



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RACHEL DE PAULA SANTOS RIBEIRO

Associação do Vitiligo com doenças infecciosas na cidade de
Goiânia.

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: Rachel de Paula Santos Ribeiro

Título do trabalho: Associação do vitiligo com doenças infecciosas na cidade de Goiânia.

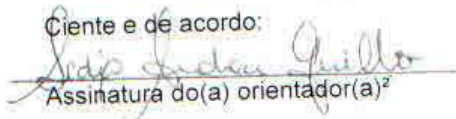
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 24/11/2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

RACHEL DE PAULA SANTOS RIBEIRO

Associação do Vitiligo com doenças infecciosas na cidade de
Goiânia.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.Dra Lídia Andreu Gillo

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Rachel de Paula Santos
Associação do Vitiligo com doenças infecciosas na cidade de Goiânia
[manuscrito] / Rachel de Paula Santos Ribeiro. - 2017.
f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Vitiligo. 2. Doenças infecciosas. 3. Autoimunidade. 4. Herpes Vírus. 5. Toxoplasmose. I. Guillo, Lidia Andreu, orient. II. Título.

CDU 61

Ata de **Defesa de Dissertação de Mestrado** realizada por **Rachel de Paula Santos Ribeiro**. **Aos vinte e seis dias do mês outubro de 2017, às 13:00 horas**, reuniu-se no **Miniauditório do Instituto de Física/UFG**, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Associação do vitiligo com doenças infecciosas na cidade de Goiânia**", como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Mestre**, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra a candidata, para exposição em até **50 minutos** do seu trabalho. A seguir, a senhora Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **aprovado(a) ou reprovado(a)**.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo - Presidente
Profa. Dra. Erika Regina Leal de Freitas - Membro
Profa. Dra. Débora Pereira Santana Ramos - Membro
Prof. Dr. Augusto Ribeiro Gabriel - Suplente

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Rachel De Paula Santos Ribeiro** **Habilitada** () **Não habilitada**. Nada mais havendo a tratar, eu, **Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Profa. Dra. Lidia Andreu Guillo - Presidente
Profa. Dra. Erika Regina Leal de Freitas - Membro
Profa. Dra. Débora Pereira Santana Ramos - Membro
Prof. Dr. Augusto Ribeiro Gabriel - Suplente

Lidia Andreu Guillo
[Assinatura]
Débora - PS Ramos

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Rachel de Paula Santos Ribeiro
Rachel de Paula Santos Ribeiro

Dedico este trabalho...

Primeiramente a Deus, por permitir que tudo acontecesse. Aos meus pais por proporcionarem condições amorosas e financeiras para seguir a caminhada. Ao meu esposo que sempre é o meu para-raios nas horas de nervosismo e cansaço. Aos meus filhos que me inspiram sempre querer mais.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Hilcey Carmen Rodrigues Costa, médica homeopata, do Hospital de Medicina Alternativa do Estado de Goiás, pelo suporte clínico.

Aos demais funcionários do Hospital de Medicina Alternativa do Estado de Goiás pela paciência e contribuição logística.

Á minha orientadora e aos colegas de mestrado pelas críticas, observações e apoio na execução das atividades acadêmicas.

À Santa Casa de Misericórdia de Goiânia pelo incentivo a Pós Graduação e aos funcionários que contribuíram em parte pelo projeto.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás.

Ao Laboratório Hemolabor por permitir minha ausência para conclusão do Mestrado.

Aos meus irmãos e aos colegas de trabalho que de alguma maneira me incentivaram e foram exemplo em minha carreira profissional.

SUMÁRIO

FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS	VI
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. Vitiligo	03
2.2. Citomegalovírus	10
2.3. Toxoplasmose.....	11
2.4. Herpes Simples	12
2.5. Hepatite C.....	14
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Principal.....	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. Tipologia.....	17
4.2. Considerações éticas.....	17
4.3. Local.....	17
4.4. População.....	17
4.5. Cálculo da amostra.....	17
4.6. Critérios de inclusão e exclusão.....	18
4.7. Material utilizado e procedimento técnico.....	19
4.8. Princípio do teste e obtenção dos resultados.....	21
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS.....	35
9. APÊNDICE.....	41
10. ANEXOS.....	53

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

FIGURA 1- Representação de corte histológico da pele de um paciente com vitiligo identificando a produção e a ausência de melanina.....	04
FIGURA 2- Fenômeno de Koebner, ausência de pigmento após trauma físico.....	05
FIGURA 3- Vitiligo: sistema de classificação de acordo com sua extensão e forma de distribuição na pele.....	08
FIGURA 4- Diagnóstico do vitiligo realizado pela Lâmpada Wood, pele antes e após o tratamento.....	09
FIGURA 5- Herpes Simples Labial ativa e com aparecimento de Leucoderma.....	13
FIGURA 6- Mácula apresentada no braço de paciente, diagnosticado como Vitiligo localizado após injeção retroviral no local	15
FIGURA 7- Kits do ensaio imunoenzimático, contendo os reagentes e as microplacas sensibilizadas com o antígeno.....	20
FIGURA 08- Leitora do ensaio imunoenzimático contendo a placa e curvetas da reação realizada	21
FIGURA 09- Esquema demonstrativo do princípio do teste imunoenzimático	22
FIGURA 10- Demonstração dos kits e placas do ensaios imunoenzimático com intensidade de cor desenvolvidas no final da reação.....	23
GRÁFICO 1- Classificação dos tipos de Vitiligo quanto a distribuição e extensão na pele, de acordo com a faixa etária.....	24

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

TABELA 1- Distribuição de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> , anti- HSV 1/2, anti-CMV, anti -HVC entre os participantes do estudo.....	24
TABELA 2- Distribuição da frequência de anticorpos IgG contra <i>T.gondii</i> de acordo com o gênero.....	25
TABELA 3- Distribuição da frequência de anticorpos IgG ontra HSV de acordo com o gênero.....	25
TABELA 4- Distribuição da frequência de anticorpos IgG contra anti CMV de acordo com o gênero.....	26
TABELA 5- Distribuição da frequência de anticorpos IgG contra anti CMV de acordo com o gênero.....	26
TABELA 6- Distribuição sorológica entre pacientes com vitiligo e participantes controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti- HSV 1/2 IgG.....	27
TABELA 7- Distribuição sorológica entre pacientes com vitiligo e população controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-CMV IgG	27
QUADRO 1 -Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti <i>T. gondii</i> em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero	28
QUADRO 2- Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti HSV em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero	29
QUADRO 3- Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti HCV em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero	30

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
Ac	Anticorpo
CMV	Citomegalovírus
CO	Cut. Off
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
HCV	Hepatite C
HSV	Vírus Herpes Simplex
HHV	Herpes Vírus Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMA	Hospital de Medicina Alternativa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN	Interferon
mL	Mililitros
μL	Microlitros
n	Número de amostras
nm	Nanômetro
OR	Razão de chances ou de possibilidades
PUVA	Psolareno + Ultravioleta

PCR	Proteína C Reativa
RPM	Rotação por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
SR	Soro Reagente
SNR	Soro Não Reagente
SCMG	Santa Casa de Misericórdia de Goiânia
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
T.gondii	Toxoplasma gondii
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
UI	Unidades Internacional

O vitiligo é um distúrbio hipopigmentário caracterizado pela perda progressiva de melanócitos. Embora a causa do vitiligo permaneça desconhecida, sugere-se que a autoimunidade, possa estar implicada em sua patogênese.

As doenças automimunes podem ser desencadeadas por vírus, bactérias ou parasitas. E o envolvimento destes agentes infecciosos na etiologia do vitiligo, é tema de intensa investigação atual. Neste estudo, o soro de 51 participantes com vitiligo e de 51 pessoas controle pareados por sexo e idade foi analisado para presença de imunoglobulinas IgG anti-*Toxoplasma gondii* (*T.gondii*), anti-herpes simples (HSV) 1/2, anti citomegalovírus (CMV) e anti-hepatite C (HCV). A frequência encontrada de anticorpos anti-*T.gondii*, anti- HSV 1/2 e anti -CMV IgG foi respectivamente de 63%, 84% e 87%. Não foram observados anticorpos anti-HCV IgG nas amostras analisadas. *Toxoplasma gondii* IgG positivo foi detectado em 39 amostras (78%) de pacientes com vitiligo e em 25 amostras (49%) do grupo controle (OR = 3,68, IC 95%: 1,55 - 8,76, p = 0,003). Anti HSV 1/2 IgG foi detectado em 47 amostras (92%) de pacientes com vitiligo e em 38 amostras (76%) de indivíduos controle (OR = 3,71, IC95%: 1,11 - 12,44, p = 0,031). IgG anti CMV foi detectado em 46 amostras de pacientes com vitiligo (90%) e em 41 (84%) das amostras de controle (p = 0,384). As mulheres com vitiligo apresentaram uma maior frequência de anticorpos IgG positivos contra *T. gondii* e HSV 1/2, quando comparadas ao grupo controle (p=0.036 e 0,024 respectivamente). Uma vez que infecções pelo *T.gondii* e HSV 1/2 desencadeiam eventos autoimunes, a exposição a esses patógenos poderia ser um fator de risco para o vitiligo.

Palavras chaves: Vitiligo, doença de pele, doenças autoimunes, CMV, *T.gondii*, HSV, HCV.

Vitiligo is a hypopigmentary disorder characterized by the progressive loss of melanocytes. Although the causes of vitiligo remains unknown, has been suggested to autoimmunity be implicated in its pathogenesis.

Autoimmune diseases can be triggered by viruses, bacteria and parasites. However, the participation of these infectious agents in the etiology of vitiligo, it is a current research topic. In this study, the serum of 51 participants with vitiligo and 51 control subjects was analyzed for the presence of anti-Toxoplasma gondii (T.gondii) IgG, anti-herpes simplex (HSV) 1/2 IgG, anti-cytomegalovirus (CMV) IgG and anti-hepatitis C (HCV) IgG. The frequency of T.gondii, anti-HSV 1/2 and anti-CMV IgG antibodies in the serum of all participants (n = 102) were 63%, 84% and 87%, respectively. No anti-HCV IgG antibodies were found in the samples tested. Toxoplasma gondii IgG positive was detected in 39 samples (78%) of vitiligo patients and in 25 samples (49%) of the control group (OR = 3.68, 95% CI: 1.55-8.76, p = 0, 003). Anti-HSV 1/2 IgG was detected in 47 samples (92%) of vitiligo patients and in 38 samples (76%) of control subjects (OR = 3.71, 95% CI: 1.11-12.44, p = 0.031). IgG anti-CMV was detected in 46 samples of patients with vitiligo (90%) and in 41 (84%) of the control samples (p = 0.384). Women affected by vitiligo had a higher frequency of IgG positive antibodies against T. gondii and HSV 1/2. When compared to the control group (p = 0.036 and 0.024 respectively) T. gondii and HSV 1/2 infections trigger autoimmune events, exposure to these pathogens could be a risk factor for vitiligo.

Key Word: Vitiligo, skin diseases, autoimmune diseases, CMV, *T.gondii*, HSV, HCV.

O vitiligo é uma hipomelanose caracterizada por uma perda progressiva de melanócitos. Estudos recentes de metanálise mostraram que a prevalência mundial está entre 0,1% e 2% (YAGHOUBI et al., 2011; ZHANG et al., 2016). Sua causa é incerta e entre os vários mecanismos sugeridos no desaparecimento de melanócitos, a teoria autoimune é a mais aceita atualmente (BONIFACE et al., 2016; REZAEI et al., 2007; MOHAMMED et al.,2015).

O DNA do CMV foi primeiramente identificado em biópsias cutâneas de 11 entre 29 pacientes com vitiligo (GRIMES et al., 1996). Shukla et al. (1996) identificou por testes citológicos e imunofluorescentes, o efeito citopático de citomegalovírus em preparações de epiderme de pacientes com vitiligo. Anticorpos anti IgM contra CMV também foram relatados em 7 amostras de um total de 26 amostras de pacientes com vitiligo (MAKVANDI et al., 2000). Entretanto, Akar et al. (2002) não encontraram nenhuma sequência de DNA de CMV na pele de 34 pessoas com vitiligo enquanto que Toker et al. (2007) encontraram DNA de CMV em apenas uma biópsia de um total de 12 biópsias.

O vírus herpes simples labial foi relatado como um fator de risco para o vitiligo (ELETHAWI et al.,2013), e recentemente foi diagnosticado vitiligo em um menino de 8 anos de idade com leucemia linfocítica aguda após aparecer infecção exacerbada por herpes zoster (MIURA; YAMAMOTO, 2014).

Também foi observado em cinco pacientes com infecção pelo HCV o aparecimento do vitiligo, sendo que Fachinelli, 2012, relatam o surgimento do vitiligo somente após o tratamento da infecção por HCV com interferon. Entretanto, os resultados não foram confirmados. (YAMAMOTO; NISHIOKA, 2000; HAMADAH et al., 2010; PRIMO et al.,2000).

Deste modo, o envolvimento de determinados vírus no desencadeamento do vitiligo ainda é um assunto de muitas controvérsias.

O presente estudo analisa a sorologia IgG contra HSV 1/2, CMV, HCV em um grupo de pessoas com vitiligo e de participantes controle de mesma idade e sexo. Também, para testar a hipótese de que o parasita intracelular *T. gondii* poderia desencadear o vitiligo, a sorologia IgG para Toxoplasmose foi incluída neste estudo.

2.1 VITILIGO

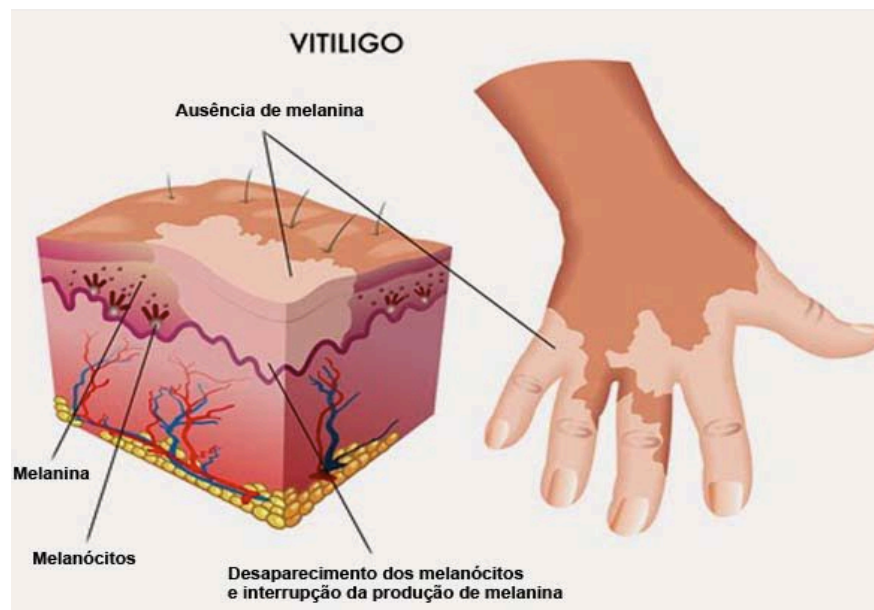
A pele se apresenta como o órgão mais acessível do corpo humano, se tornando também um dos mais facilmente traumatizáveis e sujeitos à infecção. Esse órgão é composto por duas camadas: a camada superficial denominada de epiderme e a mais profunda denominada de derme (BRASIL, 2004).

A epiderme é constituída pelo epitélio estratificado queratinizado, por queratinócitos que forma a camada basal responsável pela renovação celular e melanócitos, responsáveis pela produção de melanina (figura 1) e pigmentação da pele (REDHER et al., 2004; SOUTO et al., 2006).

Os melanócitos são células dendríticas, embriologicamente derivadas dos melanoblastos. Distribuem-se em diversos locais: olhos, ouvidos, sistema nervoso central, matriz dos pêlos, mucosas e pele sendo que na pele, estão localizados, na camada basal da epiderme (MIOT et al., 2009).

Os melanossomas são organelas responsáveis pela síntese do pigmento melanina que são transferidos para o interior dos queratinócitos através dos prolongamentos dendríticos distribuindo-se no citoplasma, de forma a conferir proteção às radiações ultravioleta (UV) (MIOT et al., 2009).

Figura 01 – Representação de corte histológico da pele de um paciente com vitiligo identificando a produção e a ausência de melanina.



Fonte: <http://www.mdsaude.com> (2016).

O vitiligo causa a destruição dos grânulos de melanina e dos melanócitos na pele, pêlos, mucosas e olhos. As principais regiões mais comumente acometidas pelo vitiligo, são: face, extremidades dos membros, órgãos genitais, cotovelo e joelho, podendo atingir até mesmo o corpo todo. Também há possibilidade de surgimento de novas lesões quando ocorrem ferimentos na pele, conhecido como fenômeno de Koebner (STEINER, 2004; ACHENBACH, 2011; VIZANI, 2014).

O fenômeno de Koebner (figura 2) consiste no surgimento de lesões que são causadas por conta de um trauma em uma região saudável. Lesões essas que são do mesmo tipo das encontradas em pessoas portadoras de doenças como psoríase, vitiligo e líquen plano (ACHENBACH, 2011).

Figura 02 – Fenômeno de Koebner, ausência de pigmento após trauma físico.



Fonte: www.sbd.org.br/doencas/vitiligo (2016).

Segundo Steiner (2004), vitiligo é uma doença que acomete cerca de 1% da população brasileira e de 0,5% a 2% da população mundial, sem distinção de raça, comprometendo de modo semelhante homens e mulheres, preferencialmente entre 10 e 30 anos de idade e que 50% dos casos iniciam antes dos 20 anos de idade. Porém, dados mais atualizados de prevalência e incidência desta doença no Brasil ainda não foram descritos (TARLÉT et al., 2015).

O termo “vitiligo” é derivado do grego “vitellius”, segundo Vizani et al. (2014) significa “manchas brancas de um bezerro”. Da palavra latina *vitium*, o significado é “manchar”.

É referida com distintos nomes: leucodermia com bordas inflamatórias; vitiligo com bordas inflamatórias; vitiligo com bordas elevadas; vitiligo inflamatório marginal e vitiligo de bordas elevadas e purpúrica, entre outros (VERA; DIÁZ, 2009).

A patogênese do vitiligo ainda não é integralmente entendida. Várias teorias foram propostas e ainda tem sido para tentar explicar o processo de despigmentação que ocorre no vitiligo. Entre essas teorias, inclui fatores

predisponentes como os fatores genéticos e fatores precipitantes tais como os ambientais. De modo que as teorias são citadas como : teorias neural, autotóxica de melanócitos, genética e teoria autoimune (JADALI et al.,2005; MOHAMMED et al., 2015).

Para Steiner e colaboradores (2004), a associação do vitiligo com doenças como tireoidite, anemia perniciosa, doença de Addison, diabetes mellitus, esclerodermia localizada, alopecia areata, miastenia gravis, pênfigo vulgar e venus halo, corrobora com a teoria autoimune. Nesta teoria, o vitiligo é uma doença vinculada à formação de anticorpos antimelanócitos e por consequência a destruição dos melanócitos por via complemento-mediado ou citotoxicidade (KEMP et al., 2001; DWIVED; LADDA; MANSURI,2014).

A teoria autoimune é a mais aceita, tanto pela associação com outras doenças como pela evidência de alterações nas imunidades humoral e celular, devido a presença em comum de autoanticorpos antimelanócitos circulantes (BONIFACE et al., 2016).

Na teoria neural, tanto as células melanocíticas quanto o sistema nervoso são derivados da mesma linhagem embriológica (ERICKSON et al.,1998). Essa teoria indica que um possível mediador neuroquímico, causa a destruição de melanócitos ou inibe a produção de melanina (BARNES, 1988). Para Rosa; Natali (2009), qualquer processo que extinga os melanócitos da pele afetaria também outras células relacionadas no sistema nervoso central.

Os melanócitos têm como função proteger o organismo e assim eliminar produtos tóxicos, segundo a explicação para teoria autotóxica, haveria destruição de melanócitos por substâncias liberadas a partir dos próprios melanócitos ou a partir de substâncias liberadas por células adjacentes. Excessivas quantidades de produtos tóxicos na epiderme danificam os melanócitos, cuja capacidade de proliferação é limitada (STEINER et al, 2004).

Para Nath e colaboradores (1994), existe um componente genético multifatorial para o vitiligo em indivíduos predispostos à doença. Essa multifatorialidade provavelmente é responsável pela complexidade da apresentação clínica da doença nesses pacientes.

Ainda, novas teorias tem sido propostas para explicar a etiologia do vitiligo. Entre elas: teoria do estresse oxidativo, teoria melanocitorrágica, teoria da apoptose.

A teoria do estresse oxidativo demonstra que há um acúmulo de espécies reativas de oxigênio no interior do melanócito, secundário aos baixos níveis da enzima catalase, o que levaria a dano mitocondrial por estresse oxidativo (DWIVED; LADDA; MANSURI,2014).

A teoria melanocitorrágica propõe um defeito na adesão celular dos melanócitos, que, por estarem pouco aderidos, perderiam a migração após traumas. Explicaria o fenômeno de Koebner (ALIKHAN,2011).

Segundo a teoria envolvimento apoptose, nesta, aconteceria uma redução da sobrevivência dos melanócitos, provavelmente mediada por citocinas (DWIVED; LADDA; MANSURI,2014).

Todavia, existem relatos de que pacientes com vitiligo tendem a apresentar problemas psicossociais, esses que podem levar a quadros de estresse, ansiedade, dificuldades no trabalho e até mesmo transtornos mais graves como a depressão (CORREIA, BORLOTI, 2013).

Porém, na tentativa de desvendar as causas do surgimento do vitiligo, Hoffmann et al. (2005) explicam que existem relatos de surgimento do vitiligo após situações de estresse emocional, podendo também ser associado a fatores psicológicos.

Abdulrahman; Xing-Hua (2016) afirmam que existe uma variedade de estigmatização, definida como um processo em que a aparência da pele dos portadores do vitiligo é negativamente julgada.

Vizani et al. (2014) explicam ainda que os traumas emocionais podem se apresentar entre os fatores desencadeantes ou agravantes da doença. Já, Steiner et al. (2004) acreditam que o estado emocional do paciente com vitiligo é influente no agravamento da doença, de modo que muitas vezes, também é aconselhado o acompanhamento psicológico desse paciente.

Deste modo, fica evidente que o vitiligo é uma doença que envolve muitas interações, sem etiologia definida e com prognóstico reservado.

Quanto as manifestações clínicas do vitiligo, estas tendem a ser clássicas, de forma que a pele do paciente acometido apresenta máculas acrômicas, porém, estas manchas podem ser imprevisíveis, de modo que,

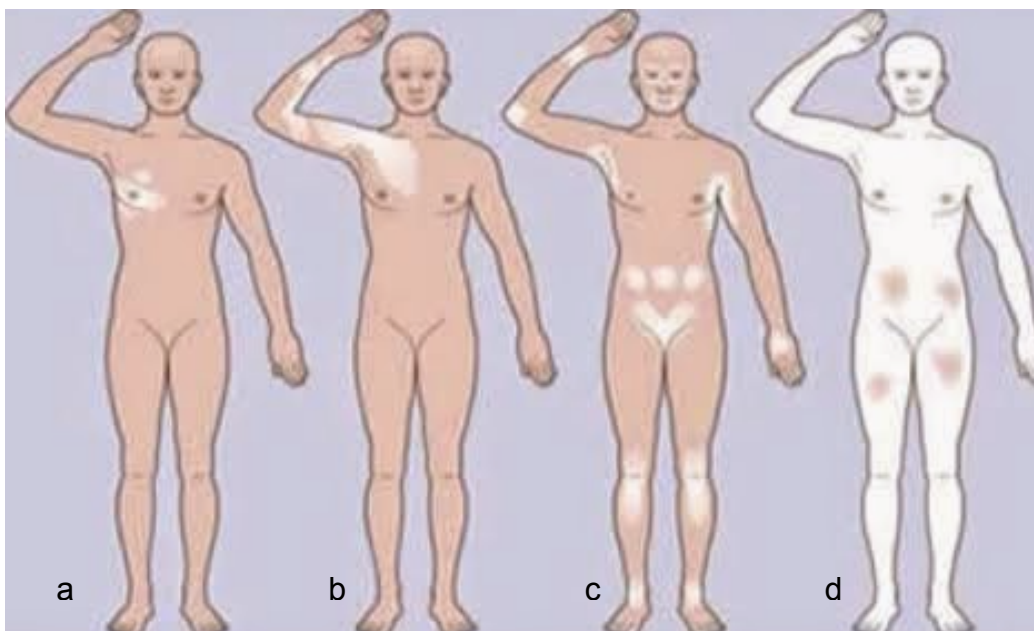
podem ocorrer evolução rápida, ou regressão de algumas ao passo que surgem outras ou estabilizarem. (STEINER et al. 2002, 2004).

Vários sistemas de classificação para estas manifestações clínicas do vitiligo foram propostos, entretanto, dados genéticos e clínicos os dividem de acordo com sua extensão e forma de distribuição na pele (figura 3).

Quanto a forma de distribuição, são classificados entre não segmentar, sendo o grupo mais comum, e o grupo segmentar, que apresenta distribuição unilateral e acompanha total ou parcialmente o trajeto dermatômico (ALIKHAN,2011, EZZEDINE,2012).

Quanto a extensão são classificados como forma localizada, subdividida em focal, segmentar ou mucosa; forma generalizada ou não segmentar, com máculas dispersas e amplamente distribuídas podendo ser subdividida em acrofacial (face, extremidades), vulgar (aleatória) ou mista; e forma universal ou completa, quando mais de 80% da superfície corporal é acometida, próxima a despigmentação total (BOLOGNIA; JORIZZO SCHAFFER, 2012; STEINER,20014).

Figura 03 – Vitiligo: sistema de classificação de acordo com sua extensão e forma de distribuição na pele.

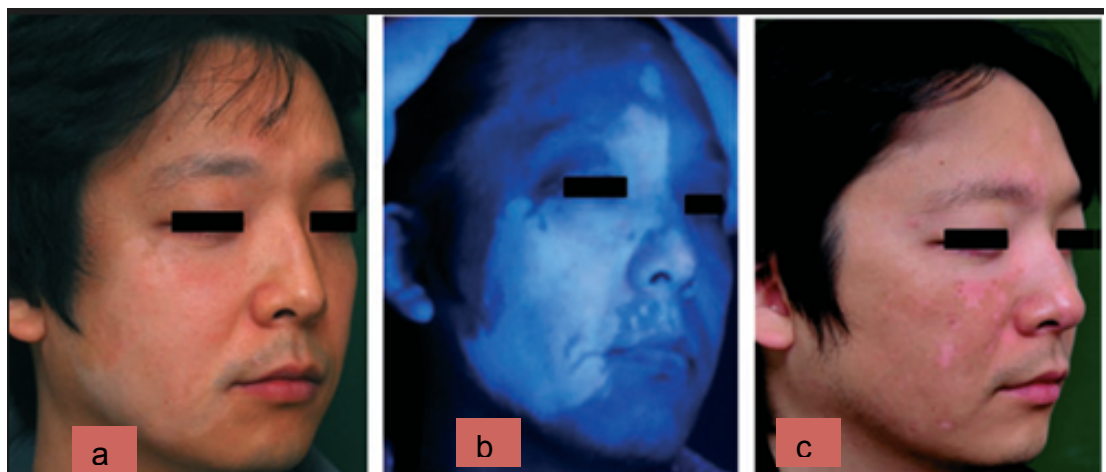


a) Localizado (segmentar) - b) Localizado (segmentar)
c) Generalizado (não segmentar) d) Universal (não segmentar).

Fonte:dravivianypaolucci.blogspot.com.br (2015).

Dias (2014) também explica, que o diagnóstico do vitiligo é feito por meio destas manifestações clínicas, em que o exame central é feito pelo método da lâmpada de wood, importante na detecção das manchas em fase inicial (figura 4). Ao passo que a biópsia de pele é desnecessária quando se trata dessa patologia.

Figura 04 – Diagnóstico do vitiligo realizado pela Lâmpada Wood, pele antes e após o tratamento.



a)Pele com vitiligo b) Lesão acentuada evidenciada pela lâmpada de wood c) Após fototerapia. Fonte:intramed.net/contenidover.aspcontenidolD=81941 (2016).

Sobre o tratamento do vitiligo, Dias (2014) explica que o mesmo não é integralmente efetivo, isso porque o objetivo central do tratamento é o estímulo à produção de pigmento em regiões lesadas da pele. Segundo a autora, os melanócitos não sintetizam a melanina em condições normais, contudo, se tornam ativos quando entram em contato com a luz ultravioleta, ou ainda por meio de dermoabrasão.

Atualmente, os principais tratamentos utilizados são: esteroides, fototerapia (PUVA, UVB), terapia cirúrgica, imunomoduladores. Porém, tem surgido outras formas de tratamento, e a maioria dos pacientes não apresentam resultados positivos a eles, já que é utilizada somente uma forma terapêutica por vez. Assim, acreditam-se que é importante entender

os potenciais tratamentos e então estruturar uma combinação entre os mesmos, visando então auxiliar na repigmentação dos pacientes (DIAS,2014).

2.2 CITOMEGALOVÍRUS

A fim de tratar sobre as possíveis relações entre doenças infecciosas e o vitiligo, estudos tem associado a presença do CMV em amostras de pele com vitiligo (GALARZA et al., 2011).

Junqueira et al. (2008) esclarecem que a aquisição ou infecção primária por CMV resulta da inserção de vírus em um hospedeiro humano causando impactos dramáticos na célula, imediatamente após a infecção e continua de maneira tardia.

O CMV é uma infecção extremamente comum na população em geral e apresenta distribuição universal, sendo que a alta prevalência desta infecção demonstra que existem várias formas de contágio (MATOS et al. 2011). Estes autores também explicam que a infecção pelo CMV pode ser adquirida por meio do contato com diversos líquidos biológicos, como: saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, leite materno, além de via trans-placentária, por meio de transfusão de sangue ou ainda por transplante de órgãos.

E embora a infecção por CMV seja com frequência associada à condição socioeconômica menos favorecida, os resultados encontrados em estudo de mulheres brasileiras de classe média a alta, demonstram uma prevalência de 93,7% no estado de Goiás. (SERRA,2009).

Segundo Ferreira et al. (2001) a maioria absoluta das infecções adquiridas é assintomática, entretanto, quando ocorrem manifestações clínicas dos pacientes apresentam-se com quadro febril prolongado, sensação de fraqueza, sudorese e, eventualmente, hepatoesplenomegalia. No início da gravidez a gravidade da infecção é maior, com sua forma mais grave denominada de “doença de inclusão citomegálica”, sendo que a maioria dos recém nascidos com essa apresentação clinica irá desenvolver sequelas graves na evolução, incluindo-se surdez, perda da visão, retardo mental e déficits neurológicos.

Algumas destas manifestações clínicas do CMV como associações de desordens autoimunes, anormalidades neurais, coriorretinite, surdez, distúrbios hepáticos, também são achados comuns em pacientes com vitiligo (TOKER, et al.,2007).

2.3 TOXOPLASMOSE

Fialho et al. (2009) informam que a toxoplasmose é causada por um protozoário denominado *Toxoplasma Gondii*. O ciclo de vida é heterógeno, de modo que todos os animais homeotérmicos, entre mamíferos e aves – podem fazer parte do ciclo enquanto hospedeiros intermediários, ou como os felídeos, que são hospedeiros definitivos (DUBEY,2008).

Também é possível adquirir toxoplasmose na maneira vertical, por meio da transmissão transplacental de taquizoítos, que também podem ser transmitidos por meio do leite materno ou ainda por transplante de sangue ou órgãos (TENTER et al. (2000).

O contato entre hospedeiros com o protozoário oferece ambiente propício para a formação de anticorpos. Dessa forma, os estudos epidemiológicos com base em exames sorológicos, são capazes de avaliar, além da presença da infecção, o nível de risco que seres humanos e animais estão expostos à toxoplasmose. Ainda que dados sorológicos apontem que a infecção no ser humano e nos demais hospedeiros seja comum em diversas partes do mundo, a maioria ocorre de maneira benigna, ou até mesmo assintomática (TENTER et al., 2000; PERDONCINI et al., 2010).

A toxoplasmose humana apresenta uma distribuição cosmopolita, estimando-se que um terço ou mais da população mundial, seja cronicamente infectada, apresentando anticorpos para o parasita. Há também a indicação de que a soro positividade é variada e depende de elementos climáticos, socioeconômicos e culturais, região geográfica e hábitos alimentares (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; FIALHO et al., 2009).

Dubey et al. (2012) por sua vez, comentam que, no Brasil, a infecção pelo *T. gondii* se encontra amplamente prevalente em seres humanos, de forma que, aproximadamente 50% das crianças e 80% das mulheres em

idade fértil, possuem anticorpos para o protozoário. Em Goiânia, estudos tem estimado uma prevalência de 64% em mulheres em idade reprodutiva (Avelino et al.,2004).

Segundo Mitsuka-Breganó et al. (2010) a maior parte dos casos de toxoplasmose em seres humanos com anticorpos é assintomática. Todavia, um percentual entre 10% e 20% da população adulta infectada, tende a apresentar, na fase aguda da doença, formas clínicas como: linfo glandular, meningoencefalite, pneumonite, hepatite, miosite, erupção cutânea e retinocoroidite.

A formação de anticorpos anti *T. gondii* é relativamente rápida e extensa. A resposta humoral persistente se deve à exposição continuada de antígenos, tanta pela ruptura de cisto teciduais, reativação da infecção latente, ou por novas infecções (RODRIGUES, 2013).

Antelo et al. (2008), explicam então que a autoimunidade é determinada como resposta do sistema imune adquirido para auto-antígenos que acontece quando os mecanismos de auto-tolerância falham. Assim, o mecanismo de latência do *T.gondii* pode ser um fator desencadeante para autoimunidade e destruição dos melanócitos.

2.4 HERPES VÍRUS

Em se tratando de herpes, conforme a Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016, é uma doença de distribuição universal e contagiosa causada pelo vírus HSV. Existem dois tipos de HSV, o tipo 1 com frequência de 50% a 90% relacionado a lesões orais, e o tipo 2, responsável por 20% a 30% das lesões genitais (Azambuja et al.,2004).

Conforme os estudos de Clemens e Farhat, 2010, a contaminação ocorre por meio da exposição direta ao contato da pele e mucosas com indivíduo infectado. Após a infecção primária, o vírus se torna capaz de continuar no corpo humano sem apresentar outros sinais ou sintomas, podendo ser posteriormente reativado a fim de produzir doença recorrente – denominada de herpes recidivante – que geralmente apresenta menor gravidade e duração do que a infecção primária.

A infecção primária pode ser acompanhada por gengivoestomatite com quadros clínicos com lesões vesículas erosivas, febre ou estado subfebril, cefaleia, aumento dos gânglios, rigidez na nuca, disúria e secreção vaginal ou comprometimento do estado geral (Azambuja et al.,2004).

Nos estudos de Elethawi em 2013 em amostras de 24 pacientes com pós-herpes labial com surgimento de leucoderma, foram inscritos na casuística hospitalar do estudo clínico, com coleta de dados como gênero, idade, infecção do herpes simples labial, duração, recorrência e, entre outros dados, o histórico familiar de vitiligo (figura 5). Nos resultados, o autor apresenta que, dos pacientes da amostra, 54,17% dos que tinham histórico familiar de vitiligo tiveram leucoderma, sendo que somente 8,33% da amostra desenvolveu vitiligo vulgar em outras partes do corpo.

Ao contrário do trabalho descrito por Elethawi em 2013, nos estudos de Liu et al., 2014 não obteve evidências de anticorpos anti IgG ao HSV 1/2 em 90 pacientes com vitiligo em comparação com 150 controles de mulheres grávidas.

Estudos mais recentes também tem associado o HSV com a indução da apoptose, podendo sugerir essa infecção com a etiologia do Vitiligo (LAN et al.,2016).

Figura 05 – Herpes Simples Labial ativa e com aparecimento de Leucoderma.



a) Fase ativa da herpes simples1/2 b) pós herpes labial com aparecimento de leucoderma.

Fonte: Elethawi (2013).

2.5 HEPATITE C

As principais formas de transmissão do vírus da hepatite C são por via parenteral, por meio de transfusão de sangue e hemocomponentes, utilização de agulhas e seringas contaminadas e pelo transplante de órgãos e tecidos, sendo a transmissão por contato sexual pouco frequente (FERREIRA, 1996).

Esta infecção viral está associada a um amplo espectro de manifestações clínicas: hepáticas, sistêmicas e cutâneas. Entre elas: cirrose, câncer hepático, diabetes mellitus, glomerulonefrite, linfoma Hodgkin. No entanto, a maioria são subclínicas e as manifestações cutâneas podem prevalecer (CARAMAZ et al., 2010).

As manifestações dermatológicas, segundo Caramaz et al., 2010 podem ser devido a circulação e depósito de imunocomplexos formados pelo antígeno viral e anticorpo nos tecidos, provocando uma resposta inflamatória. Assim, eles associam o surgimento do vitiligo como uma manifestação extra hepática da Hepatite C devido à infiltração de partículas do VHC na junção dermoepidérmica, infiltração de linfócitos e destruição dos melanócitos.

Para Jadali et al. (2005) indicações para suspeitar o envolvimento do vitiligo e a hepatite C se deve à estas manifestações extra hepáticas observadas em dermatologia tais como: líquen plano, alopecia areata e porfiria cutânea.

Entretanto, a relação entre as doenças pode estar relacionada apenas pela indução do aumento da produção de autoanticorpos em pacientes com hepatite C tratados com interferon, sem qualquer manifestação de outra doença autoimune (PICCOLO et al., 1996).

Fachinelli et al. (2012), relatou o aparecimento de manchas acromáticas e hipocrômicas no rosto, com bordas irregulares, especialmente na região da testa e malar, após seis meses do início do tratamento para a hepatite C com IFN (interferon) e ribavirina.

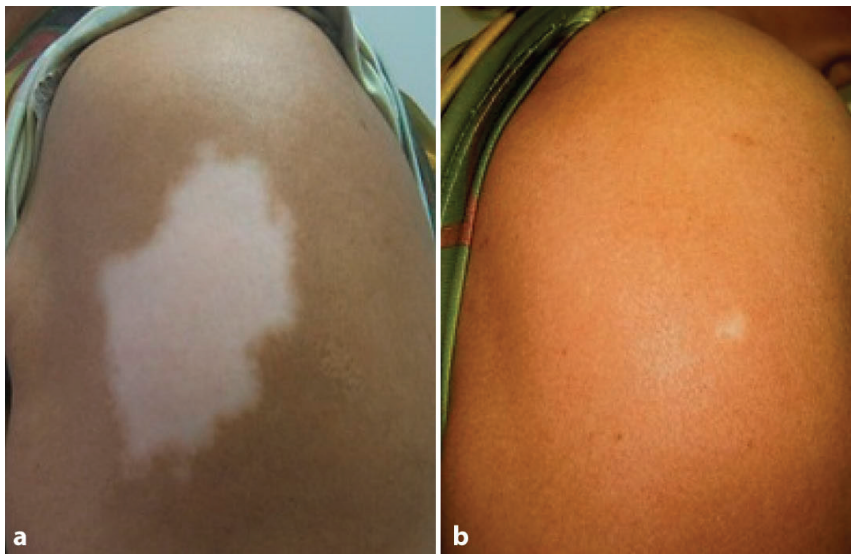
Em outra descrição deste mesmo autor, o paciente apresentou manchas difusas, acromáticos por todo o corpo, durante pelo menos um ano, sendo que foi diagnosticado com hepatite C crônica sem início do

tratamento quatro meses antes de aparecerem as lesões cutâneas.

Em uma revisão sistemática, Arya e colaboradores em 2010, relata outros casos de vitiligo relacionado com hepatite C, e concluem que as lesões do vitiligo aparecem durante os primeiros seis meses de terapia com interferon combinado (figura 6).

Dessa forma, o envolvimento deste vírus no prognóstico do vitiligo ainda precisa ser elucidado.

Figura 6. Mácula apresentada no braço de paciente, diagnosticado como Vitiligo localizado após injeção retroviral no local.



(a) Braço direito (b) Braço esquerdo. (ARYA, V. et al.2010)

3.1 Objetivo Principal

Associar o Vitiligo com doenças infecciosas, por meio da pesquisa de anticorpos IgG contra citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus 1 e 2 da herpes simples e vírus da hepatite C.

3.2 Objetivos Específicos

Detectar anticorpos IgG contra citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus 1 e 2 da herpes simples e vírus da hepatite C em soro de pacientes com vitiligo e de pessoas sem vitiligo por meio de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima indireto.

Analisar a frequência dos anticorpos anti-IgG contra *Toxoplasma gondii*, vírus 1 e 2 da herpes simples e vírus da hepatite C entre pacientes com vitiligo e pessoas sem vitiligo pareados por sexo e idade.

4.1 Tipologia

Estudo do tipo caso - controle.

4.2 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o protocolo 47956815.2.0000.5083 e pela Comissão de Ética do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia, instituição co participante, sob o protocolo 47956815.2.3001.5081.

4.3 Local

Hospital de Medicina Alternativa e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Goiânia.

4.4 População

Pacientes casos com diagnóstico médico de vitiligo e pacientes controle sem história clínica de vitiligo.

4.5 Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo da amostra utilizou-se o programa de cálculo amostral segundo Santos (2015), com os seguintes parâmetros: nível de confiança 95%, erro amostral de 5% , percentual máximo e número populacional (em anexo).

O cálculo baseou –se na população de Goiânia para o ano de 2016 segundo estimativa do IBGE de 1.448.639 habitantes. Utilizou-se o percentual de 2% segundo Steiner (2004). Dados mais atualizados de prevalência e incidência desta doença no Brasil ainda não foram descritos. (TARIÉ., 2015).

A quantidade amostral obtida foi de 31 participantes para o grupo teste e 31 participantes para o grupo controle, ver anexo. Como forma de correção para casos de resultados indeterminados, acrescentaram-se mais 20 paciente. Portanto, o total estudado foi de 51 pacientes em cada grupo (casos e controles).

Os participantes do grupo controle foram pareados por sexo e idade ao grupo caso, uma vez que, a prevalência da infecção por *T.gondii* e citomegalovírus varia de acordo com esses parâmetros.

4.6 Critérios de inclusão e exclusão

4.6.1 Critérios de inclusão

Pacientes testes:

Diagnóstico médico de doença de pele Vitiligo.

Qualquer idade.

Com ou sem adesão a qualquer tipo de tratamento.

Sem importância para o tempo que foi acometido pela doença.

Aceitação para a participação da pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE); em anexo.

Responder ao questionário clínico epidemiológico de pacientes com Vitiligo, para coleta de dados do paciente; em anexo.

Pacientes controle:

Sem histórico de doença de pele Vitiligo.

Idade e sexo paralelos à pacientes teste.

Aceitação para a participação da pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE); em anexo.

4.6.2 Critérios de exclusão

Pacientes testes:

Sem avaliação médica atestando doença de pele Vitiligo.

Negar assinar o TCLE ou negar em responder o questionário clínico-epidemiológico.

Pacientes controle:

Sem avaliação médica atestando não ser acometido pela doença de pele Vitiligo.

Sem padronização paralelo aos pacientes testes, conforme sexo e idade.

Negar assinar o TCLE.

4.7 Material utilizado e procedimento técnico

O presente estudo utilizou o kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) da marca Symbiosys (Symbiosis Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brazil) para determinação qualitativa de anticorpos IgG contra CMV, HSV 1/2 , HCV e contra o *Toxoplasma gondii* .

Cada kit contém microplacas sensibilizadas com antígeno de acordo com o teste a ser realizado e reagentes prontos para uso como: frascos com concentrações de padrões calibrados em unidades internacionais; controle negativo; controle positivo; solução tampão proteica com anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano; solução proteica para diluição de amostras; tetrametilbenzidina em tampão citrato-fostato e H₂O₂ (cromógeno-substrato); solução bloqueadora (H₂SO₄ 1N); amostra concentrada 20 x; Tampão PBS Tween 20 e Kathon para ser diluído com água destilada antes do uso (figura 07).

Figura 07 – Kits do ensaio imunoenzimático, contendo os reagentes e as microplacas sensibilizadas com o antígeno.



Utilizou-se para as reações, sangue venoso periférico coletados em tubos Vacutainer® de 5 ml sem anticoagulante, sendo o soro separado por centrifugação a 1800 rpm (rotação por minuto) durante 5 minutos e armazenado em eppendorff a -80°C .

Nas cavidades das microplacas sensibilizadas com antígenos CMV , HSV e *T.gondii* não infectantes sintético, adicionou-se amostras de soro previamente diluídas 1:101 com diluente de amostra e para microplacas sensibilizadas com HCV utilizou-se a diluição 1:100.

Após separada uma cavidade para o controle da reação, foram dispensados em duplicatas 100 μL de controle positivo, controle negativo, cut. off e padrões, nas cavidades destinadas a essa finalidade.

Cobriu-se as microplacas com etiqueta adesiva, e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente.

Depois desse tempo, lavou-se as cavidades retirando o excesso de solução por inversão da placa.

Adicionados 100 μL do conjugado em todas as cavidades, exceto reservada para o controle da reação, incubou-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após o processo de lavagem das microplacas foram adicionados 100 μL do cromógeno-substrato em todas as cavidades, inclusive à destinada

para o controle da reação, incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Adicionados 100 μ L de solução bloqueadora em todas as cavidades, realizou-se a leitura da densidade óptica(figura 08) em comprimento de onda de referência a 620-630 nm.

Figura 08 – Leitora do ensaio imunoenzimático contendo a placa e curvetas da reação realizada .

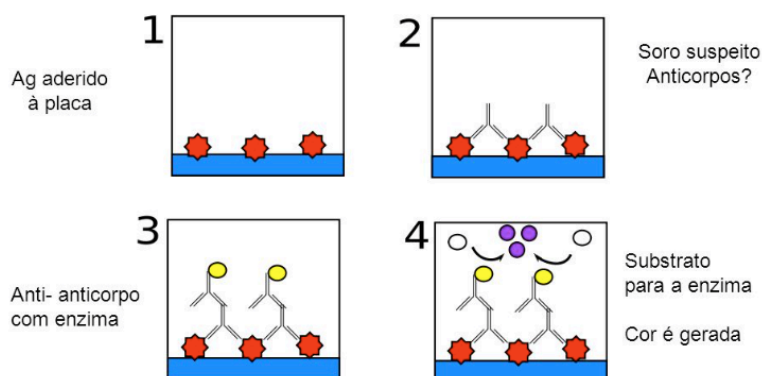


4.8 Princípio do teste e procedimentos de cálculos para obtenção dos resultados

O princípio do método baseia-se na interação antígeno-anticorpo (figura 09). As cavidades das microplacas são sensibilizadas com antígenos específicos. Após adicionar amostras previamente diluídas durante a primeira incubação o antígeno sensibilizado na microplaca captura os anticorpos específicos presentes nas amostras.

Após aspiração e lavagem, outros componentes da amostra não ligados são removidos. Em uma segunda incubação as ligações antígeno-anticorpo são detectadas pela adição de uma solução de anticorpo anti IgG humano, conjugado com peroxidase. A atividade enzimática fixada na fase sólida, agindo com a solução cromógeno substrato, gera um sinal óptico que é proporcional a quantidade de anticorpos presentes na amostra.

Figura 09 – Esquema demonstrativo do princípio do teste de imunoenzimático.



Fonte: www.slideplayer.com.br/slide/334179/ DINIZ (2016).

A intensidade da cor desenvolvida na técnica (figura 10) é medida por meio de leitura espectrofotométrica a 450 nm com referência em 620/630 nm.

Quando a densidade óptica (DO) ultrapassa o limite de detecção espectrofotométrica, realiza-se uma nova leitura a 405 nm a fim de quantificar o resultado.

Para obtenção dos resultados, os procedimentos são validados de acordo especificações do fabricante. Quando o procedimento não for validado, toda a microplaca deve ser descartada e novo procedimento técnico ser realizado.

Cada teste de ELISA tem sua forma de calcular o ponto de corte (Cut. off) acima ou abaixo do qual as amostras são caracterizadas com reativas ou não reativas.

Para ensaios indiretos os valores de DO acima do ponto de corte, indicam que amostra é reagente e abaixo do ponto de corte que a amostra é não reagente. Porém, uma zona cinza, cerca de 10% o valor da DO para baixo, indica que o resultado é indeterminado ou duvidoso, sendo aconselhável a repetição do procedimento através de uma nova coleta do material para confirmação do resultado.

Neste estudo valores indeterminados e duvidosos foram repetidos em mesma amostra e em caso de resultado persistente, o dado da amostra não foi utilizado por dificuldade em coleta de nova amostra biológica.

Os valores são interpretados com relação ao valor de DO das amostras pelo valor do cut. off sendo o valor de referência padronizado para cada teste utilizado.

Após as interpretações dos valores, os dados foram colocados em tabela Excel para cálculo de frequência e para síntese e análise dos resultados inseridos em programa estatístico para Windows Graphpad Prism versão 5 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia, USA, www.graphpad.com).

O programa estatístico utilizou o teste de razão de verossimilhanças ou qui-quadrado, exatos de Fisher e estimados odds ratio (OR), razão entre a chance de um evento ocorrer em um grupo e a chance de ocorrer em outro grupo. Foram utilizados para estimar a associação entre as variáveis, um intervalo de 95% de confiança, sendo a probabilidade de significância (p) < 0,05.

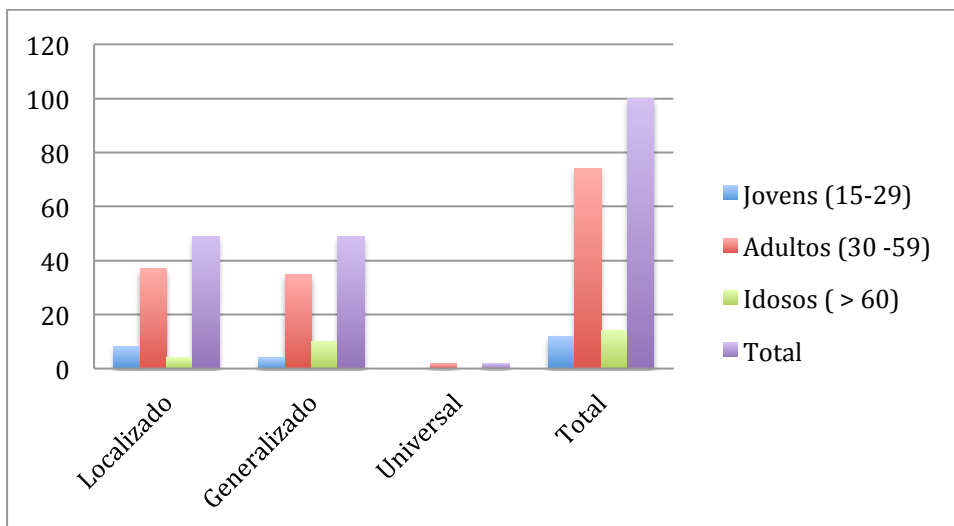
Figura 10- Demonstração dos kits e placas do ensaios imunoenzimático com intensidade de cor desenvolvidas no final da reação.



5 RESULTADOS

A casuística deste estudo foi constituída de 101 pacientes, com idade média de 44,2 anos (dp=10,1), predominantemente formada por pessoas do sexo feminino (65%). Quanto à classificação, o tipo localizado e generalizado predomina na população estudada (Gráfico 1).

Gráfico 1. Classificação dos tipos de Vitiligo quanto a distribuição e extensão na pele, de acordo com a faixa etária.



Foi observado que entre os agentes infecciosos estudados a frequência maior de casos positivos foi para o citomegalovírus, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, anti- HSV 1/2, anti-CMV, anti -HVC entre os participantes do estudo.

	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	64 (63)	37 (37)	101 (100) ^a
Anti-herpes simples 1/2	85 (84)	16(16)	101 (100) ^a
Anti-citomegalovírus	87 (87)	13 (13)	100 (100) ^b
Anti- hepatite C vírus	0 (0)	51(100)	51 (100)

^{a,b}Amostra com 1 e 2 valores indeterminados respectivamente.

A seguir, as tabelas 2, 3 e 4 foram apresentados os resultados sobre a distribuição da sorologia de imunoglobulina IgG anti-*T.gondii*, anti-HSV 1/2 e anti-CMV, respectivamente entre homens e mulheres participantes da pesquisa.

Na tabela 2, vemos que não houve diferenças na sorologia para anti -*T.gondii* IgG em relação ao gênero, ($p = 0,439$).

Tabela 2. Distribuição da frequência de anticorpos IgG contra *T.gondii* de acordo com o gênero.

Características	Anti- <i>T. gondii</i> IgG				Total	
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%	n	%
Feminino	43	69	22	58	65 ^a	64
Masculino	21	31	15	42	36	36
Total	64	100	37	100	101	100

OR= 1.396 (95% CI: 0.598 – 3.76) $p= 0,439$

^a Amostra com um valor indeterminado.

Na tabela 3 verificou-se uma diferença significativa ($p=0,006$) na distribuição da frequência de anticorpos IgG anti HSV entre homens e mulheres, observando-se uma maior frequência entre as mulheres.

Tabela 3. Distribuição da frequência de anticorpos IgG ontra HSV de acordo com o gênero.

Características	Anti-HSV IgG				Total	
	Positivo		Negativo			
	n	%	n	%	n	%
Feminino	60	71	5	31	65	64
Masculino	25	29	11	69	36	36
Total	85	100	16 ^a	100	101	100

OR= 5.28 (95% CI: 1.7 - 16.8) $p = 0,006$
^aAmostra com um valor indeterminado.

A frequência observada na tabela 4, de anticorpos anti-CMV IgG não foi diferente entre homens e mulheres ($p=0,11$).

Tabela 4. Distribuição da frequência de anticorpos IgG contra anti CMV de acordo com o gênero.

Características	Anti-CMV IgG				Total	
	Positivo		Negativo			
	n	%	N	%	n	%
Feminino	60	70	6	31	66	66
Masculino	27	30	7	69	34 ^a	34
Total	87	100	13 ^a	100	100	100

OR= 2.593 (95% CI: 0.83 – 8.98) $p = 0,11$
^a Amostra com dois valores indeterminados.

As tabelas 5, 6 e 7 apresentam a distribuição dos participantes com vitiligo e controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos IgG *anti-Toxoplasma gondii*, anti-herpes simples 1/2 e anti-citomegalovírus, respectivamente.

Na tabela 5 observou-se que, entre os participantes com vitiligo, 78% apresentaram sorologia positiva contra *T.gondii* quando comparados ao grupo controle, ($p= 0,0036$).

Tabela 5. Distribuição sorológica do vitiligo e participantes controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti -*Toxoplasma gondii* IgG.

Anti- <i>T. gondii</i> IgG	Vitiligo		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	39	78	25	49	64	63
Negativo	11	22	26	51	37	37
Total	50 ^a	100	51	100	101	100

OR= 3.68 (95% CI: 1.55 - 8.76) $p= 0,0036$

^a Amostra com um valor indeterminado.

Observou-se na tabela 6, que 92% dos participantes com vitiligo apresentaram sorologia positiva para anti-HSV 1/2, com significância ($p= 0,031$) em relação ao grupo controle.

Tabela 6. Distribuição sorológica entre pacientes com vitiligo e participantes controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti- HSV 1/2 IgG.

Anti-HSV IgG	Vitiligo		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	47	92	38	76	85	84
Negativo	4	8	12	24	16	16
Total	51	100	50 ^a	100	101	100

OR= 3.71 (95% CI: 1.1 - 12.4) $p =0,031$

^a Amostra com um valor indeterminado.

Na tabela 7, verificou-se que entre os pacientes com vitiligo, 90% apresentaram sorologia positiva para anti-CMV não existindo significância ($p = 0.384$) em relação ao grupo controle, cuja frequência foi de 84%.

Tabela 7. Distribuição sorológica entre pacientes com vitiligo e população controle de acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-CMV IgG.

Anti-CMV IgG	Vitiligo		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	46	90	41	84	87	87
Negativo	5	10	8	16	13	13
Total	51	100	49 ^a	100	100	100
OR= 1.7195 (95% CI: 0.589 – 5.262)			p =0,384			
^a Amostra com dois valores indeterminados.						

A seguir, analisamos os quadros 1,2 e 3 a distribuição da sorologia *anti-T.gondii*, anti-Herpes Simples 1/2 e anti-CMV IgG, respectivamente entre os pacientes controles e vitiligo, de acordo com o gênero.

Observa-se no quadro 1, que entre os participantes com vitiligo do sexo feminino, 84% apresentam sorologia positiva para *T.gondii*, enquanto que apenas 8% dos participantes controle do sexo feminino apresentaram sorologia positiva ($p=0,036$). Entre os participantes do sexo masculino, 67% dos participantes com vitiligo e 50% dos participantes controle apresentaram sorologia positiva ($p=0,50$).

Quadro 1. Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti *T.gondii* em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero.

Características		Anti- <i>T. gondii</i>		
		Vitiligo n(%)	Controle n(%)	p ¹
Gênero				
Feminino	Positivo	27 (84)	16 (48)	0,036
	Negativo	5 (16)	17 (52)	
Masculino	Positivo	12 (67)	9 (50)	0,500
	Negativo	6 (33)	9 (50)	
p ¹ teste exato de Fisher				

Da mesma forma, no quadro 2, apresentou-se a distribuição de anticorpos IgG anti-Herpes Simples 1/2 entre participantes controle e com vitiligo, de acordo com o sexo. Neste caso observamos que 100% das amostras de pacientes com vitiligo do sexo feminino foram positivas, enquanto entre os controles, 84% foram positivas. Nos pacientes com vitiligo do sexo masculino, 78% foram positivas ao anti-Herpes Simples 1/2 e 61% foram encontradas em controles do sexo masculinos sem diferença significativa ($p=0,471$).

Quadro 2. Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti HSV em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero.

		Anti-HSV		
Características		Vitiligo n(%)	Controle n(%)	p ¹
Gênero				
Feminino	Positivo	33 (100)	27(84)	0,024
	Negativo	0 (0)	5 (16)	
Masculino	Positivo	14 (78)	11(61)	0,471
	Negativo	4 (22)	7 (32)	
p ¹ teste exato de Fisher				

No quadro 3, observamos que entre os participantes do sexo feminino não houve diferença significativa na distribuição sorológica de anticorpos CMV entre participantes com vitiligo e participantes controle (p=0,672). O mesmo acontecendo entre participantes do sexo masculino (p=0,682).

Quadro 3. Distribuição sorológica de anticorpos IgG positivo para Anti CMV em grupo com vitiligo e grupo controle de acordo com o gênero.

		Anti-CMV		
Características		Vitiligo n(%)	Controle n(%)	p ¹
Gênero				
Feminino	Positivo	31 (94)	29(88)	0,672
	Negativo	2 (6)	4 (12)	
Masculino	Positivo	15 (83)	12(75)	0,682
	Negativo	3 (17)	4 (25)	
p ¹ teste exato de Fisher				

O presente estudo analisou agentes infecciosos por meio da pesquisa de anticorpos IgG contra citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus 1 e 2 da herpes simples e vírus da hepatite C em amostras de pacientes com vitiligo, e uma população controle na cidade de Goiânia.

Verificou-se que a frequência de anticorpos *anti-Toxoplasma gondii*, anti-herpes simples 1/2 e anti-citomegalovírus IgG no soro de todos os participantes foi de 63, 84 e 87%, respectivamente. Não foram encontrados anticorpos IgG anti-Hepatite C. Embora o presente estudo não seja epidemiológico, as frequências observadas não são muito distantes das encontradas em estudos populacionais.

Assim, estudos realizados na cidade de Goiânia indicaram prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* de 64% (AVELINO, 2004) e de 90% para o herpes simples (AZAMBUJA et al., 2004). No Estado de Goiás a prevalência do citomegalovírus foi de 93,7% (SERRA et al., 2009). Encontramos neste estudo, frequências semelhantes, sendo que 63% para infecção pelo T.gondii, 84% para anti-HSV e 87% para anti-HCV.

Quanto a faixa etária, o estudo apresentou maior número de pacientes adultos com vitiligo com 74% entre 30 a 59 anos, o que corrobora com Shah et al.,2008 e estudos de Onunu e Kubeyeje, 2003, em que demonstram prevalência de pacientes com vitiligo na segunda e terceira décadas de vida.

Entre a população jovem estudada com vitiligo, verificou-se um predomínio do vitiligo tipo localizado, classificação que tipicamente se inicia na infância, e tende a se tornar estável (EZZEDINE, 2012). Para a população idosa com vitiligo, foi demonstrado o tipo generalizado, forma mais comum de vitiligo e com início tardio (ALIKHAN, 2011).

Lombello (2002) relata predominância do vitiligo no sexo feminino, dados assemelham-se com encontrados nesse estudo.

Em seus estudos, Elethawi (2013) associa pacientes com pós-herpes labial com surgimento de leucoderma. Observou-se nesse ensaio clínico, frequências positivas de IgG anti-herpes simples 1/2 também significativamente mais elevadas no vitiligo que nos indivíduos de controle.

Liu et al. (2014) não encontraram evidências de anticorpos anti-IgG ao vírus herpes simples 1/2 em 90 pacientes com vitiligo em comparação com 150 controles de mulheres grávidas. Mais recentemente, Lan et al. (2016) evidenciaram que HSV-1 entra nos melanócitos e induz apoptose, levando-os à hipótese de que a infecção por HSV-1 pode ser associada ao vitiligo.

Em relação à frequência de IgG anti-citomegalovírus, não houve diferença significativa entre os grupos vitiligo e controle. Os resultados são contrários aos obtidos por Grimes et al. (1996), que encontraram DNA de citomegalovírus em 11 de 29 biópsias de pele de pacientes com vitiligo. No entanto, estão de acordo com Toker et al. (2007) que encontraram DNA de CMV em apenas um de doze pacientes. Akar et al. (2002) também sugeriram que é improvável que o CMV tenha qualquer papel na patogênese do vitiligo, o que está de acordo com os resultados obtidos neste ensaio.

Embora os resultados de IgG anti-citomegalovírus não seja significativos, observou-se uma alta frequência de IgG nos pacientes de vitiligo, que poderiam explicar a reatividade IgM em doença ativa encontrados nos estudos de Makvandi et al. (2000). Estes autores, em teste para anti-CMV IgM, avaliaram que em pacientes que sofrem de doença progressiva para vitiligo existe uma reatividade para CMV significativa ao comparar com amostras controle.

No entanto, concordamos com Steiner et al. (2002) ao concluir que a relação entre vitiligo e sorologia positiva para CMV não é significativa quando comparada com a população sem a doença. Verificamos, pois, que, apesar de 87% da população com vitiligo já ter contato com o citomegalovírus, em uma população controle escolhida aleatoriamente entre pacientes sem diagnóstico de vitiligo e sem indicação clínica para CMV também foi observada essa frequência alta.

Apesar de o estudo não encontrar positividade para hepatite C e vitiligo, vários estudos têm indicado a infecção viral na patogênese de várias doenças autoimunes, podendo ser um fator desencadeante para autoimunidade (ANTELO et al.,2008).

Porém, a compreensão dos efeitos adversos imunológicos na hepatite C crônica é um fenômeno complexo, sendo que a variabilidade genotípica da resposta ao tratamento e o estado imunológico do hospedeiro desempenham um papel importante. As manifestações cutâneas na hepatite C são geralmente baseadas em estudos epidemiológicos, necessitando de outras evidências desta associação.

Na infecção por toxoplasmose os anticorpos controlam os níveis de parasitas extracelulares na circulação e fluidos teciduais, e o protozoário desenvolve mecanismos para escapar da resposta imune, como capacidade para alterar os antígenos de superfície (TIZARD, 2002). As alterações imunológicas apresentadas por este parasita podem ser comparadas a infecções virais.

Dentre poucos estudos, Getts et al. (2013) têm demonstrado que a infecção provavelmente seja um fator ambiental adicional necessário para a autoimunidade. Comparando uma população com vitiligo e controle, a diferença estatística apresentou significância p 0,003, relacionada à infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*. A promoção de um processo destrutivo autoimune mediado pela toxoplasmose em vitiligo precisa ser esclarecida.

O *Toxoplasma gondii* IgG e herpes simples 1/2 vírus IgG mostraram-se significativamente mais presentes em vitiligo participantes, especialmente em mulheres, em comparação com pacientes do grupo controle de mesma idade e sexo.

Realizou-se a detecção de anticorpos IgG contra citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, vírus 1 e 2 da herpes simples e vírus da hepatite C por meio de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) indireto. Após analisar a frequência destes anticorpos em pacientes com vitiligo na cidade de Goiânia e comparar com um grupo controle de mesma idade e sexo, observou-se que pacientes com vitiligo do sexo feminino apresentaram diferença significativa para anticorpos anti IgG *T.gondii* e herpes I/II em relação a pacientes controle.

Vários fatores, como as infecções, podem influenciar o aparecimento ou progressão do vitiligo e que os resultados apresentados foram observados em amostras pontuais de pacientes, o que não os torna universalizantes, mas consideráveis para a ampliação de conhecimento como fatores de risco.

Observou-se ainda, que o perfil epidemiológico dos pacientes avaliados é semelhante aos relatados em outras publicações e poucos estudos epidemiológicos analisam mais de um agente infeccioso na mesma amostra populacional existindo poucos dados atualizados para o Estado de Goiás ou para a cidade de Goiânia, reforçando a importância dos resultados apresentados neste estudo.

Vale ressaltar, a necessidade de estudos futuros com maior número amostral e, concluímos que na clínica, o rastreamento sorológico para esses patógenos, principalmente *Toxoplasma gondii* e vírus da herpes simples pode ser útil a ser pesquisado em pacientes com comprometimento do sistema imunológico e em pacientes com o diagnóstico de vitiligo.

ACHENBACH, R. E. Fenómeno de Koebner. **Rev. argent. dermatol.** vol.92 no.3 Ciudad Autónoma de Buenos Aires jul./set. 2011.

ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. **Journal of the American Academy Dermatology**, v.65, n.3, p. 473–491, 2011.

AMER, Abdulrahman AA; GAO, Xing-Hua. Quality of life in patients with vitiligo: an analysis of the dermatology life quality index outcome over the past two decades. **International journal of dermatology**, 2016.

ANTELO, D. Pereira; FILGUEIRA, A. Lima; CUNHA, José Marcos T. Aspectos imunopatológicos do vitiligo. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 36, n. 3, p. 125-136, 2008.

ARYA, V. et al. Vitiligo at injection site of PEG-IFN- α 2a in two patients with chronic hepatitis C: case report and literature review. **Case reports in dermatology**, v. 2, n. 2, p. 156-164, 2010.

AVELINO, Mariza Martins et al. Risk factors for Toxoplasma gondii infection in women of childbearing age. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 164-174, 2004.

AKAR, Ahmet; YAPAR, Mehmet; AKSAKAL, A. Burhan. Vitiligo: cytomegalovirus associated?. **Pigment cell research**, v. 15, n. 2, p. 134-134, 2002.

AZAMBUJA, Taís Weber Furlanetto de; BERCINI, Francesca; FURLANETTO, Tânia Weber. Herpes simples: revisão da literatura. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 45, n. 2, p. 43-46, 2004.

BARNES L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. **Dermatol Clin** 6: 229-239, 1988.

BONIFACE, K.; TAÏEB, A.; SENESCHAL, J. New insights into immune mechanisms of vitiligo. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v. 151, n. 1, p. 44-54, 2016.

BOLOGNA, J. L.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatology**, vol. II. 2012.BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Principais Síndromes Infecciosas – Módulo 1. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Principais Síndromes Infecciosas – Módulo 1. Brasília: ANVISA, 2004.

BYSTRYN, JC. Imunomechanisms in Vitiligo. Clinics in Dermatology 1997;15:853-61. Bologna, J.; Jorizzo, J.; Schaffer, J. **Dermatology**. Tradução [Philadelphia]: Elsevier Saunders, 2012.

CARAMEZ, C.; GIÁCOMO, Carla G.; SCHMIDT, Lara F.; SANTOS, Luciana K.V.M.; LUPI, Omar. Alterações dermatológicas na hepatite C. **Rev Bras Clin Med**, 2010;8:53-5

CLEMENS, Sue Ann Costa; FARHAT, Calil Kairalla. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 726-734, Aug. 2010.

CORREIA, Karyne Mariano Lira; BORLOTI, Elizeu. Convivendo com o vitiligo: uma análise descritiva da realidade vivida pelos portadores. **Acta comport. Guadalajara**, v. 21, n. 2, p. 227-240, 2013.

DEBONI, Luciane Monica. Estudo da incidência da infecção por citomegalovírus **através da técnica de antígenoemia, em uma coorte de pacientes transplantados renais**. 2002.

DIAS, V. G. **Análise de polimorfismos dos genes KIR e HLA em pacientes com vitiligo**. Porto Alegre: UFRGS, 2014. (Dissertação de mestrado).

DINIZ, Melissa. *Hipersensibilidade é uma resposta imunológica exagerada a determinado antígeno*, 2014. Disponível em: <http://slideplayer.com.br>. Acesso em: 28 jul. 2016.

DUBEY, Jitender Prakask. **Toxoplasmosis of animals and humans**. CRC press, 2016.

ELETHAWI, A. M. D. Herpes Simplex Labialis Virus is a Risk Factor for Vitiligo (Post- Herpes Simplex Labialis Vitiligo). **The Iraqi post graduate medical journal**, vol.12, nº. 3, 2013, p. 401-403.

EZZEDINE, K. Et al. Revised classification/ nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell Melanoma Res**. vol. 25 p. E1-13, 2012.

ERICKSON, et al. Regulation of melanoblast migration and differentiation. In: The pigmentary system physiology and pathophysiology. **New York: Oxford University Press** 75-95, 1998.

FACHINELLI, Leticia Rita et al.; Hepatitis C and cutaneous alterations **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 45(6):770-773, Nov-Dec, 2012.

FERREIRA, Antonio Walter; ÁVILA, Sandra do Lago Moraes de. **Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes: correlação clínico-laboratorial**. Guanabara Koogan, 2001.

FIALHO, C. G.; et al. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p.1-23, 2009.

GALARZA, Carlos et al. Infección cutánea por citomegalovirus y radicales libres en el mecanismo patogénico del vitiligo generalizado de inicio reciente. **Dermatol Peru**, v. 20114, n. 21, p. 2, 2011.

GETTS, Daniel R. et al. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. **Immunological reviews**, v. 255, n. 1, p. 197-209, 2013.

GRIMES, Pearl E.; SEVALL, J. Sanders; VOJDANI, Aristo. Cytomegalovirus DNA identified in skin biopsy specimens of patients with vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, n. 1, p. 21-26, 1996.

HAMADAH, Issam et al. Interferon-induced vitiligo in hepatitis C patients: a case series. **International Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 49, n. 7, p.829-833, 21 jun. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04443.x>.

HERPS. SBD - **Sociedade Brasileira de Dermatologia** –. s/d. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/doencas/herpes>. Acesso em: ago. 2016.

JADALI, Z. et al. Hepatitis C virus antibodies and vitiligo disease. **Iranian Journal of Public Health**, v. 34, n. 1, p. 23-26, 2005.

JUNQUEIRA, Jader Joel Machado; SANCHO, Talita Marçal; SANTOS, Vera Aparecida dos. Citomegalovírus: revisão dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento. **NewsLab**, v. 86, n. 1, p. 88-104, 2008.

KEMP, EH. et al. Autoimmune aspects of vitiligo. **Autoimmunity**. 34:65-77. 2001.

LAN, J. et al. HSV-1 Enters Melanocytes and Induces their Apoptosis. **Pigmentary Disorders** 3:246, 2016. doi:10.4172/2376-0427.1000246

LADDHA NC, DWIVEDID M, MANSURI MS, Singh M, Patel HH, et al. Association of Neuropeptide Y, Interleukin-1B, Genetic Variants and Correlation of IL1B Transcript Levels with Vitiligo Susceptibility. **PLoS ONE** 9(9): e107020, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0107020

LOMBELLO, Luciane Faleiro. Crianças com vitiligo:um estudo clinic e comparative entre dois tipos de tratamento. Campinas, SP:2002. (Disseertação de mestrado).

LIU, Z. et al. No Evidence of HSV Presence in the Serum of Vitiligo Patients. **J Pigment Disord** 1:1-3, 2014.

MATOS, S. B.; et al. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Rev.Saúde.Com* 2011; 7(1): 44-57.

MAKVANDI, M. et al. Studies on cytomegalovirus infection and antinuclear antibody among vitiligo patients in Ahwaz Iran. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI)**, v. 14, n. 3, p. 203-205, 2000.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; et al. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. **Londrina: Eduel**, 2010.

MIOT, L. D. B. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais brasileiros de dermatologia**, São Paulo, v. 6, n. 84, p.623-635, 30 jun. 2009.

MIURA, Takako; YAMAMOTO, Toshiyuki. Post-herpetic vitiligo in an 8-year-old boy with immunosuppression. **The Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.270-271, 31 jan. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/1346-8138.12407>.

MOHAMMED, Ghada F.; GOMAA, Amal HA; AL-DHUBAIBI, Mohammed Saleh. Highlights in pathogenesis of vitiligo. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 3, n. 3, p. 221, 2015.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet, London**, v. 363, n. 9425, p.1965-1976, 2004.

NATH SK, MAJUMDER PP, NORDLUNDJJ. Genetic epidemiology of vitiligo: Multi locus recessivity cross-validated. **Am J Hum Genetic** 55: 981 -990, 1994.

ONUNU, A. N. and KUBEYINJE, E. P. (2003), Vitiligo in the Nigerian African: a study of 351 patients in Benin City, Nigeria. **International Journal of Dermatology**, 42: 800–802. doi:10.1046/j.1365-4362.2003.01908.x

PERDONCINI, G.; et al. Prevalência de Toxoplasma gondii em aves e suínos: um problema para a saúde pública. **Unoesc & Ciência - ACBS, Joaçaba**, v. 1, n. 1, p. 57-64, 2010.

PICCOLO, G et al. “Myasthenia Gravis in a Patient with Chronic Active Hepatitis C during Interferon-Alpha Treatment.” **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry** 60.3: 348, 1996.

PRIMO, J; MERINO, C; GÓMEZ Belda, AB. Vitiligo and alopecia in patients with chronic hepatitis C treated with alpha interferon associated or not with ribavirin. **Gastroenterol Hepatol.**,2000 Aug-Sep;23(7):362-3.

REDHER J, SOUTO LRM, ISSA CMBM, PUZZI MB. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Med J.** 2004; 122(1): 22-5.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 7, p. 865-876, 2007.

RODRIGUES, ISOLINA MARIA XAVIER. **Avaliação de componentes da resposta imunológica de recém-nascidos expostos intraútero ao Toxoplasma gondii.** 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ROSA, Eliane Cristina; NATALI, Maria Raquel Marçal. Vitiligo: Um problema que não pode passar em branco. **Revista Saúde e Pesquisa.** Paraná, v. 2, n. 1, p. 119-126, jan./ abr. 2009.

SANTOS, Glauber Eduardo de Oliveira. *Cálculo amostral: calculadora on-line.* Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: 01/07/2015.

SERRA, Fabiana C. et al. Soroprevalência de citomegalovírus em gestantes brasileiras de classe socioeconômica favorecida. **DST J Bras Doenças Sex Transm**, v. 21, n. 1, p. 12-5, 2009.

SHAH, Hita et al. Clinical and sociodemographic study of vitiligo. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 74, n. 6, p. 701, 2008.

SHUKLA, R. C. et al. Evidence for cytomegalovirus infection as the cause of vitiligo. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 62, n. 2, p. 132, 1996

SOUTO LRM, REDHER J, VASSALLO J, CINTRA ML, KRAEMER MHS, PUZZI MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med J.** 2006; 124(2): 71-6.

STEINER, Denise; STEINER, Tatiana; COZZI PIRES DE OLIVEIRA DIAS, Maria Carolina. Análise da sorologia para citomegalovírus em pacientes com vitiligo. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 77, n. 4, p. 411-415, 2002.

STEINER, V.; et al. Vitiligo. *An. Bras. Dermatol.*, vol.79, nº3, Rio de Janeiro, May/Jun. 2004.

TARLÉ RG Nascimento L.M Mira M.T Castro C.C. Vitiligo -part. 1. **An Bras Dermatol.**v.89, n.3, p.461-70, 2015.

TENTER, A. M.; et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TIZARD.I.R. **Imunologia veterinária**. 6^o ed. São Paulo: Roca.2002.

TOKER, S. C. et al. Is there any relation between vitiligo and cytomegalovirus?. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 1, p. 141-142, 2007.

VERA, C. I.; DÍAZ, M. C. Vitiligo, con énfasis en su variante inflamatoria. **Revista argentina de dermatología**, v. 90, n. 1, p. 72-84, 2009.

VIZANI, R. O.; et al. O vitiligo: uma doença orgânica e psíquica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, Vol.6, n.3, p.47-52, Mar./Mai. 2014.

YAGHOUBI, Reza; OMIDIAN, Mohammad; BAGHERANI, Nooshin. Vitiligo: a review of the published work. **The Journal of dermatology**, v. 38, n. 5, p. 419-431, 2011.

YAMAMOTO, T; NISHIOKA, K. Vitiligo vulgaris associated with hepatitis C virus. **J Dermatol.**, 2000 Jun;27(6):416-7

ZHANG, Yuhui et al. The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0163806, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0163806>

Apêndice 1 : Artigo submetido - Analysys of IgG antibodies against *Toxoplasma gondii*, Herpes Simplex vírus types 1 and 2, Cytomegalovirus, and Hepatites C vírus in vitiligo.

Apêndice 2 : Questionário/ entrevista com pacientes portadores de vitiligo.

Apêndice 1 : Artigo submetido - Analysys of IgG antibodies against *Toxoplasma gondii*, Herpes Simplex vírus types 1 and 2, Cytomegalovirus, and Hepatitis C vírus in vitiligo.

ANALYSIS OF IgG ANTIBODIES AGAINST *TOXOPLASMA GONDII*, HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1 AND 2, CYTOMEGALOVIRUS, AND HEPATITIS C VIRUS IN VITILIGO

Rachel de Paula Santos Ribeiro¹, Kenia Alves Pereira Lacerda², Lídia Andreu Guillo^{3*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil.

² Department of Biology, Federal Institute of Goiás (IFG), Jataí, Goiás, Brazil.

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil. ORCID 0000-0003-3220-6890.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all subjects who kindly agreed to participate in the study and allowed blood samples to be drawn. This study was supported in part by a grant from the Postgraduate Program of Health Sciences at *Universidade Federal de Goiás*.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interests to declare.

*Address correspondence to:

Lídia Andreu Guillo
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Avenida Esperança –s/n
Campus Samambaia
CEP: 74690-900
Goiânia, Goiás - Brazil
lidia.guillo@gmail.com

ABSTRACT

Background: Autoimmunity may be involved in the pathogenesis of vitiligo. Since pathogen infections may trigger autoimmunity, we compared the frequencies of IgG immunoglobulins against selected pathogens in patients with vitiligo and control subjects.

Methods: Serum from 51 patients with vitiligo and 51 controls were tested for anti-*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) IgG, anti-herpes simplex types 1 and 2 (HSV-1/2) IgG, anti-cytomegalovirus (CMV) IgG, and anti-hepatitis C virus IgG.

Results: The frequencies of IgG positivity for anti-*T. gondii*, anti-HSV-1/2, and anti-CMV IgG antibodies in all participants were 63%, 84%, and 87%, respectively. Anti-hepatitis C virus IgG was negative in all samples. Positive anti-*T. gondii* IgG was detected in plasma of 39 (78%) patients with vitiligo and 25 (49%) controls (odds ratio [OR] 3.68, 95% confidence interval [CI] 1.55-8.76, $p=0.0036$). Anti-HSV-1/2 IgG was detected in plasma of 47 (92%) patients with vitiligo and 38 (76%) controls (OR 3.71, 95% CI 1.11-12.44, $p=0.031$). Differences in frequencies of positive results for anti-*T. gondii* IgG and anti-HSV-1/2 IgG were only significant in samples from female patients with vitiligo when compared with controls ($p=0.036$ and 0.024 , respectively). Anti-CMV IgG was detected in samples from 46 patients with vitiligo (90%) and 41 (84%) controls ($p=0.384$).

Conclusions: Women with vitiligo presented higher frequencies of positive IgG antibodies against *T. gondii* and HSV-1/2 and similar frequencies of positive IgG antibodies against CMV when compared with age- and gender-matched controls. Since *T. gondii* and HSV-1/2 infections can trigger autoimmunity, past exposure to these pathogens may be implicated in vitiligo development.

Keywords: Vitiligo; Pathogens; Virus; Serology

INTRODUCTION

Vitiligo is a hypomelanosis characterized by a progressive loss of melanocytes [30]. In a recent meta-analysis, the prevalence of vitiligo has been reported at 0.2% and 1.8% in studies conducted in population- and hospital-based cohorts, respectively [32]. The cause of vitiligo is unclear, and among multiple mechanisms suggested to be involved in the disappearance of melanocytes, the autoimmune and inflammatory theory is today the most accepted hypothesis [3, 20].

Many autoimmune disorders may be triggered by viruses, bacteria or parasites [22]. Whether infectious agents are implicated in the pathogenesis of vitiligo is still under intense investigation.

The first time that cytomegalovirus (CMV) was associated with vitiligo was through identification of CMV DNA in skin biopsies from 11 out of 29 patients with vitiligo in 1996 [9]. At that same year, Shukla identified by cytology and immunofluorescence the cytopathic effect of CMV in pure epidermal preparations of patients with vitiligo [23]. IgM antibodies against CMV have also been reported in seven out of 26 serum samples from patients with vitiligo [14]. However, these results have not been further confirmed. Specifically, Akar et al. [1] found no CMV DNA sequences in skin biopsies of 34 patients with vitiligo, whereas Toker et al. found CMV DNA in only one out of a total of 12 punch biopsies in patients with depigmented skin [28], and Steiner et al. (2002) found no correlation between vitiligo and positive CMV serology [26].

Additionally, the virus associated with herpes simplex labialis has also been reported as being a risk factor for vitiligo [6]. Vitiligo was recently reported in an 8-year-old boy with acute lymphocytic leukemia after he manifested herpes zoster [16]. In another report, vitiligo was found to be exacerbated after a herpes zoster infection [27].

A study has reported vitiligo in five patients with positive hepatitis C virus (HCV) infection [31], while others have described the appearance of vitiligo after treatment with interferon for HCV infection [5, 10, 17, 18]. In contrast, Akbayr et al. have shown that the seroprevalence of HCV in vitiligo was not different from that in a control group of blood donors in Turkey [2].

Hence, the involvement of viruses in triggering vitiligo is still a subject of many controversies. In an attempt to further investigate this issue, the present study analyzed the IgG serology for herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1/2), CMV, and HCV in a group of patients with vitiligo and another of age- and matched control subjects. In order to test the hypothesis that the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) could trigger vitiligo, the IgG serology for this parasite was also assessed in this study.

METHODS

This study included 51 patients with vitiligo attending the Alternative Medicine Hospital in the city of Goiânia (Goiás, Brazil) and 51 age- and gender-matched controls. According to a revised classification [7], vitiligo was clinically characterized as either segmental or nonsegmental. The control group comprised healthy blood donors, whose samples were obtained from the blood bank center based at Santa Casa de Misericórdia, in the city of Goiânia. The protocol of the study was approved by the Research Ethics Committee at the Federal University of Goiás and Santa Casa de Misericórdia Hospital (protocols number 47956815.2.0000.5083 and 47956815.2.3001.5081, respectively).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed with Symbiosys[®] kit reagents (Symbiosis Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brazil) was used to detect IgG immunoglobulins against CMV (anti-CMV IgG), HSV-1/2 (anti-HSV-1/2 IgG), *T. gondii* (anti-*T. gondii* IgG), and hepatitis C (anti-HCV IgG) according to the manufacturer's instructions. The results were interpreted with respect to the samples' optical density (OD) and cutoff values. Samples with an OD value below 0.9 were considered negative, and those with a value above 1.1 were considered positive.

Blood sampling

Peripheral venous blood was collected into 5 mL Vacutainer[®] tubes, and the serum was separated by centrifugation at 1,800 g for 5 minutes and stored at -80°C until analysis.

Statistical analysis

Data were analyzed using Prism 5 for Windows, version 5.01 (GraphPad Software, San Diego California, USA). Since Fisher's test yields an exact p value and works well with small samples sizes [19], it was used to analyze possible associations between vitiligo and exposure to *T. gondii*, HSV, CMV, and HCV.

RESULTS

The studied population consisted predominantly of women (64.7%) of a total of 51 vitiligo patients and 51 age- and gender-matched controls. The age of the participants followed a normal distribution in the overall sample (vitiligo and controls) and had a mean value (\pm standard deviation) of 44.2 ± 10.1 years.

Distribution of serological results in the overall population

The frequencies of anti-*T. gondii* IgG, anti-HSV-1/2 IgG, anti-CMV IgG, and anti-HCV IgG antibodies are shown in Table 1.

TABLE 1

Table 2 shows the distribution of the serological results in participants with vitiligo and controls. Positive anti-*T. gondii* IgG antibodies were detected in 39 (78%) samples of subjects with vitiligo and 25 (49%) samples of controls ($p=0.0036$). Also, anti-HSV-1/2 IgG antibodies were found in 47 (92%) plasma samples in participants with vitiligo and in 38 (76%) samples in controls ($p=0.031$). Additionally, anti-CMV IgG antibodies were found in 46 (90%) samples of patients with vitiligo compared with 41 (84%) samples of controls ($p = 0.384$).

TABLE 2

Distribution of serological results according to gender

Table 3 presents the distribution of the IgG serology for *T. gondii*, HSV-1/2, and anti-CMV among participants with vitiligo and controls according to gender. In the vitiligo group, 27 (84%) samples from female participants with vitiligo were positive for *T. gondii* compared with only 16 (48%) in female participants serving as controls ($p=0.036$), while 12 samples (67%) from male participants were positive for *T. gondii* compared with nine (50%) in the male control group ($p=0.500$). Additionally, 33 (100%) samples from female participants with vitiligo were positive for HSV-1/2 compared with 27 (84%) in controls ($p=0.024$), while 14 samples (78%) from male patients with vitiligo were positive for anti-HSV-1/2 compared with 11 (61%) in male controls ($p=0.471$). In regards to the anti-CMV serology, samples from female and male patients with vitiligo were shown not to be significantly different than those from female and male participants serving as controls ($p>0.05$).

TABLE 3

DISCUSSION

The present study showed that the overall frequency of plasma anti-*T. gondii*, anti-HSV-1/2, and anti-CMV IgG antibodies in the entire cohort of participants was 63%, 84%, and 87%, respectively. Anti-HCV IgG antibodies were not found in any participant. Although this was not an epidemiological study and direct comparisons should not be attempted, the frequencies observed are more or less consistent with those reported in population studies.

In Brazil, the seroprevalence of anti-*T. gondii* IgG among pregnant women has been reported at 62% in the state of São Paulo [8] and 68.5% in the state of Sergipe [11]. The results of the present study concerning the seroprevalence of *T. gondii* are also aligned with a prior study (67.7%) in pregnant women in the city of Goiânia [21].

The seroprevalence of IgG antibodies against the HSV type 1 ranged from 47% in Fortaleza to 73.3% in Manaus and increased with age (70.1% to 83.8% from the ages of 11-15 years to 31-40 years, respectively) [4]; these results are also in line with our participants, whose mean age was 45 years.

The prevalence of CMV IgG antibodies among blood donors has been reported at 96.4% in the state of Santa Catarina [25] and 87.9% in the state of Bahia [15]. Considering the importance of local studies concerning CMV infection, the frequency of anti-CMV antibodies found in the present study is also consistent with other national studies.

It is interesting to note that few epidemiological studies have analyzed more than one infectious agent in the same population, as we have done, reinforcing the importance of the results presented in this study.

The frequencies of positive anti-HSV-1/2 IgG were also significantly higher in participants with vitiligo than controls. Also, the difference in the frequencies of anti-HSV-1/2 between the vitiligo and

56 control groups was significant only in female participants with vitiligo. Few studies have investigated the
57 frequency of anti-HSV-1/2 in patients with vitiligo. Liu et al. found no evidence of anti-IgG antibodies
58 against the HSV-1/2 in 90 patients with vitiligo compared with 150 pregnant women who served as
59
60

61
62
63
64
65

1 controls [13]. More recently, Lan et al. showed evidence that the HSV-1 enters the melanocytes and
2 induces apoptosis, leading these authors to hypothesize that HSV-1 infection might be a trigger for
3 vitiligo [12]. In contrast, Grimes et al. were unable to find herpes simplex DNA in biopsy specimens
4 obtained from patients with vitiligo [9].
5

6 In relation to the frequency of anti-CMV IgG, this study found no significant difference between
7 the vitiligo and control groups. These results dispute those obtained by Grimes et al., who found CMV
8 DNA in 11 out of 29 skin biopsies from patients with vitiligo [9] but are in accordance those by Toker et
9 al. who found CMV DNA in only one out of 12 patients [28]. Akar et al. also suggested that CMV is
10 unlikely to have any role in the pathogenesis of vitiligo [1], which is in line with our results.
11

12 The present study found that the frequency of positive anti-*T. gondii* IgG was significantly
13 higher in participants with vitiligo compared with control ones. To the best of our knowledge, no previous
14 study in the literature has addressed this issue. Additionally, the difference in the frequencies of anti-*T.*
15 *gondii* was significant only in female participants with vitiligo when compared with female controls.
16

17 In conclusion, *T. gondii* IgG and HSV-1/2 IgG were significantly more frequent in patients with
18 vitiligo, especially in women, when compared with age- and gender-matched controls. The small sample
19 size is undoubtedly a limitation of our study. However, a distinctive strength of our study was the
20 inclusion of an age- and gender-matched population as controls, since the prevalence of infection by *T.*
21 *gondii* and cytomegalovirus varies according to these parameters.
22

23 A recent finding that the HSV-1 is able to infect murine melanocytes *in vitro* and induce
24 apoptosis is an attractive hypothesis to explain the disappearance of melanocytes [12] and development of
25 vitiligo. However, the promotion of an autoimmune-mediated destructive process by *T. gondii* infection
26 in vitiligo still needs to be clarified.
27

28 The association between 25-hydroxyvitamin D (25-[OH]D) deficiency and an increased risk of
29 several infectious diseases [29] and the recent findings of the presence of low serum levels of vitamin D
30 in vitiligo [24] was one of the reasons that led us to speculate a possible link between pathogen infection
31 and vitiligo. Serological screening for these pathogens in patients with vitiligo (mainly *T. gondii* and
32 HSV-1/2) might be useful in clinical practice to help physicians decide whether vitamin D should be
33 prescribed to these patients.
34

35 **ETHICAL APPROVAL**

36 All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical
37 standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration
38 and its later amendments or comparable ethical standards.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

REFERENCES

- [1] Akar A, Yapar M, Aksakal AB (2002) Vitiligo: cytomegalovirus associated? *Pigment Cell Res* 15:134
- [2] Akbayir N, Gokdemir G, Mansur T, Sokmen M, Gunduz S, Alkim C, Barutcuoglu B, Erdem L (2004) Is there any relationship between hepatitis C virus and vitiligo? *J Clin Gastroenterol* 38:815-817. doi:00004836-200410000-00019 [pii]
- [3] Boniface K, Taieb A, Seneschal J (2015) New insights into immune mechanisms of vitiligo. *G Ital Dermatol Venereol* 151:44-54. doi:R23Y9999N00A150097 [pii]
- [4] Clemens SA, Farhat CK (2010) [Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil]. *Rev Saude Publica* 44:726-734. doi:S0034-89102010000400017 [pii]
- [5] Dumoulin FL, Leifeld L, Sauerbruch T, Spengler U (1999) Autoimmunity induced by interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. *Biomed Pharmacother* 53:242-254. doi:S0753-3322(99)80095-X [pii] 10.1016/S0753-3322(99)80095-X
- [6] Elethawi AMD (2013) Herpes simplex labialis is a risk factor for vitiligo (post-herpes simplex labialis vitiligo). *Iraqi Postgrad Med J* 12:401-403
- [7] Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CC, Goh BK, Anbar T, Silva de Castro C, Lee AY, Parsad D, van Geel N, Le Poole IC, Oiso N, Benzekri L, Spritz R, Gauthier Y, Hann SK, Picardo M, Taieb A (2012) Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:E1-13. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00997.x
- [8] Goncalves MA, Matos Cde C, Spegorin LC, Oliani DC, Oliani AH, Mattos LC (2010) Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, Sao Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis* 14:601-605. doi:S1413-8670(10)70118-5 [pii]
- [9] Grimes PE, Sevall JS, Vojdani A (1996) Cytomegalovirus DNA identified in skin biopsy specimens of patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 35:21-26. doi:S0190-9622(96)90490-9 [pii] 10.1016/S0190-9622(96)90490-9
- [10] Hamadah I, Binamer Y, Sanai FM, Abdo AA, Alajlan A (2010) Interferon-induced vitiligo in hepatitis C patients: a case series. *Int J Dermatol* 49:829-833. doi:IJD4443 [pii] 10.1111/j.1365-4632.2009.04443.x
- [11] Inagaki AD, Cardoso NP, Lopes RJ, Alves JA, Mesquita JR, de Araujo KC, Katagiri S (2014) [Spatial distribution of anti-toxoplasma antibodies in pregnant women from Aracaju, Sergipe, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 36:535-540. doi:S0100-72032014001200535 [pii]
- [12] Jing Lan, Yuxiao Hong, Ruiqun Qi, Song Zheng and Xing-Hua Gao (2016) HSV-1 Enters Melanocytes and Induces their Apoptosis. *J Pigment Disord* 3: 1-5. doi: 10.4172/2376-0427.1000246
- [13] Liu Z, Qi RQ, Zhao LS, Sun XD, Dong DY, Li GH, Lv YN, Geng L, Chen HD, Gao XH (2014) No Evidence of HSV Presence in the Serum of Vitiligo Patients. *J Pigment Disord* 1:1-3
- [14] Makvandi M, Shahba N, Radmanesh N, Abbasi EM (2000) Studies on cytomegalovirus infection and antinuclear antibody among vitiligo patients in Ahwaz Iran. *Med J Islam Repub Iran* 14:203-205
- [15] Matos SB, Meyer R, Lima FWM (2010) Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemater* 32:45-49. Doi: 10.1590/S1516-

84842010005000009

- 1 [16] Miura T, Yamamoto T (2014) Post-herpetic vitiligo in an 8-year-old boy with immunosuppression. *J*
2 *Dermatol* 41:270-271. doi:10.1111/1346-8138.12407
- 3 [17] Nouri K, Busso M, Machler BC (1997) Vitiligo associated with alpha-interferon in a patient with
4 chronic active hepatitis C. *Cutis* 60:289-290
- 5 [18] Primo J, Merino C, Gomez Belda AB (2000) [Vitiligo and alopecia in patients with chronic hepatitis
6 C treated with alpha interferon associated or not with ribavirin]. *Gastroenterol Hepatol* 23:362-363
- 7 [19] Prism 5 for Windows version 5.01 (GraphPad Software, San Diego California USA). Available at
8 www.graphpad.com. Accessed March 4, 2017
- 9 [20] Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH (2007) Autoimmunity as an aetiological factor in
10 vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21:865-876. doi:JDV2228 [pii]
11 10.1111/j.1468-3083.2007.02228.x
- 12 [21] Sartori AL, Minamisava R, Avelino MM, Martins CA (2011) [Prenatal screening for toxoplasmosis
13 and factors associated with seropositivity of pregnant women in Goiania, Goias]. *Rev Bras Ginecol*
14 *Obstet* 33:93-98. doi:S0100-72032011000200007 [pii]
- 15 [22] Sener AG, Afsar I (2012) Infection and autoimmune disease. *Rheumatol Int* 32:3331-3338.
16 doi:10.1007/s00296-012-2451-z
- 17 [23] Shukla RC (1996) Evidence for cytomegalovirus infection as the cause of vitiligo. *Indian J Dermatol*
18 *Venereol Leprol* 62:132-133. doi:ijdv1_1996_62_2_132_4350 [pii]
- 19 [24] Silverberg JI, Silverberg AI, Malka E, Silverberg NB (2010) A pilot study assessing the role of 25
20 hydroxy vitamin D levels in patients with vitiligo vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 62:937-941. doi:S0190-
21 9622(09)01491-1 [pii] 10.1016/j.jaad.2009.11.024
- 22 [25] Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C (2010) Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies
23 in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:359-361. doi:S0037-86822010000400004
24 [pii]
- 25 [26] Steiner D, Steiner T, Dias MCCP 2002 [Analysis of CMV serology in patients with vitiligo]. *An*
26 *Bras Dermatol* 77:411-415
- 27 [27] Terao M, Tanemura A, Katayama I (2012) Vitiligo exacerbated after herpes zoster. *J Dermatol*
28 39:938-939. doi:10.1111/j.1346-8138.2012.01514.x
- 29 [28] Toker SC, Sarycaoglu H, Karadogan SK, Mistik R, Baskan EB, Tunaly S (2007) Is there any relation
30 between vitiligo and cytomegalovirus? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21:141-142. doi:JDV1822 [pii]
31 10.1111/j.1468-3083.2006.01822.x
- 32 [29] Watkins RR, Lemonovich TL, Salata RA (2015) An update on the association of vitamin D
33 deficiency with common infectious diseases. *Can J Physiol Pharmacol* 93:363-368. doi:10.1139/cjpp-
34 2014-0352
- 35 [30] Yaghoobi R, Omidian M, Bagherani N (2011) Vitiligo: a review of the published work. *J Dermatol*
36 38:419-431
- 37 [31] Yamamoto T, Nishioka K (2000) Vitiligo vulgaris associated with hepatitis C virus. *J Dermatol*
38 27:416-417
- 39 [32] Zhang Y, Cai Y, Shi M, Jiang S, Cui S, Wu Y, Gao XH, Chen HD (2016) The Prevalence of
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

TABLES

TABLE 1. Frequency of anti-*Toxoplasma gondii*, anti-herpes simplex 1/2, anti-cytomegalovirus IgG, and anti-hepatitis C virus IgG antibodies among participants of the study.

	Positive	Negative	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	64 (63)	37 (37)	101 (100) ^a
Anti-herpes simplex 1/2	85 (84)	16(16)	101 (100) ^a
Anti-cytomegalovirus	87 (87)	13 (13)	100 (100) ^b
Anti-hepatitis C virus	0 (0)	102 (100)	102 (100)

^{a,b}Samples with one or two undetermined values.

TABLE 2. Distribution of the serological results of participants with vitiligo and controls according to the presence or absence of IgG antibodies against infectious agents.

IgG immunoglobulin	Vitiligo	Control	OR (95% CI)	p value*
	n (%)	n (%)		
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>			3.68 (1.55-8.76)	0.0036
Positive	39 (78)	25 (49)		
Negative	11 (22)	26 (51)		
Anti-herpes simplex 1/2			3.71 (1.11-12.44)	0.031
Positive	47 (92)	38 (76)		
Negative	4 (8)	12 (24)		
Anti-cytomegalovirus			1.80 (0.54-5.93)	0.384
Positive	46 (90)	41 (84)		
Negative	5 (10)	8 (16)		

Abbreviations: OR - odds ratio; 95% CI - 95% confidence interval. *Fisher's exact test.

BLE 3. Distribution of the immunoglobulin G (IgG) serology for *Toxoplasma gondii*, herpes simplex

1/2, and cytomegalovirus among study participants with vitiligo and control groups according to gender.

Gender	<i>Toxoplasma gondii</i> IgG			Herpes simplex 1/2 IgG			Cytomegalovirus IgG		p*
	Vitiligo n (%)	Control n (%)	p	Vitiligo n (%)	Control n (%)	p	Vitiligo n (%)	Control n (%)	
Female			0.036			0.024			0.672
Positive	27 (84)	16 (48)		33 (100)	27 (84)		31 (94)	29 (88)	
Negative	5 (16)	17 (52)		0 (0)	5 (16)		2 (6)	4 (12)	
Male			0.500			0.471			
Positive	12 (67)	9 (50)		14 (78)	11 (61)		15 (83)	12 (75)	
Negative	6 (33)	9 (50)		4 (22)	7 (32)		3 (17)	4 (25)	
									0.682

*Fisher's exact test



Apêndice 2 : Questionário/ entrevista com pacientes portadores de vitiligo.

QUESTIONÁRIO.

I Etapa

Essa etapa será respondida pelo médico assistente ou pelas informações dos prontuários.

1. Classificação do Tipo de Vitiligo

Localizado

- Segmentar
- Focal
- Mucosa

Generalizado

- Vulgar
- Acrofacial
- Misto
- Universal

2. Possui Fenômeno de

Koebner? () Sim () Não

II Etapa

Aplicada para o voluntário da pesquisa

1. Você notou que o surgimento de manchas na pele foi após algum estado gripal ou correlacionado com alguma doença?

() Sim () Não

2. Você costuma ficar exposto ao sol? () Sim () Não

3. Já teve alguma queimadura decorrente da exposição excessiva ao sol? () Sim () Não

4. Essas manchas descoloridas estão lhe causando outros sintomas? () Sim () Não

5. Você já utilizou algum destes tratamentos? () Cremes Corticoides

Vitamina D

Terapia de luz/lazer

Homeopatia

Fitoterapia

Enxerto

Micropigmentação

6. Você já utilizou um tratamento alternativo sem o consentimento do seu médico?

Sim . Qual ? _____

Não

7. Possui algumas das doenças listadas abaixo:

Imunossupressão (Doenças como HIV ou transplante de órgãos)

Asma/ e ou Rinite

Diabetes

Anemia

Lupus

Tuberculose

Depressão ou outras desordens psiquiátricas

8. Você sabe se já teve uma doença chamada Citomegalovírus? Sim Não

9. Existem pessoas na família com alguma alteração de pele?
Considere pessoas da família: pai, mãe e irmãos biológicos.

Sim

Não

10. Outras informações sobre o Vitiligo que queira nos relatar.

Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética

Anexo 2 TCLE

Anexo 3 Cálculo amostral



Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Vitiligo

Pesquisador: RACHEL RIBEIRO

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 47956815.2.0000.5083

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.702.488

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Vitiligo. Pesquisadora Responsável: RACHEL RIBEIRO. N. CAAE: 47956815.2.0000.5083. O estudo se propõe a pesquisar se existe correlação entre Citomegalovírus e Vitiligo. Trata-se de um estudo

restrospectivo através de banco de dados e prontuários. Serão revisados histórico de pacientes com história clínica de vitiligo, testes laboratoriais com o diagnóstico de citomegalovírus e analisados com outros dados correlacionados com a pesquisa. São co-participantes no estudo a SANTA CASA DE MISERICORDIA DE GOIANIA e o HOSPITAL DE MEDICINA ALTERNATIVA. Por se tratar de projeto do tipo guarda-chuva a pesquisadora afirma que haverá retenção de amostras para armazenamento em banco de dados.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a relação entre outras doenças e o Vitiligo.

Objetivo Secundário:

Estudar a etiopatogenia do vitiligo. Compreender a fisiopatogênese do vitiligo. Correlacionar processo imunológico com o aparecimento ou progressão do vitiligo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos desta pesquisa são mínimos, visto que os pacientes apenas serão submetidos a coleta de sangue e os exames serão executados sob

responsabilidade da pesquisadora que possui habilitação e experiência na área.

Os pacientes serão submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Resguardaremos o sigilo e confidencialidade dos resultados

dos exames dos pacientes, obedecendo princípios éticos da Resolução 466/12.

O material físico e biológico após a pesquisa será arquivado se autorizado e ficará sob a responsabilidade do pesquisador para subsidiar outras pesquisas.

Benefícios:

Contribuir para elucidar sobre a fisiopatogenia do vitiligo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho do estudo: Avaliar o fator imunológico e sua correlação com o Vitiligo.

Foram acrescentadas outras doenças para serem realizadas pelas seguintes metodologias: Reação em cadeia da polimerase, Capacidade antioxidante total, ELISA, FAN (fator anti núcleo) e um estudo através dos prontuários dos pacientes.

Critério de Inclusão:

Pacientes diagnosticados com vitiligo para amostras testes. Pacientes controles sem histórico de vitiligo.

Critério de Exclusão:

Pacientes sem diagnóstico de vitiligo para amostras testes. Pacientes controles com histórico de despigmentação da pele ou com Vitiligo.

Estudo retrospectivo por meio de banco de dados e prontuários, serão revisados histórico de pacientes com história clínica de vitiligo, testes laboratoriais com o diagnóstico de citomegalovírus e analisados com outros dados correlacionados com a pesquisa.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Esta pesquisa tem como hipótese: Infecções passadas causadas por doenças como Citomegalovírus, Toxoplasmose ou Herpes Vírus, pode desencadear o mecanismo patogênicos para vitiligo.

Serão utilizados as seguintes metodologias para elucidar a relação entre algumas doenças e Vitiligo. A saber: Reação em cadeia da polimerase, Capacidade antioxidante total, análise sorológica do CMV, Toxoplasmose e Herpes Vírus, FAN (fator anti núcleo) e um estudo pelos prontuários. Serão utilizados soro de pacientes diagnosticados com Vitiligo e que recebem tratamento no Hospital de Medicina Alternativa. Os pacientes serão informados sobre a pesquisa no consultório com o médico assistente que irá direcioná-lo até a enfermaria do Hospital, local que serão submetidos ao TCLE pelo pesquisador e a coleta do material biológico. Como controle, serão utilizados soro de pacientes sem história clínica de Vitiligo. Estes, serão encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas para submissão do TCLE pela pesquisadora e coleta do material biológico.

1. Reação em cadeia da polimerase – PCR Após a extração do DNA, as amostras serão submetidas à amplificação, visando à detecção da sequencia alvo pedida pelo exame. As reações serão realizadas segundo o protocolo proposto por SAMBROOK et al., 2001. O produto obtido será submetido à eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídio, sendo visualizado em seguida no transiluminador (VDS).

2. Capacidade antioxidante total Através de um método colorimétrico, uma análise quantitativa compara a cor produzida por uma reação química com uma cor padrão de acordo com a intensidade da cor produzida. No Kit de Ensaio de Capacidade antioxidante total, da Sigma-Aldrich Co, a concentração de uma combinação de pequenas moléculas de proteínas e antioxidantes, ou a concentração de apenas pequenas antioxidantes da molécula pode ser determinada Cu^{2+} e convertido em Cu^{+} As moléculas reduzidas de Cu^{+} são analisadas por uma sonda colorimétrica, dando um pico de absorvância aproximadamente 570 nm, que é proporcional à capacidade antioxidante total. O kit capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (variando 4-20 nmol / poço). Trolox, um análogo de vitamina E solúvel em água, serve como um padrão antioxidante.

3. Análise sorológica do CMV, Toxo e Herpes. Baseia-se na interação antígeno-anticorpo. Consiste num anticorpo conjugado a uma enzima capaz de modificar um cromógeno, através da reação com seu substrato específico, gerando colorações diferentes de acordo com o cromógeno.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.702.488

acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para dezembro de 2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_782035_E2.pdf	25/08/2016 15:59:46		Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.702.488

Outros	correcao_parecer.docx	25/08/2016 15:55:52	RACHEL RIBEIRO	Aceito
Outros	certificado.pdf	13/07/2016 19:06:04	RACHEL RIBEIRO	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	13/07/2016 18:59:40	RACHEL RIBEIRO	Aceito
Outros	Projeto_v2.pdf	29/09/2015 23:05:12	RACHEL RIBEIRO	Aceito
Outros	QUESTIONÁRIO VITILIGO.pdf	06/08/2015 11:38:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Vitiligo.pdf	06/08/2015 11:21:25		Aceito
Folha de Rosto	folha rosto ufg.jpg	29/07/2015 12:43:04		Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo de compromisso.jpg	29/07/2015 12:42:48		Aceito
Outros	TALE-UFG.doc	29/07/2015 12:30:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE -UFG.doc	29/07/2015 12:27:19		Aceito
Outros	Autorização HMA.jpg	29/07/2015 10:48:50		Aceito
Outros	Autorização SES.jpg	29/07/2015 10:48:18		Aceito
Outros	Declaração instituição co participante.pdf	06/07/2015 09:24:22		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 30 de Agosto de 2016

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Anexo 2 TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você/Sr./Sra. está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “ Existe correlação entre Citomegalovírus e Vitiligo?” Meu nome é Rachel de Paula Santos Ribeiro sou o pesquisador(a) responsável e minha área de atuação é a biomedicina. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence ao(à) pesquisador(a) responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pelo(s) pesquisador (es) responsável(is), via e-mail rachel.paulasantos@gmail.com e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, através do(s) seguinte(s) contato(s) telefônico(s): (62)9849 0912/(62) 3251 1495 Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

Sua participação não é obrigatória. O nosso estudo quer avaliar alguns fatores aos quais podem estar envolvidos no aparecimento do vitiligo. Caso aceite participar sua colaboração será muito útil para o estudo do Vitiligo. Sabemos da necessidade de estabelecer uma correlação entre as doenças, pois existem poucos dados sobre o assunto. O Vitiligo é uma doença, pouco conhecida e grande alvo de preconceito, pode provocar alterações emocionais, comprometendo a autoestima e interferindo nas relações sociais de indivíduo com vitiligo. Para tanto, solicitamos uma pequena quantidade de sangue.

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. 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

Também pedimos que respondesse a um breve questionário. Esperamos que o questionário fosse todo preenchido, e caso você sinta necessidade, ao lado de cada pergunta você pode adicionar alguma informação extra. Suas respostas são estritamente confidenciais e anônimas, sendo somente os profissionais médicos e pesquisadores terão acesso a elas. Se alguma questão for difícil de responder, responda o melhor que puder, entretanto, sem deixar de responder às questões.



Tanto a amostra de sangue como o questionário serão usados exclusivamente para pesquisas relacionadas ao estudo do vitiligo, e não serão usados em outras finalidades. Esse material permanecerá guardado no laboratório onde a pesquisa será feita e seu destino ao anonimato e a privacidade está garantida e sua identidade não será divulgada, sendo assim as informações obtidas terão caráter sigilosos.

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade, em nenhum momento os dados que identifique o paciente serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Caso o participante aceite a guarda do seu material biológico para futuras pesquisas sobre o Vitiligo, contribuindo para o avanço da ciência, terá que assinar o termo de guarda de material biológico em anexo. Para isso, o novo projeto terá novas submissões ao Comitê de Ética em Pesquisa e apenas terá continuidade se aprovado.

Sua amostra será responsabilidade da pesquisadora Rachel de Paula Santos Ribeiro e o material estará armazenado em um freezer a 20°C no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Goiás.

Concordando em participar desta pesquisa, esclarecemos que você não terá ajuda financeira decorrente de sua participação, pois não precisará despende financeiramente, apenas estará contribuindo muito com a pesquisa, uma vez que as informações obtidas a partir do sangue coletado nos fornecerão dados importantes para entender melhor as características do vitiligo e sua fisiopatogenia.

1.1. CONCENTIMENTO DA PARTE DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA



Eu,, inscrito(a) sob

o

RG/CPF/n.º de prontuário/n.º de matrícula, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado “Existe Correlação entre Citomegalovírus e Vitiligo?”. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido(a), pelo pesquisador(a) responsável Rachel de Paula Santos Ribeiro, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Assinatura por extenso do(a) participante

Assinatura por extenso do(a) pesquisador(a) responsável



1.2. TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais
o (a) Sr. (a)

_____ depositário (a) dos documentos em anexo e dos materiais biológicos (sangue), da Instituição UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, após ter tomado conhecimento do protocolo de pesquisa “Existe correlação entre Citomegalovírus e Vitiligo?”, vem na melhor forma de direito AUTORIZAR a pesquisadora Rachel de Paula Santos Ribeiro (CPF: 71932534272) armazenar os dados da pesquisa e o material biológico, ficando responsável pela guarda e custódia dos questionários e amostras que recebeu, resguardando o direito assegurando pela resolução CNS 466/2012.

Fica claro, que o fiel depositário pode, a qualquer momento, retirar sua AUTORIZAÇÃO e está ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional do pesquisador responsável.

Local e Data:

Nome e assinatura do sujeito ou
responsável: Pesquisador Responsável:



Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



Anexo 3 Cálculo amostral

Erro amostral: %

Nível de confiança: 90%
 95%
 99%

População:

Percentual máximo: %

Percentual mínimo: %

Amostra necessária:

