interferir na síntese de melanocortinas, como beta-bloqueadores e clonidina⁵⁸. Tivemos também o cuidado de excluir pacientes que utilizassem altas doses de glicocorticoides (prednisona > 15 mg/dia), uma vez que o mesmo poderia interferir no eixo HPA¹¹⁰. Pacientes com IMC > 30 kg/m² também não entraram no estudo pois o α -MSH pode estar alterado em indivíduos obesos¹¹¹. Outras condições inflamatórias ou infecciosas que pudessem interferir no sistema das melanocortinas também foram excluídas, como artrite reumatoide, infarto agudo do miocárdio e soropositividade para o HIV^{58,92}.

Os pacientes deste estudo apresentavam lúpus subagudo, com lesões distribuídas principalmente em regiões de face e membros expostas ao sol. Nossos resultados mostraram que, quatro das 17 pacientes apresentam positividade para anti-SSA/Ro. Dentre os autoanticorpos, o anti-SSA/Ro é frequentemente encontrado nos pacientes com LECS e associado fortemente à fotossensibilidade³¹. Adicionalmente, o antígeno SSA/Ro52 é superexpresso

em lesões de LEC induzidas por raios UV tanto de forma espontânea quanto experimentalmente³⁴. Acredita-se ainda, que os anticorpos circulantes anti-SSA/Ro e anti-SSB/La ligam-se a esses antígenos podendo causar exacerbação do LECS e LES após exposição a luz solar^{33,34}. Recentes estudos sugerem que o anti-SSA/Ro52 possa ter um papel regulatório geral na inflamação fazendo um controle inibitório da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IFN\beta$ e IL-12³⁴.

Com o intuito de melhor caracterizar a pele acometida, o diagnóstico clínico de lesão cutânea dos pacientes com LES foi confirmado pelo ensaio de IFD para IgG, IgA, IgM e C3¹¹². Todos os pacientes com a doença apresentavam positividade para pelo menos um marcador. A IFD é um instrumento bem conhecido e valioso para a detecção de depósitos imunes na junção dérmico-epidérmica no diagnóstico de lúpus¹¹². Sabe-se que a atividade da doença clínica no lúpus tem sido associada com a deposição de padrões particulares de Igs¹¹². Benstein *et al.*¹¹³ detectaram que os depósitos de IgM eram mais comuns do que de IgG e que a deposição de IgM estava correlacionada com um prognóstico de uma doença mais grave e ativa. Corroborando esses dados, em nossos pacientes houve uma predominância de IgM seguida de IgG. Positividade menor foi encontrada para IgA e C3.

Além dos achados da imunofluorescência direta, níveis séricos mais elevados de citocinas pró-inflamatórias foram detectados nos pacientes com LES, quando comparado aos controles saudáveis, reforçando o estado de atividade da doença. Várias citocinas têm sido descritas na patogênese do

LES⁶ mediando respostas biológicas na imunidade inata e adquirida. Sendo assim, elas desempenham um papel importante na diferenciação, maturação e ativação de várias células imunes e estão envolvidas direta e indiretamente na inflamação tecidual. Aumento dos níveis de TNF- α ^{6,114}, IL-6¹² e IL-17⁷ têm sido positivamente correlacionados com atividade da doença lúpica.

No presente trabalho reportamos, pela primeira vez, uma correlação positiva entre os níveis circulantes de IL-17 e IFN- γ sugerindo que essas duas citocinas possam exercer um papel pró-inflamatório na fisiopatologia do LES com acometimento cutâneo. Interessantemente uma associação entre a expressão de IFN- α e IL-17 no tecido e atividade de doença lúpica cutânea havia sido descrita¹¹⁵. Em um estudo experimental de lúpus cutâneo induzido por drogas já havia sido identificado um aumento da expressão de IFN- γ ⁸. Reforçando este dado, pacientes que apresentavam envolvimento cutâneo, no lúpus eritematoso cutâneo subagudo e o lúpus eritematoso discoide também apresentaram um aumento da expressão de IFN, sendo que o nível de expressão do gene estava relacionado com a atividade cutânea da doença¹¹⁶.

O achado mais interessante do presente estudo foi o fato dos pacientes com lúpus exibirem uma alta expressão tecidual de CRH. Esta observação enfatiza a relevância potencial do sistema neuroimunoendócrino na fisiopatologia do lúpus com envolvimento cutâneo, em outras doenças da pele^{53,91,100}. Nesse sentido, os pacientes com psoríase, melanoma e acne vulgar, também apresentaram aumento da expressão de CRH^{12,53,101}.

Corroborando nossos achados, pacientes com psoríase apresentam um aumento expressivo de CRH tecidual na epiderme e anexos da pele.

Na acne vulgar, uma forte expressão de CRH foi observada na pele com lesão e nas células da glândula sebácea⁵³. Esta constatação reforça a existência da modulação eixo CRH/POMC nas lesões cutâneas.

Outro neuropeptídeo que pode contribuir para a patogênese de diversas doenças da pele é o α -MSH⁶¹. Este hormônio e seus receptores participam da neuroimunomodulação cutânea em resposta a luz ultravioleta e outros estímulos nocivos à pele⁴⁶. A expressão comparável de α -MSH e seus receptores (MC-1R) na lesão da pele dos pacientes com LES e controles sugerem que o α -MSH e seu receptor não deva exercer um papel importante no controle da lesão cutânea do lúpus.

Além do peptídeo circulante que atinge os tecidos, existem evidências de uma produção local de α -MSH nos locais de inflamação⁵⁸. A produção sinovial de α -MSH em pacientes com artrite reumatoide é um bom exemplo das influências locais desse péptido⁹⁴. Em células hospedeiras, tais como os fagócitos centrais e periféricos, existem circuitos anti-inflamatórios autócrinos/parácrinos com base na expressão de α -MSH e dos seus receptores. Este estudo, no entanto, se limitou à análise do peptídeo no soro dos pacientes e avaliação da sua expressão tecidual, onde não foram observadas diferenças estatísticas.

Embora exista uma tendência a menores níveis de cortisol no soro de pacientes com LES, verificou-se uma grande variabilidade entre os valores individuais por mais que todos os pacientes e controles tenham sido

submetidos a coleta de sangue no mesmo horário. Essa variabilidade é atribuída a variações do ritmo circadiano do cortisol inerentes a cada indivíduo^{117,118}.

Uma série de estudos mostram que a pele e as células da pele podem produzir deoxicorticoesterona, corticoesterona e cortisol *in situ*¹¹⁹⁻¹²¹ em resposta a diferentes estímulos e estresse. Além disso, foi descrito recentemente que a produção de cortisol cutâneo em resposta à baixa umidade da pele está associada ao envolvimento da IL1- β ⁸⁷. Esse estudo aponta para a importância de se avaliar também, a produção de glicocorticoides na pele, o que constitui um desafio para pesquisas futuras no LES.

Em conclusão, o achado do aumento da expressão do CRH na derme profunda dos pacientes com lúpus com atividade cutânea apóia a participação do eixo CRH-POMC periférico na patogênese das lesões cutâneas com LES.

6 CONCLUSÕES

a) Ocorre um aumento da expressão de CRH na derme profunda da pele de pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico com atividade cutânea.

b) O α -MSH e seu receptor (MC-1R) não apresentaram aumento de sua expressão na pele, afetada ou não, dos pacientes com LES.

c) O ACTH não se mostrou expresso na pele de pacientes lúpicos.

d) Nenhuma diferença estatística foi encontrada em relação ao ACTH, cortisol e α -MSH séricos na análise do soro dos pacientes com lúpus em atividade e controles saudáveis.

e) O soro dos pacientes com atividade cutânea apresentaram níveis mais altos de IFN- γ , TNF- α e IL-6 quando comparado aos controles saudáveis.

f) A imunoglobulina predominante nas lesões de pele dos pacientes lúpicos foi a IgM, seguida de IgG, C3 e IgA.

7 ANEXOS

**Avaliação do efeito antiinflamatório do Hormônio Estimulador de Melanócito (Alfa MSH)
no lúpus eritematoso sistêmico: estudo experimental e em humanos**

Orientador: Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

Executante: Dra. Monique kowalski Schmitz

CAPPEsq Protocolo de pesquisa n° _____

São Paulo ____/____/____

Medicações em uso	/ /	/ /	/ /

	/ /	/ /	/ /
Uso de protetor solar	(S) (N) (I)	(S) (N) (I)	(S) (N) (I)
Melhora cutânea	(S) (N)	(S) (N)	(S) (N)
Teve alguma infecção no período?	(S) (N)	(S) (N)	(S) (N)
Necessitou tomar outro medicamento? Se positivo, qual?	(S) (N)	(S) (N)	(S) (N)

**Avaliação do efeito antiinflamatório do Hormônio Estimulador de Melanócito (Alfa MSH)
no lúpus eritematoso sistêmico: estudo experimental e em humanos**

Orientador: Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

Executante: Dra. Monique kowalski Schmitz

CAPPEsq Protocolo de pesquisa n° _____

São Paulo ____/____/____

SANGUE	(____/____/____)	(____/____/____)
	Admissão	Pós tratamento
Cortisol		
ACTH		
α- MSH		
IL1		
IL1-Ra		
IL-6		
IL-10		
IL-12P70		
IL-17		
TNF-α		
INF-γ		

BIÓPSIA	Admissão
Pele a feta da foto-exposta	
CRH	
ACTH	
α- MSH	
MC-1R	

BIÓPSIA	Admissão
Pele sã não-foto-exposta	
CRH	
ACTH	
α- MSH	
MC-1R	

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE.....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE.....
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA.

Avaliação do efeito anti-inflamatório do Hormônio Estimulador de Melanócito (Alfa MSH) no lúpus eritematoso sistêmico: estudo experimental e em humanos

PESQUISADOR: Pós Graduada: Monique Kowalski Schmitz *
 Orientador Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba**

2. CARGO/FUNÇÃO: Médica reumatologista*

Professor Associado da Reumatologia da FMUSP**

3. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 126928 CRM 60238

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto Central HC-FMUSP

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☒	RISCO MAIOR ☐

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

1 - Desenho do estudo e objetivo(s)

O objetivo deste estudo é avaliar o comportamento de um novo hormônio nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade cutânea. Isto poderá contribuir para a descoberta de novas terapêuticas futuras no tratamento da doença e para a melhora do seu quadro.

2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros.

A Sra. está sendo convidada para participar desse estudo por manifestar esses sintomas do lúpus na pele. O objetivo é verificar o grau de inflamação na pele através da dosagem deste novo hormônio. Caso a Sra. não tenha lúpus, a mesma verificação será feita. Se a Sra. concordar, será feita uma biópsia para retirada de 1 ou 2 pequenos pedaços de pele (mais ou menos do tamanho de um grão de lentilha, de 4mm). Antes de iniciar a biópsia, será realizada uma anestesia da pele para que não tenha dor e depois um pequeno ponto cirúrgico será feito, para evitar o risco de cicatriz.

3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos.

Logo após, uma pequena quantidade de sangue será coletada (junto com os exames de rotina) que foram pedidos pelo seu médico. Alguns dados da sua doença serão obtidos do seu prontuário e mantidos sob sigilo.

Após esses procedimentos, sua doença será tratada e a Sra. será acompanhada por um período de 2 meses. Uma vez atingido melhora completa do quadro, nova alíquota de sangue será coletada para comparação, sem necessidade de nova biópsia.

4 - Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3.

Raramente ocorre qualquer complicação após o procedimento. Pode ocorrer do local ficar um pouco dolorido, ou sangrar um pouco, o que pode acontecer normalmente quando se faz este tipo de biópsia. Se isso acontecer, normalmente a realização de compressas locais por poucos dias pode melhorar. O uso de analgésicos como o paracetamol será permitido, segundo a orientação do médico. Como qualquer outra biópsia, pode ocorrer a formação de uma cicatriz, que será pequena pois o fragmento também será pequeno.

Para colher sangue será puncionada uma veia com agulha, como você faz normalmente para colher os seus exames de sangue de controle para cada consulta. A Sra. poderá sentir uma leve dor no local da punção. Eventualmente, pode ocorrer a formação de uma equimose (“roxo”), que desaparece em pouco tempo.

5 - Benefícios para o participante.

A Sra. não será cobrada nem será fornecida remuneração em dinheiro ou outra vantagem financeira pela participação neste estudo.

Os resultados deste estudo ajudarão a determinar o tipo de inflamação que ocorre na pele quando da inflamação da doença. Por isso, poderá ajudar no seu tratamento e na descoberta de novas medicações para o tratamento do lúpus.

6 - Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

Conforme descrito, nosso procedimento/ tratamento utiliza as formas mais atuais e seguras possíveis, não existindo grandes riscos ao paciente. Neste caso, não existem procedimentos alternativos.

7 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255, CEP 05403-900 - SP - Brasil Telefone(s) (11) 3069-6384 (ambulatório) e (11) 3069-7227 (enfermaria).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 - Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 - Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação do efeito antiinflamatório do Hormônio Estimulador de Melanócito (Alfa MSH) no lúpus eritematoso sistêmico: estudo experimental e em humanos".

Eu discuti com o Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo C - Aprovação CAPPesq nº 0612/09 **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/08/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0612/09**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINFLAMATÓRIO DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DE MELANÓCITO (ALFA MSH) EM MODELO DE LUPUS INDUZIDO POR PRISTANE"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello**

Pesquisador (a) Executante: **Domingos Alexandre Ciccone Botte**

CAPPesq, 06 de Agosto de 2009

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice-Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

hf

São Paulo, 12 de agosto de 2009

Ao Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP

Recentemente a CAPPESQ aprovou um nosso protocolo em animais envolvendo o estudo do Hormônio MSH α em modelo de lupus experimental em camundongos (projeto nº4318). Considerando-se a originalidade do assunto e ausência de dados em pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico, optamos por encaminhar para a FAPESP um projeto mais amplo visando avaliar o potencial antiinflamatório do referido hormônio em modelo experimental e pacientes com LES. Essa parte do estudo comporá o trabalho de Doutorado da médica Monique Kowalski Schmitz, sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Borba Neto. Sendo assim, estou encaminhando em anexo o projeto 4318, aprovado por esse comitê, acrescido do texto referente aos pacientes com LES (marcado em vermelho) para aprovação. Adicionalmente informo que esse projeto será encaminhado à FAPESP para obtenção de auxílio à pesquisa sob o novo título "Avaliação do efeito antiinflamatório do Hormônio Estimulador de Melanócito (Alfa MSH) em Lúpus eritematoso sistêmico: um estudo em modelo experimental e humanos."

Antecipadamente agradeço

Suzana Beatriz Veríssimo de Mello
Disciplina de Reumatologia/FMUSP

Ao

Departamento de Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.05.10, tomou conhecimento da inclusão do DR. EDUARDO FERREIRA BORBA NETO como responsável clínico pela execução do Protocolo de Pesquisa **0612/09**, intitulado: "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DE MELANÓCITO (ALFA MSH) EM MODELO DE LUPUS INDUZIDO POR PRISTANE)", aprovado em 05.08.09, sendo que a **PROFA. DRA. SUZANA BEATRIZ VERÍSSIMO DE MELLO** fica como responsável pela parte laboratorial do estudo.

CAPPesq, 28 de agosto de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br
matc

8 REFERÊNCIAS

1. Rekvig OP, Van der Vlag J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Semin Immunopathol.* 2014; 36(3):301.
2. Rothfield N, Sontheimer RD, Bernstein M. Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. *Clin Dermatol.* 2006; 24(5):348-62.
3. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2011;365(22):2110-21.
4. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(9):1725.
5. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008; 358(9):929-39.
6. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol.* 2011; 38(9):839-49.
7. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 432595.

8. Yoshimasu T, Nishide T, Seo N, Hiroi A, Ohtani T, Uede K, Furukawa F. Susceptibility of T cell receptor-alpha chain knock-out mice to ultraviolet B light and fluorouracil: a novel model for drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136(2):245-54.
9. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010; 22(5):347-52.
10. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004; 13(5): 339-43.
11. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2000; 18(5):565-70.
12. Chun HY, Chung JW, Kim HA, Yun JM, Jeon JY, Ye YM, Kim SH, Park HS, Suh CH. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*. 2007; 27(5):461-6.
13. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*. 1998; 16(3-4):249-84.
14. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol*. 1991; 147(1):117-23.

15. Iwano M, Dohi K, Hirata E, Kurumatani N, Horii Y, Shiiki H, Fukatsu A, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, et al. Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. *Clin Nephrol*. 1993; 40(1):16-21.
16. Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, Sakamoto N, Matsuda T, Hirano T. Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab Invest*. 1991; 65(1):61-6.
17. Yoshio T, Masuyama JI, Kohda N, Hirata D, Sato H, Iwamoto M, Mimori A, Takeda A, Minota S, Kano S. Association of interleukin 6 release from endothelial cells and pulmonary hypertension in SLE. *J Rheumatol*. 1997; 24(3):489-95.
18. Alcocer-Varela J, Aleman-Hoey D, Alarcon-Segovia D. Interleukin-1 and interleukin-6 activities are increased in the cerebrospinal fluid of patients with CNS lupus erythematosus and correlate with local late T-cell activation markers. *Lupus*. 1992; 1(2):111-7.
19. Eilertsen GO, Nikolaisen C, Becker-Merok A, Nossent JC. Interleukin-6 promotes arthritis and joint deformation in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011; 20(6):607-13.
20. Crispin JC, Tsokos GC. Interleukin-17-producing T cells in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22(5):499-503.
21. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:485-517.

22. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441(7090):235-8.
23. Graeber KE, Olsen NJ. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. *Inflamm Res*. 2012; 61(2):87-96.
24. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009; 361(9):888-98.
25. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jager A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, Cantor H, Bettelli E, Kuchroo VK. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(32):14292-7.
26. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trollet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Berard N. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2009 10(7):778-85.
27. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol*. 2008; 127(3):385-93.

28. Houssiau FA, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renauld JC. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus*. 1995; 4(5):393-5.
29. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 1998 16(3):283-8.
30. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis*. 2014; 2014: 321359.
31. Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, Gilliam JN. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med*. 1982; 97(5):664-71.
32. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994; 179(4):1317-30.
33. Oke V, Vassilaki I, Espinosa A, Strandberg L, Kuchroo VK, Nyberg F, Wahren-Herlenius M. High Ro52 expression in spontaneous and UV-induced cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(8):2000-10.

34. Wenzel J, Zahn S, Tuting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus*. 2010; 19(9):1020-8.
35. Wilder RL. Neuroimmunoendocrinology of the rheumatic diseases: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 966:13-9.
36. Hench PS, Kendall EC, et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1949; 24(8):181-97.
37. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*. 2003; 56(7):481-90.
38. Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1261:55-63.
39. Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 265-266:143-9.
40. Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ. Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr J*. 1998; 45(1):13-33.

41. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev.* 2000; 80(3):979-1020.
42. Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 885:217-29.
43. Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res.* 1998; 11(5):265-74.
44. Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res.* 1996; 51: 287-317.
45. Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, Garcia-Borrón JC. Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(9):1966-75.
46. Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol.* 1998; 16(4):503-15.
47. Slominski A, Zbytek B, Zmijewski M, Slominski RM, Kauser S, Wortsman J, Tobin DJ. Corticotropin releasing hormone and the skin. *Front Biosci.* 2006; 11:2230-48.

48. Slominski A, Ermak G, Hwang J, Mazurkiewicz J, Corliss D, Eastman A. The expression of proopiomelanocortin (POMC) and of corticotropin releasing hormone receptor (CRH-R) genes in mouse skin. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1289(2):247-51.
49. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2004; 84(4):1155-228.
50. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev*. 2000; 21(5):457-87.
51. Ziegler CG, Krug AW, Zouboulis CC, Bornstein SR. Corticotropin releasing hormone and its function in the skin. *Horm Metab Res*. 2007; 39(2):106-9.
52. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, Wei ET. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J*. 2001; 15(10):1678-93.
53. Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC. Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2009; 160(2):345-52.
54. Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci*. 2002; 70(9):1013-21.

55. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev.* 2013; 34(6):827-84.
56. Kim JE, Cho DH, Kim HS, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Park HJ. Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007; 16(2):104-9.
57. O'Kane M, Murphy EP, Kirby B. The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol.* 2006; 15(3):143-53.
58. Catania A, Airaghi L, Colombo G, Lipton JM. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(8):304-8.
59. Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA. Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol.* 1986; 137(7):2232-6.
60. Hiltz ME, Catania A, Lipton JM. Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha and endogenous pyrogen but not that caused by LTB4, PAF and rIL-8. *Cytokine.* 1992; 4(4):320-8.
61. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1997; 2(1):87-93.

62. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765.
63. Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E. Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290(8):425-8.
64. Namba K, Kitaichi N, Nishida T, Taylor AW. Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(5):946-52.
65. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Slominski A, Roloff B, Luger T, Paus R. Developmentally regulated expression of alpha-MSH and MC-1 receptor in C57BL/6 mouse skin suggests functions beyond pigmentation. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 885:433-9.
66. Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkotter C, Armstrong C, Ansel J. The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917:232-8.
67. Luger TA, Brzoska T. Alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66 Suppl 3:iii52-5.

-
68. Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Abels C, Bohm M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev.* 2008; 29(5):581-602.
 69. Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S. The melanocortin system in control of inflammation. *ScientificWorldJournal.* 2010; 10:1840-53.
 70. Elliott RJ, Szabo M, Wagner MJ, Kemp EH, MacNeil S, Haycock JW. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone, MSH 11-13 KPV and adrenocorticotrophic hormone signalling in human keratinocyte cells. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(4):1010-9.
 71. Andersen GN, Hagglund M, Nagaeva O, Frangsmyr L, Petrovska R, Mincheva-Nilsson L, Wikberg JE. Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opio-melanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leucocytes. *Scand J Immunol.* 2005; 61(3):279-84.
 72. Cooper A, Robinson SJ, Pickard C, Jackson CL, Friedmann PS, Healy E. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status. *J Immunol.* 2005; 175(7):4806-13.

-
73. Grabbe S, Bhardwaj RS, Mahnke K, Simon MM, Schwarz T, Luger TA. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. *J Immunol.* 1996; 156(2):473-8.
 74. Raap U, Brzoska T, Sohl S, Path G, Emmel J, Herz U, Braun A, Luger T, Renz H. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2003; 171(1):353-9.
 75. Han D, Tian Y, Zhang M, Zhou Z, Lu J. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant adeno-associated virus-mediated alpha-melanocyte-stimulating hormone-transduced PLP139-151-specific T cells. *Gene Ther.* 2007; 14(5):383-95.
 76. Min Y, Han D, Fu Z, Wang H, Liu L, Tian Y. Alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced maturation of human dendritic cells in vitro through the up-regulation of ANXA1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011; 43(1):61-8.
 77. Auriemma M, Brzoska T, Klenner L, Kupas V, Goerge T, Voskort M, Zhao Z, Sparwasser T, Luger TA, Loser K. Alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(7):1814-24.
 78. Schwarz T, Schwarz A. DNA repair and cytokine responses. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2009; 14(1):63-6.

-
79. Song X, Mosby N, Yang J, Xu A, Abdel-Malek Z, Kadekaro AL. Alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009; 22(6):809-18.
 80. Kuhn A, Ruland V, Bonsmann G. Photosensitivity, phototesting, and photoprotection in cutaneous lupus erythematosus. *Lupus.* 2010; 19(9):1036-46.
 81. Barnetson RS, Ooi TK, Zhuang L, Halliday GM, Reid CM, Walker PC, Humphrey SM, Kleinig MJ. [Nle4-D-Phe7]-alpha-melanocyte-stimulating hormone significantly increased pigmentation and decreased UV damage in fair-skinned Caucasian volunteers. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(8):1869-78.
 82. Macaluso A, McCoy D, Ceriani G, Watanabe T, Biltz J, Catania A, Lipton JM. Antiinflammatory influences of alpha-MSH molecules: central neurogenic and peripheral actions. *J Neurosci.* 1994; 14(4):2377-82.
 83. Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, Li W, Janjetovic Z, Postlethwaite A, Zouboulis CC, Tuckey RC. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 137:107-23.
 84. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2012; 212: v, vii, 1-115.

-
85. Slominski A, Zbytek B, Semak I, Sweatman T, Wortsman J. CRH stimulates POMC activity and corticosterone production in dermal fibroblasts. *J Neuroimmunol*. 2005; 162(1-2):97-102.
 86. Slominski A, Ermak G, Mihm M. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(7):2746-9.
 87. Takei K, Denda S, Kumamoto J, Denda M. Low environmental humidity induces synthesis and release of cortisol in an epidermal organotypic culture system. *Exp Dermatol*. 2013; 22(10):662-4.
 88. Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol. *FASEB J*. 2005; 19(10):1332-4.
 89. Zhu G, Janjetovic Z, Slominski A. On the role of environmental humidity on cortisol production by epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2014; 23(1):15-7.
 90. Sevilla LM, Latorre V, Sanchis A, Perez P. Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(2):361-70.
 91. Kim JE, Cho BK, Cho DH, Park HJ. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in common skin diseases: evidence of its association with stress-related disease activity. *Acta Derm Venereol*. 2013; 93(2):387-93.

92. Catania A, Airaghi L, Garofalo L, Cutuli M, Lipton JM. The neuropeptide alpha-MSH in HIV infection and other disorders in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:848-56.
93. Airaghi L, Capra R, Pravettoni G, Maggiolo F, Suter F, Lipton JM, Catania A. Elevated concentrations of plasma alpha-melanocyte stimulating hormone are associated with reduced disease progression in HIV-infected patients. *J Lab Clin Med.* 1999; 133(3):309-15.
94. Catania A, Gerloni V, Procaccia S, Airaghi L, Manfredi MG, Lomater C, Grossi L, Lipton JM. The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules. *Neuroimmunomodulation.* 1994; 1(5):321-8.
95. Airaghi L, Lettino M, Manfredi MG, Lipton JM, Catania A. Endogenous cytokine antagonists during myocardial ischemia and thrombolytic therapy. *Am Heart J.* 1995; 130(2):204-11.
96. Airaghi L, Garofalo L, Cutuli MG, Delgado R, Carlin A, Demitri MT, Badalamenti S, Graziani G, Lipton JM, Catania A. Plasma concentrations of alpha-melanocyte-stimulating hormone are elevated in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(8):1212-6.

97. Baumgartl HJ, Standl E, Schmidt-Gayk H, Kolb HJ, Janka HU, Ziegler AG. Changes of vitamin D3 serum concentrations at the onset of immune-mediated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1991; 16(3):145-8.
98. Sandyk R, Awerbuch GI. Nocturnal plasma melatonin and alpha-melanocyte stimulating hormone levels during exacerbation of multiple sclerosis. *Int J Neurosci.* 1992; 67(1-4):173-86.
99. Pinessi L, Rainero I, de Gennaro T, Violante A, Cassano D, Matera L, Cesano A. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of POMC-related peptides in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 650:351-4.
100. Pichler R, Sfetsos K, Badics B, Gutenbrunner S, Aubock J. Vitiligo patients present lower plasma levels of alpha-melanotropin immunoreactivities. *Neuropeptides.* 2006; 40(3):177-83.
101. Sato H, Nagashima Y, Chrousos GP, Ichihashi M, Funasak Y. The expression of corticotropin-releasing hormone in melanoma. *Pigment Cell Res.* 2002; 15(2):98-103.
102. Hasan T, Nyberg F, Stephansson E, Puska P, Hakkinen M, Sarna S, Ros AM, Ranki A. Photosensitivity in lupus erythematosus, UV photoprovocation results compared with history of photosensitivity and clinical findings. *Br J Dermatol.* 1997; 136(5):699-705.

103. Hawker G, Gabriel S, Bombardier C, Goldsmith C, Caron D, Gladman D. A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1993; 20(4):657-60.
104. Clark D, Thody AJ, Shuster S, Bowers H. Immunoreactive alpha-MSH in human plasma in pregnancy. *Nature*. 1978; 273(5658):163-4.
105. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Furuta M, Araki-Sasaki R, Tsuchihashi K, Hori Y, Yano Y, Adachi Y. Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24(10):1260-4.
106. Todd DJ, Knowlton N, Amato M, Frank MB, Schur PH, Izmailova ES, Roubenoff R, Shadick NA, Weinblatt ME, Centola M, Lee DM. Erroneous augmentation of multiplex assay measurements in patients with rheumatoid arthritis due to heterophilic binding by serum rheumatoid factor. *Arthritis Rheum*. 2011; 63(4):894-903.
107. Esparza RH, Swaak T, Aarden L, Smeenk R. Complement-fixing antibodies to dsDNA detected by the immunofluorescence technique on *Crithidia luciliae*. A critical appraisal. *J Rheumatol*. 1985; 12(6):1109-17.
108. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol*. 1984; 132(5):2350-6.
109. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum*. 1976; 19(3):574-80.

110. Moore GE, Hoenig M. Duration of pituitary and adrenocortical suppression after long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am J Vet Res.* 1992; 53(5):716-20.
111. Cakir I, Cyr NE, Perello M, Litvinov BP, Romero A, Stuart RC, Nillni EA. Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J Biol Chem.* 2013; 288(24):17675-88.
112. Kontos AP, Jirsari M, Jacobsen G, Fivenson DP. Immunoglobulin M predominance in cutaneous lupus erythematosus. *J Cutan Pathol.* 2005; 32(5):352-5.
113. Bernstein JE, Soltani K, Cristancho N, Aronson AJ. Prognostic implications of cutaneous immunoglobulin deposits in systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol.* 1983; 22(1):29-34.
114. Maczynska I, Millo B, Ratajczak-Stefanska V, Maleszka R, Szych Z, Kurpisz M, Giedrys-Kalemba S. Proinflammatory cytokine (IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-18 and TNF-alpha) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). *Immunol Lett.* 2006; 102(1):79-82.
115. Oh SH, Roh HJ, Kwon JE, Lee SH, Kim JY, Choi HJ, Lim BJ. Expression of interleukin-17 is correlated with interferon-alpha expression in cutaneous lesions of lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol.* 2011; 36(5):512-20.

-
116. Braunstein I, Klein R, Okawa J, Werth VP. The interferon-regulated gene signature is elevated in subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus and correlates with the cutaneous lupus area and severity index score. *Br J Dermatol*. 2012; 166(5):971-5.
117. Maidana P, Bruno OD, Mesch V. A critical analysis of cortisol measurements: an update. *Medicina (B Aires)*. 2013; 73(6):579-84.
118. Tsang AH, Barclay JL, Oster H. Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol*. 2014; 52(1):R1-16.
119. Slominski A, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J. Metabolism of progesterone to DOC, corticosterone and 18OHDOC in cultured human melanoma cells. *FEBS Lett*. 1999; 455(3):364-6.
120. Slominski A, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J. Active steroidogenesis in the normal rat skin. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1474(1):1-4.
121. Rogoff D, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J, Slominski A. Steroidogenesis in the human skin: 21-hydroxylation in cultured keratinocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 78(1):77-81.

APÊNDICE

Apêndice A - Artigo

Thank you for submitting your manuscript to *Lupus*.

Manuscript ID: LUP-14-414

Title: Increased corticotropin-releasing hormone (CRH) expression in cutaneous lupus lesions

SCHMITZ, MONIQUE

Botta, Domingos

Authors: Sotto, Mirian

Borba, Eduardo

Bonfá, Eloisa

Mello, Suzana

Date Submitted: 23-Sep-2014

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents [#7,257,767](#) and [#7,263,655](#).

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

LUPUS

**Increased corticotropin-releasing hormone (CRH)
expression in cutaneous lupus lesions**

Journal:	<i>Lupus</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	SCHMITZ, MONIQUE; University of São Paulo, Rheumatology Division, Department of Internal Medicine Botte, Domingos; University of São Paulo, Rheumatology Division, Department of Internal Medicine Sotto, Mirian; University of São Paulo, Dermatology Borba, Eduardo; University of São Paulo, Rheumatology Division, Department of Internal Medicine Bonfá, Eloisa; University of São Paulo, Rheumatology Division, Department of Internal Medicine Mello, Suzana; University of São Paulo, Reumatology Division/Internal Medicine
Keyword:	Cutaneous Lupus, cytokines, α -melanocyte stimulating hormone , Corticotropin-releasing hormone
Abstract:	Objective. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and pro-opiomelanocortin (POMC) axis activation leads to the production of hormones, such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). Data regarding the role of these hormones in systemic lupus erythematosus (SLE) are scarce. In the present study we aim to evaluate the participation of this axis in the cutaneous involvement of SLE. Methods. 17 SLE patients were clinically evaluated, and biopsies from affected and unaffected skin of these patients were compared with 17 healthy subjects. Immunohistochemical for CRH, ACTH, α -MSH, and MC-1R were performed, and the serum levels of α -MSH, IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , and IFN- γ were measured. Results: The affected skin of the SLE patients exhibited higher CRH expression in the deep dermis compared to the skin of the control subjects ($p=0.024$), whereas the tissue expression of ACTH, cortisol, α -MSH and its receptor MC-1R were comparable in SLE patients and controls. Higher serum levels of IFN- γ ($p=0.041$), TNF- α ($p=0.001$) and IL-6 ($p=0.049$) were observed in SLE patients compared with control subjects, while α -MSH levels were similar in both groups. Conclusion. The novel finding of elevated CRH expression solely in the affected skin deep dermis supports the notion of a cutaneous local dysfunction of the CRH-POMC axis in the pathogenesis of cutaneous SLE lesions.

<http://mc.manuscriptcentral.com/lupus>

Page 1 of 27

LUPUS

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

<http://mc.manuscriptcentral.com/lupus>

Increased corticotropin-releasing hormone (CRH) expression in cutaneous lupus lesions

MK Schmitz¹, DA Botte¹, MN Sotto², EF Borba¹, E Bonfa¹ and SBV de Mello^{1*}

¹Department of Internal Medicine, Rheumatology Division, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ²Department of Dermatology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

*Correspondence to: Suzana Beatriz Veríssimo, Avenida Dr. Arnaldo, 455, São Paulo- SP, 0124-6903, Brazil. Phone number 55-011-30617200, fax 55-011-30617200. E-mail: svmello@usp.br

Abstract

Objective. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and pro-opiomelanocortin (POMC) axis activation leads to the production of hormones, such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). Data regarding the role of these hormones in systemic lupus erythematosus (SLE) are scarce. In the present study we aim to evaluate the participation of this axis in the cutaneous involvement of SLE. **Methods.** 17 SLE patients were clinically evaluated, and biopsies from affected and unaffected skin of these patients were compared with 17 healthy subjects. Immunohistochemical for CRH, ACTH, α -MSH, and MC-1R were performed, and the serum levels of α -MSH, IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , and IFN- γ were measured. **Results:** The affected skin of the SLE patients exhibited higher CRH expression in the deep dermis compared to the skin of the control subjects ($p=0.024$), whereas the tissue expression of ACTH, cortisol, α -MSH and its receptor MC-1R were comparable in SLE patients and controls. Higher serum levels of IFN- γ ($p=0.041$), TNF- α ($p=0.001$) and IL-6 ($p=0.049$) were observed in SLE patients compared with control subjects, while α -MSH levels were similar in both groups. **Conclusion.** The novel finding of elevated CRH expression solely in the affected skin deep dermis supports the notion of a cutaneous local dysfunction of the CRH-POMC axis in the pathogenesis of cutaneous SLE lesions.

Key Words: Corticotropin-releasing hormone, pro-opiomelanocortin (POMC) axis, systemic lupus erythematosus, skin

Introduction

The melanocortin (MC) system represents one of the best-characterized neuropeptide networks in the human skin and is involved in the regulation of several processes, including the inflammatory response. This system is derived from pro-opiomelanocortin (POMC), a complex source of important active substances.¹ The activation of the corticotropin-releasing hormone (CRH)-POMC axis starts with the hypothalamic production of CRH. In the anterior pituitary these hormone activate type I receptors leading to the production of POMC derived peptides such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), and β -endorphins.²

CRH is also synthesized outside of the hypothalamus in the adrenal glands, gonads, placenta, gastrointestinal tract, pancreas, and skin.^{3,4} In the skin, tissue CRH seems to be able to control several homeostatic functions, acting as a pro-inflammatory molecule⁵ via NF κ B.⁶ In fact, CRH affects cytokine production in human keratinocytes stimulating interleukin-6 (IL-6) and IL-11 secretion.⁷ This hormone was identified to be highly expressed in acne vulgaris⁸ and in psoriasis skin lesions⁹, supporting the role of CRH in the etiology of inflammatory skin disorders.

Counterbalancing this effect, α -MSH has been suggested as a potent anti-inflammatory protein with a relevant role in innate immunity.¹⁰ In keratinocytes, the binding of α -MSH to its MC-receptor leads to the inhibition of several pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-6, as well as chemokines IL-8, IFN γ and TNF- α .^{11,12,13}

With regard to neuropeptide production, researchers have shown that under stress, synthesis also occurs in sites other than the pituitary gland, including the skin.³ In fact, keratinocytes and melanocytes appear to be a major extra-glandular sources of these peptides,^{14,15} and their effects are mediated by five melanocortin receptors (MC-1R - MC-5R).¹⁶ Additionally, these peptides produced in the epidermis and dermis are up-regulated by exposure to ultraviolet radiation (UVR),^{17,18} a well-recognized aggravating factor of cutaneous lupus.¹⁸

In systemic lupus erythematosus (SLE), the prototype of an autoimmune disease with a high frequency of skin involvement,¹⁹ there are no data concerning the possible roles of CRH and MCs in the physiopathology of SLE's cutaneous lesions. Thus, the aim of the present study was to evaluate if CRH and POMC axis activation underlies the cutaneous inflammatory response in lupus patients.

Materials and methods

Patients

Seventeen female SLE patients with cutaneous involvement (sub-acute lupus) from the Lupus Outpatient Clinics of the Rheumatology Division, School of Medicine of São Paulo University, were included in this study between January 2010 and January 2012. All patients fulfilled the classification criteria of the American College of Rheumatology (ACR) for SLE²⁰ and were regularly followed at the lupus clinic. Upon entry, all SLE patients had the onset or worsening of skin lesions that were assessed by two physicians. Disease duration was defined from the time of SLE diagnosis, which was ascertained by established classification criteria.²⁰ Seventeen female, healthy controls were also included in the study.

The patient's medical records were carefully reviewed for demographic, clinical, laboratory and therapeutic parameters. Clinical manifestations of SLE were defined as follows: cutaneous disease (malar or discoid rash, mucosal ulcers, or photosensitivity), renal involvement (proteinuria ≥ 0.5 g/24 h, presence of cellular casts, hematuria with > 10 red blood cells/hpf excluding, during an infection or plasma creatinine ≥ 1.4 mg%), articular involvement (non-erosive arthritis affecting two or more peripheral joints), neuropsychiatric disease (psychosis, seizure depression and peripheral neuropathy), pulmonary disease (pleuritis, pneumonitis), and hematologic complications (hemolytic anemia, leukopenia with a white blood cell count $\leq 4000/\text{mm}^3$ or lymphopenia $\leq 1500/$

mm³ on two or more occasions or thrombocytopenia with platelet count $\leq 100,000/\text{mm}^3$, in the absence of drugs). Disease activity was defined according to the SLE Disease Activity Index (SLEDAI).²¹

Exclusion criteria included the use of drugs and factors that could interfere in the production of melanocortins: beta-blockers and clonidine,¹⁰ pregnancy,²² history of acute infections in the last 6 months (9), previous myocardial infarction,²³ positive HIV,²³ other rheumatic or inflammatory diseases,^{9, 22} body mass index (BMI) $> 30 \text{ kg/m}^2$,²⁴ dermatitis (acne grade III and IV), and prednisone dose $> 15 \text{ mg/d}$. Patients with rheumatoid factor (RF) were also excluded because antibody-based immunoassays have risk of giving false-positive results due to binding of heterophilic antibodies.²⁵

The local Ethical Committee approved the study, and written informed consent was obtained from all subjects (CAPPesq in 0612/09).

Study protocol

Upon enrollment, punch biopsies (4 mm size) of affected skin (limbs) and unaffected skin (back) were obtained from all of the SLE patients. Control biopsies were obtained from the limbs of all the healthy subjects. No significant adverse effects were observed in any of the patients or the controls, after this procedure. Blood samples were collected from both groups of subjects at the time of biopsy.

Laboratory parameters

Detection of autoantibodies

Antinuclear and anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies were detected by indirect immunofluorescence using as substrates HEp-2 cells and *Crithidia luciliae*, respectively.²⁶ A hemagglutination assay with rabbit thymus extract was used to determine the presence of antibodies to RNP and Sm proteins. Detection of autoantibodies to Ro (SS-A) and La (SS-B) proteins was performed by counterimmunoelectrophoresis using as a substrate dog spleen saline extract.^{27,28} Autoantibodies analyses occurred at the same time as the clinical evaluation.

Serum cytokines

Cytokine serum levels (IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , IFN- γ) were evaluated by multiplex bead-based immunoassay (Millipore, MA, USA). Briefly, serum samples were incubated overnight (16-18 hr) at 4°C with anti-cytokine antibody-coupled beads. After washing, beads were incubated with biotinylated detection antibodies for 60 min. After this incubation streptavidin-phycoerythrin was added for 30 min. After washing, sheath fluid was added and the mean fluorescence was evaluated. Data were expressed in pg/mL of serum.

Cortisol, ACTH and α -MSH levels

The plasma concentration of ACTH was determined by immunochemiluminometric assay. Blood was collected in the morning and 25 μ L of NOR (enzyme inhibitor) was added to prevent degradation of the molecule. The plasma sample was kept frozen at below -8°C. Serum Cortisol was determined by the chemoluminoassay (DPC Immulite, Brazil).

The α -MSH serum levels were determined using a multiplex system, (HNP-35K kit, Millipore, Billerica, MA, USA). The protocol included an extraction of samples through acetonitrile precipitation. After reconstitution of samples with assay buffer, primary antibody (HNP-1035P) was added and incubated at room temperature for 2 hours. Then, beads were added to each well and incubated overnight (16-18 h) at 4°C. Subsequently, two washes were performed and the detection antibody (HNP-1035D) was added. Another incubation of 1 hour at room temperature was made before Streptavidin-phycoerythrin was added for 30 min. After two washes, sheath fluid was placed and read on Luminex (50 bead/ bead set). Data were expressed as pg/mL of serum.

Skin analysis

Direct Immunofluorescence: IgG, IgA, IgM and C3

Biopsy fragments with cryoprotectant were stored in the freezer at -20°C. In cryostat -20°C, the skin's fragment was cut and adhered to 4 μ silanized slide (3 cuts per blade). The sections were conjugate (anti-human immunoglobulin produced in the immunized animal and associated with a fluorochrome = FITC conjugate) diluted in Evans Blue. The conjugates anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM and anti-C3c (Sigma Aldrich, USA) were used. Incubation with each conjugate was performed at room temperature for 30 minutes in a humid chamber that was protected from light. Subsequently, the slides were washed in TBS (Trizma base buffer with calcium chloride) pH 7.5 for 20 minutes. The reading was performed in a HBO 50 W fluorescent microscope (CB12 filter) with 10X eyepieces and objective 16X and 40X.

Immunohistochemical evaluation of skin tissue

All of the tissue specimens obtained by punch biopsies were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and sectioned at 4 μm . The expression of ACTH (ab 49585), CRH peptide (H-019-06), α -MSH (H-043-01) and the α -MSH receptor MC-1R (ABIN 686287) were evaluated. The positive controls for these antigens were pituitary for ACTH and hypothalamic fragments for CRH, MC-1R and α -MSH. Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with PBS.

Slides were de-waxed in xylene and hydrated through a graded series of ethanol. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide. Antigen retrieval for ACTH, CRH, α -MSH, MC-1R was performed by incubation of slides in 250 mL TE buffer (10 mmol L⁻¹ Tris, 1 mmol L⁻¹ ethylenediamine tetraacetic acid, pH 9.0) in a water bath for 25 min at 95 °C. They were then incubated overnight at 4 °C in the presence of a 1:200 dilution of monoclonal anti-ACTH primary antibody (Abcam, Cambridge, UK, a 1:250 dilution of polyclonal anti-CRH primary antibody (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA), a 1:250 dilution of polyclonal anti- α -MSH primary antibody (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, U.S.A.) and a 1:400 dilution of polyclonal anti-MC-1R primary antibody (Antibodies-online Inc., Atlanta, GA, U.S.A.). The specific antigen-antibody reaction was detected with a streptavidin-biotin-peroxidase-based system according to the manufacturer's instructions (LSAB[®]+ system-HRP; DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A.) for anti- ACTH primary antibody and with a non-biotin-peroxidase-based system (ADVANCE[™]+ system-HRP; DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A.) for anti-CRH, anti- α -MSH and anti-MC-1R primary antibodies. The reactions were

visualized using the 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) chromogen (Sigma) and counterstained with Carazzi hematoxylin.

Analysis of the immunohistochemical staining

The slides were digitally archived using a Panoramic Scan instrument (software version 1.11.25.0, 3DHitech, Budapest, Hungary) with a 20x objective and expanded focus..

ACTH, MC-1R, α -MSH and CRH expression in the epidermis and dermis was performed using Image-Pro Plus 4.1 for Windows software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Expression of MC-1R was determined as stained positive area by total area (μm^2). Positive stained areas were quantified by threshold color. These procedures generate a file that contains all color data selection, which were then applied to the stained samples antibody.

The CRH and α -MSH stained cells were manually counted in total epidermis and superficial dermis and in 10 sequential areas of deep dermis.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SD. Within-group comparisons were analyzed by Student's t test or Mann-Whitney rank sum test. Correlations were expressed using the Spearman's rank correlation coefficient. The Kruskal-Wallis test was used to evaluate the expression of markers in the skin. Values of two-tailed p under 0.05 were considered significant.

Results

Clinical features

SLE patients had a similar mean age (43.0 ± 10.9 vs. 41.0 ± 13.9 years; $p=0.65$), BMI (26.0 ± 3.1 vs. 24.8 ± 2.9 Kg/m²; $p=0.27$) and frequency of menopause (47.0% vs. 37.5%; $p=0.73$) when compared to controls (Table 1).

The mean disease duration was 15.4 ± 8.7 years. All patients had a previous history of cutaneous and articular involvement, 50% had hematological involvement, 31.2% had renal and nervous system manifestations, and 25% had serositis. After the skin biopsy, all patients and controls were followed, without presenting any clinical consequences.

At entry, the mean SLEDAI score was 7.8 ± 5.3 and approximately one quarter of the patients had positive anti-dsDNA and anti Ro/SS-A antibodies and nearly 40% had low C3/C4 levels (Table 1).

Approximately half of the lupus patients (47.0%) were taking azathioprine, 76.5% were taking prednisone (mean dose of 5.9 ± 4.6 mg/day) and 52,9% were taking an antimalarial.

Serum levels of cytokines

SLE patients with cutaneous involvement had higher serum levels of IFN- γ (21.0 ± 7.1 vs. 5.2 ± 1.5 pg/ml, $p=0.041$), TNF- α (18.6 ± 2.8 vs. 5.7 ± 0.4 pg/ml, $p=0.001$) and IL-6 (5.4 ± 2.5 vs. 1.7 ± 1.2 pg/ml, $p=0.049$), compared to healthy controls (Table 2). The apparent higher levels of IL-17 in SLE patients did not reach statistical significance (5.7 ± 2.0 vs. 1.3 ± 0.4 pg/ml, $p=0.099$). The levels of IL-10, IL-1 β , IL1-ra and IL-12p70 were undetectable in the blood samples of both groups.

Cortisol, ACTH and α -MSH serum levels

SLE patients and controls had similar plasma values for ACTH (25.6 ± 43.7 vs. 16.7 ± 11.9 pg/mL, $p=0.92$) and morning levels of cortisol (7.2 ± 5.6 vs. 10.1 ± 3.8 μ g/mL, $p=0.07$). The mean values of α -MSH were also comparable in the SLE patients and health controls (194.1 ± 28.0 vs. 181.5 ± 14.6 pg/mL; $p=0.70$).

Characterization of skin lesion by direct immunofluorescence (DIF)

As shown in Figure 1a, the most detected immunoglobulin in affected lupus skin was IgM (88.2%), followed by IgG (52.9%). IgA and C3 were detected in 17.6% and 23.5% of the cases, respectively. All patients expressed at least one marker. Healthy controls did not express immunoglobulins or C3 (Figure 1b). Figure 1c depicts the pattern of IgM positive skin.

Skin immunohistochemical analysis (ACTH, CRH, α -MSH and MC-1R)

Immunohistochemical analysis of affected deep dermis skin, unaffected skin and healthy skin revealed a distinct pattern ($p=0.024$), with a higher CRH expression in the deep dermis of affected skin (Figure 2). In contrast, no significant difference regarding CRH expression in the epidermis was observed comparing affected and unaffected skin of the SLE patients and health skin ($p=0.353$).

There was no difference in the tissue expression of α -MSH in the affected skin and unaffected skin of SLE patients and the skin of healthy controls in the epidermis ($p=0.388$) or deep dermis ($p=0.6074$). The same occurred for the MC-1R in the epidermis ($p=0.383$) and deep dermis ($p=0.962$).

Discussion

The present study provides novel evidence that cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis hormones may play a role in the pathogenesis of cutaneous SLE involvement.

The greatest advantage of this study was the strict selection criteria, excluding patients using drugs such as beta-blockers or clonidine that could interfere with the synthesis of melanocortins.¹⁰ We were also careful to exclude patients taking high glucocorticoid doses because it may have had a deleterious effect on the HPA axis.²⁹ Patients with BMI > 30 Kg/m² were not included because α -MSH is altered in obese individuals.³⁰ Other inflammatory or infectious conditions that could interfere in the melanocortin system, were also exclusion criteria.^{10, 23}

The clinical diagnosis of an SLE skin lesion was further confirmed in all patients by immunofluorescence assay for IgG, IgA, IgM and C3 tissue expression.³¹

Additionally, higher serum levels of pro-inflammatory cytokines were detected in SLE patients when compared to healthy subjects, which supports the notion of overall lupus activity. In fact, increased levels of TNF- α ^{32, 33} and IL-6^{34, 35} were reported to be positively correlated with lupus disease activity.

Concerning the skin lesions, specifically, we observed in human idiopathic lupus, a previous human and experimental study of drug-induced cutaneous lupus that identified increased IFN- γ expression.³⁶ Reinforcing this finding, patients with skin involvement, such as subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) and discoid lupus erythematosus (DLE), were reported to have an IFN signature, and the level of IFN gene expression correlated with the cutaneous disease activity.³⁷

However, the most striking finding of this study was the discovery that the affected skin of lupus patients exhibited high CRH expression. This observation emphasizes the potential relevance of the neuro-immuno-endocrine system in the underlying physiopathology of lupus cutaneous involvement, which is also reported for other skin disorders.^{6,38,39} In fact, patients with psoriasis, melanoma, and acne vulgaris also had increased CRH expression.^{8,9,40}

In one psoriasis study, CRH assessment was limited to the epidermis and skin on the appendages, and the results showed a significant increase in CRH expression.⁹ A more broad evaluation of CRH expression revealed that this alteration was not limited to the epidermis and simultaneously affected the dermal vasculature.⁴¹ Conversely, the immunohistochemical pattern for ACTH and α -MSH from the same tissue areas was unaltered⁹. A strong expression of CRH was observed in the sebaceous gland (SG) cells of skin affected by acne vulgaris compared to the weaker expression in non-affected and normal skin SG cells.⁸ Additionally, in their study of melanoma, Sato and colleagues found that CRH induced POMC mRNA expression, an effect that was inhibited by a CRH antagonist. This finding reinforces the existence of CRH/POMC axis modulation in a pigmented lesion.

Another neuropeptide that may contribute to the pathogenesis of several skin diseases is α -MSH.^{42,43} This hormone and its receptors contribute to cutaneous neuro-immuno-modulation in response to ultraviolet light and other skin-damaging stimuli.⁴⁴ The comparable expression of α -MSH and its receptor MC-1R in the skin lesions of SLE patients and controls subjects suggests that α -MSH does not have a major role in controlling lupus skin lesions.

Although there is a tendency to lower levels of cortisol in the serum of patients with SLE, there was a large variability between individual values. This variability is attributed to changes in the circadian rhythm of cortisol inherent in each individual.^{45,46} A number of studies show that skin and skin cells can produce deoxycorticosterone, corticosterone and cortisol *in situ*⁴⁷⁻⁵⁰ in response to different stimuli and stress. Furthermore, it was recently reported that the production of cortisol in response to cutaneous low humidity of the skin is associated with the involvement of IL1 β .^{51,52} This study points to the importance of evaluating also the production of glucocorticoids in the skin, which constitutes a challenge for future research in SLE.

In conclusion, the finding of increased expression of CRH in the deep dermis of patients with cutaneous lupus activity supports the participation of peripheral CRH-POMC axis in the pathogenesis of SLE skin lesions.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to thank Maria de Fátima de Almeida and Maria Aurora Gomes da Silva, Sandra Dias dos Santos and Neide Silva Fernandes for technical assistance. Dr Valeria Aoki, Lígia M.I. Fukumori and Alexandre M. Périgo contributed to the direct immunofluorescence analyses. This work was supported by a FAPESP grant # 09/54549-8 to SBVM, a CNPq grant # 301411/2009-3 to EB and a Federico Foundation Grant to EB.

References

1. Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266:143-149.
2. Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ. Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr J* 1998; 45: 13-33.
3. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 2000; 80: 979-1020.
4. Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, *et al.* Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J* 2001; 15: 1678-1693.
5. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev* 2013; 34: 827-884.
6. Ganceviciene R, Graziene V, Fimmel S, Zouboulis CC. Involvement of the corticotropin-releasing hormone system in the pathogenesis of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2009; 160: 345-352.
7. Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci* 2002; 70: 1013-1021.
8. Ganceviciene R, Bohm M, Fimmel S, Zouboulis CC. The role of neuropeptides in the multifactorial pathogenesis of acne vulgaris. *Dermatoendocrinol* 2009; 1: 170-176.

9. Kim JE, Cho DH, Kim HS, *et al.* Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. *Exp Dermatol* 2007; 16: 104-109.
10. Catania A, Airaghi L, Colombo G, Lipton JM. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 304-308.
11. Cannon JG, Tatoo JB, Reichlin S, Dinarello CA. Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol* 1986; 137: 2232-2236.
12. Hiltz ME, Catania A, Lipton JM. Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha and endogenous pyrogen but not that caused by LTB4, PAF and rIL-8. *Cytokine* 1992; 4: 320-328.
13. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 87-93.
14. Slominski A, Paus R, Wortsman J. On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 93: C1-C6.
15. Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 885: 217-229.
16. Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 1998; 11: 265-274.

17. Cone RD, Lu D, Koppula S, *et al.* The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 287-317; discussion 8.
18. Wenzel J, Zahn S, Tuting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus* 2010; 19: 1020-1028.
19. Hasan T, Nyberg F, Stephansson E, *et al.* Photosensitivity in lupus erythematosus, UV photoprovocation results compared with history of photosensitivity and clinical findings. *Br J Dermatol* 1997; 136: 699-705.
20. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
21. Hawker G, Gabriel S, Bombardier C, Goldsmith C, Caron D, Gladman D. A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993; 20: 657-660.
22. Clark D, Thody AJ, Shuster S, Bowers H. Immunoreactive alpha-MSH in human plasma in pregnancy. *Nature* 1978; 273: 163-164.
23. Catania A, Airaghi L, Garofalo L, Cutuli M, Lipton JM. The neuropeptide alpha-MSH in HIV infection and other disorders in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 848-856.
24. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, *et al.* Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1260-1264.

LUPUS

Page 20 of 27

19

25. Todd DJ, Knowlton N, Amato M, *et al.* Erroneous augmentation of multiplex assay measurements in patients with rheumatoid arthritis due to heterophilic binding by serum rheumatoid factor. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 894-903.
26. Esparza RH, Swaak T, Aarden L, Smeenk R. Complement-fixing antibodies to dsDNA detected by the immunofluorescence technique on *Crithidia lucillae*. A critical appraisal. *J Rheumatol* 1985; 12: 1109-1117.
27. Elkon KB, Culhane L. Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J Immunol* 1984; 132: 2350-2356.
28. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1976; 19: 574-580.
29. Moore GE, Hoenig M. Duration of pituitary and adrenocortical suppression after long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am J Vet Res* 1992; 53: 716-720.
30. Cakir I, Cyr NE, Perello M, *et al.* Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J Biol Chem* 2013; 288: 17675-17688.
31. Kontos AP, Jirsari M, Jacobsen G, Fivenson DP. Immunoglobulin M predominance in cutaneous lupus erythematosus. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 352-355.
32. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol* 2011. 38: 839-849.

33. Maczynska I, Millo B, Ratajczak-Stefanska V, *et al.* Proinflammatory cytokine (IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-18 and TNF-alpha) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). *Immunol Lett* 2006; 102: 79-82.
34. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000; 18: 565-570.
35. Chun HY, Chung JW, Kim HA, *et al.* Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2007; 27: 461-466.
36. Yoshimasu T, Nishide T, Seo N, *et al.* Susceptibility of T cell receptor-alpha chain knock-out mice to ultraviolet B light and fluorouracil: a novel model for drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 245-254.
37. Braunstein I, Klein R, Okawa J, Werth VP. The interferon-regulated gene signature is elevated in subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus and correlates with the cutaneous lupus area and severity index score. *Br J Dermatol* 2012; 166: 971-975.
38. Kim JE, Cho BK, Cho DH, Park HJ. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in common skin diseases: evidence of its association with stress-related disease activity. *Acta Derm Venereol* 2013; 93: 387-393.
39. Pichler R, Sfetsos K, Badics B, Gutenbrunner S, Aubock J. Vitiligo patients present lower plasma levels of alpha-melanotropin immunoreactivities. *Neuropeptides* 2006; 40: 177-183.

40. Sato H, Nagashima Y, Chrousos GP, Ichihashi M, Funasak Y. The expression of corticotropin-releasing hormone in melanoma. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 98-103.
41. O'Kane M, Murphy EP, Kirby B. The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol* 2006; 15:143-153.
42. Bohm M, Luger TA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone. Its current significance for dermatology. *Hautarzt* 2004; 55: 436-445.
43. Catania A, Gerloni V, Procaccia S, *et al.* The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules. *Neuroimmunomodulation* 1994; 1: 321-328.
44. Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol* 1998; 16: 503-515.
45. Maidana P, Bruno OD, Mesch V. [A critical analysis of cortisol measurements: an update]. *Medicina (B Aires)* 2013; 73: 579-584.
46. Tsang AH, Barclay JL, Oster H. Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol* 2014; 52: R1-16.
47. Slominski A, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J. Metabolism of progesterone to DOC, corticosterone and 18OHDOC in cultured human melanoma cells. *FEBS Lett* 1999; 455: 364-366.
48. Slominski A, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J. Active steroidogenesis in the normal rat skin. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1474: 1-4.

- 1
2
3 49. Rogoff D, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, Wortsman J, Slominski A.
4
5 Steroidogenesis in the human skin: 21-hydroxylation in cultured
6
7 keratinocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78: 77-81.
8
9
10 50. Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM,
11
12 Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global
13
14 homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell*
15
16 *Biol* 2012; 212: v, vii, 1-115.
17
18
19 51. Takei K, Denda S, Kumamoto J, Denda M. Low environmental humidity
20
21 induces synthesis and release of cortisol in an epidermal organotypic
22
23 culture system. *Exp Dermatol* 2013; 22: 662-664.
24
25
26
27 52. Zhu G, Janjetovic Z, Slominski A. On the role of environmental humidity
28
29 on cortisol production by epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol* 2014; 23:
30
31 15-17.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Direct immunofluorescence (IgM, IgG, IgA and C3) of skin biopsies. Panel **1a**, Frequency of positive immunofluorescence of the 17 SLE patients with affected skin; **1b**, Representative pattern of negative fluorescence of IgM of a healthy control skin and **1c**, the positive pattern of IgM direct fluorescence of a skin of an affected lupus patient.

Figure 2. Expression of CRH in the epidermis and deep dermis in the skin of patients with SLE with skin involvement and controls. The results are expressed as median. * $p < 0,05$

Table 1. Demographic, clinical and laboratory data of SLE patients with cutaneous manifestations and of healthy control subjects

Parameters	SLE (n=17)	Controls (n=17)	p
Age, yrs.	43.0 ± 10.9	41.0 ± 13.9	0.65
Body mass index, Kg/m ²	26.0 ± 3.1	24.8 ± 2.9	0.27
Menopause (%)	47.0	37.5	0.73
Disease duration, yrs.	15.4 ± 8.7	—	
SLEDAI	7.8 ± 5.3	—	
ANA- positive (%)	100.0	—	
Anti-dsDNA-positive (%)	23.5	—	
Anti-Sm positive (%)	11.8	—	
Anti-ENA positive (%)	29.4	—	
Anti-Ro positive (%)	23.5	—	
Anti-La positive (%)	5.9	—	
Anti-P positive (%)	23.5	—	
Low C3, mg/l, mean (%)	37.3	—	
Low C4, mg/l, mean (%)	43.7	—	
Simultaneous low C3 and C4 (%)	29.4	—	

Values expressed in mean ± SD or percentages. Abbreviations: SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index); ANA (antinuclear antibodies)

LUPUS

Page 26 of 27

25

Table 2. Cytokine levels in SLE patients with cutaneous involvement and in healthy controls.

Cytokine	SLE (n=17)	Controls (n=17)	p
IL-6 (pg/mL)	5.4 ± 2.5	1.7 ± 1.2	0.049
IFN-γ (pg/mL)	21.0 ± 7.1	5.2 ± 1.5	0.041
IL-17 (pg/mL)	5.7 ± 2.0	1.3 ± 0.4	0.099
TNF-α (pg/mL)	18.6 ± 2.8	5.7 ± 0.4	0.001

Results were expressed as the mean ± SE. IL-6= Interleukin 6, IFN-γ= Interferon γ, IL-17= Interleukin 7 and TNF-α= Tumor necrosis factor-α

Page 27 of 27

LUPUS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

A	% of positive SLE patients	B
IgG	52.94
IgM	88.23	
IgA	17.64	
C3	23.52	

Direct immunofluorescence (IgM, IgG, IgA and C3) of skin biopsies. Panel 1a, Frequency of positive immunofluorescence of the 17 SLE patients with affected skin; 1b, Representative pattern of negative fluorescence of IgM of a healthy control skin and 1c, the positive pattern of IgM direct fluorescence of a skin of an affected lupus patient.
254x190mm (300 x 300 DPI)

LUPUS

Page 28 of 27

Expression of CRH in the epidermis and deep dermis in the skin of patients with SLE with skin involvement and controls. The results are expressed as median. * $p < 0,05$
254x190mm (300 x 300 DPI)