



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LETICIA FOGAGNOLO

LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO:
Análise histológica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência direta

*CUTANEOUS LUPUS ERYTHEMATOSUS:
Histological, immunohistochemical and direct immunofluorescence analysis*

CAMPINAS
2015

LETICIA FOGAGNOLO

LÚPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO:

Análise histológica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência direta

CUTANEOUS LUPUS ERYTHEMATOSUS:

Histological, immunohistochemical and direct immunofluorescence analysis

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, na área de concentração Anatomia Patológica.

Doctoral thesis presented at the School of Medical Sciences, State University of Campinas, as part of the requirements for obtaining the title of Doctor in Medical Sciences, concentration area of Pathology.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LETICIA FOGAGNOLO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LETÍCIA CINTRA

CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2011/50037-2; CNPq, 122906/2013-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F687 Fogagnolo, Leticia, 1981-
Lúpus eritematoso cutâneo : análise histológica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência direta / Leticia Fogagnolo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Maria Letícia Cintra.

Coorientador: Maria Heloísa de Souza Lima Blotta.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imuno-histoquímica. 2. Lupus eritematoso cutâneo. 3. Citocinas. 4. Imunoglobulinas. 5. Imunologia. I. Cintra, Maria Letícia, 1951-. II. Blotta, Maria Heloísa de Souza Lima, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cutaneous lupus erythematosus : histological, immunohistochemical and direct immunofluorescence analysis

Palavras-chave em inglês:

Immunohistochemistry

Cutaneous lupus erythematosus

Cytokines

Immunoglobulins

Immunology

Área de concentração: Anatomia Patológica

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria Letícia Cintra [Orientador]

Maria Aparecida Barone Teixeira

Andresa Borges Soares

Athanase Billis

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Data de defesa: 09-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ALUNA: LETICIA FOGAGNOLO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA LETÍCIA CINTRA

COORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA HELOÍSA DE SOUZA LIMA BLOTTA

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIA LETÍCIA CINTRA- FCM/UNICAMP

2. PROFA. DRA. MARIA APARECIDA BARONE TEIXEIRA- SÃO LEOPOLDO MANDIC

3. PROF. DRA. ANDRESA BORGES SOARES – SÃO LEOPOLDO MANDIC

4. PROF. DR. ATHANASE BILLIS- FCM/UNICAMP

5. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO- FCM/UNICAMP

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

DATA DA DEFESA: 09/12/2015

**Aos meus pais,
Dalva e José Antônio Fogagnolo,
exemplos de honestidade e perseverança,
pelo amor e apoio incondicionais
em todos os momentos
da minha vida e especialmente
durante a execução deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que recebo diariamente.

Ao meu irmão, Fabricio Fogagnolo, meu maior exemplo e inspiração para ser uma boa médica.

Ao meu marido e melhor amigo, Roberto Bueno Filho, pelo amor, apoio e compreensão durante todos os nossos momentos.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, minha orientadora, a quem tenho extrema admiração por sua generosidade, altruísmo, simplicidade e competência. Obrigada pelo incentivo constante, pelos seus ensinamentos, pela ajuda durante todos estes anos de convivência e por ser a minha grande mestre.

Ao Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza, cujo empenho na condução dos seus pacientes permitiu a fundamentação deste trabalho.

A Profa. Dra. Andrea Eloy, pelo empenho em me ajudar a selecionar, a partir dos arquivos da divisão de dermatologia da Unicamp, as imagens clínicas que ilustram esta tese.

À Dra. Tânia Cristina Benetti Soares, pela amizade e solicitude durante a execução a tese.

Aos “meus amigos da salinha” Erika Egal, Harim Santos e Victor Montalli, que tornaram minha jornada da pós-graduação mais feliz e amena.

À Dra. Carolina Bittencourt, que compartilhou comigo o mesmo tempo de doutorado, pela ajuda em me alertar sobre os prazos e procedimentos para a defesa.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da Unicamp, especialmente o Fabrício Ferreira dos Santos, pela ajuda e competência em nossa busca obstinada pelos prontuários já arquivados dos pacientes.

À bióloga Ana Claudia Sparapani Piazza, Claudinha, pelo apoio e profissionalismo, essenciais para a execução da técnica imuno-histoquímica e concretização deste trabalho.

À técnica Luzia Aparecida Magalhães Alves, pelo cuidado nos inúmeros recortes adicionais das lâminas.

À técnica Arethusa de Souza, pela paciência em encontrar os blocos de material parafinado nos arquivos da instituição e pelo auxílio no laboratório de imuno-histoquímica.

Ao biomédico Luis Felipe Billis, pela ajuda na busca da casuística deste estudo.

Ao César Galusni Senna, aluno de iniciação científica, pela ajuda na análise quantitativa da expressão dos biomarcadores.

Ao técnico de imagem Adilson Abílio Piazza, pela competência e auxílio na documentação da tese e dos artigos científicos.

À Dra. Fernanda Guedes Luiz e Rosiane Maria da Silva, pela ajuda na padronização e execução da técnica imuno-histoquímica para alguns biomarcadores do estudo.

Às estaticistas Creuza Maria Roveri dal Bó, Daiane Roza e, especialmente, à Cleide Aparecida Moreira Silva, pela assessoria estatística.

À secretaria da subcomissão da Pós-Graduação, Maria do Carmo Machado da Silva e Elisabeth Justi Rodrigues, e à técnica administrativa do programa de Ciências Médicas, Márcia Aguiar dos Santos, pela ajuda em todas as etapas desta jornada, principalmente alertando-me quanto aos prazos e procedimentos durante a execução da tese.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP, pela ajuda e paciência.

A todos os pacientes deste estudo, que, por meio da fragilidade das suas doenças, permitiram que esta pesquisa fosse possível e contribuíram para um maior conhecimento científico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à Comissão Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo auxílio financeiro a esta pesquisa. Também agradeço ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (Faepex), que complementou o auxílio concedido por estas agências de fomento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O lúpus eritematoso cutâneo (LEC) é classificado em agudo, subagudo, crônico e tímido. A sequência de eventos que deflagram a autoimunidade é pouco entendida.

Neste trabalho foram estudados os aspectos histológicos, de imunofluorescência direta (IFD) e imuno-histoquímicos no LEC discoide (subtipo mais comum da forma crônica), subagudo e tímido, relacionando-os com a presença ou não de lúpus eritematoso sistêmico (LES) concomitante, visando compreender melhor a imunopatogênese destes subtipos e suas diferenças clínico-histopatológicas.

Amostras cutâneas com LEC (discoide=21; subagudo=17; tímido=21) foram analisadas às colorações convencionais e imuno-histoquímicas (CD4, CD8, CD25, CD56, granzima A, granzima B, granulicina, perforina, FOXP3, ICAM-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 e TNF- α), com o auxílio do programa Image J®. Os achados clínicos e de IFD foram obtidos dos prontuários. A densidade de células CD8+ foi menor que a das CD4+ em todos os espécimes, e menor no grupo subagudo em relação aos outros dois grupos, bem como nas amostras de pacientes com LEC e LES associado (LEC+/LES+). A densidade de células CD8+ era maior que a das células CD56+ em todos os grupos estudados. Nos três subtipos, as células inflamatórias expressavam granzima A e B, perforina e granulicina e a densidade não era diferente entre eles. Apenas no grupo tímido houve associação positiva entre o número das células marcadas pelos diferentes grânulos e também entre este e a densidade de células CD8+, sugerindo que o fenômeno citotóxico mediado por grânulos, neste grupo, seja promovido por linfócitos CD8+. Como o LEC tímido não cursa com dermatite de interface/apoptose, provavelmente, neste subtipo, os grânulos atuam de outra forma, como sustentando a inflamação.

O número de células CD25+ e FOXP3+ foi inferior a 10% nos três subtipos de LEC, sinalizando para um distúrbio imunorregulatório periférico. A maior diversidade na imunomarcção das citocinas ocorreu no subtipo subagudo. A imunoexpressão de IL-10 e IL-6 foi semelhante entre os subtipos. No LEC subagudo, a expressão dérmica da IL-1 β , IL-18 e TNF- α foi maior; a da IL-17 foi maior na epiderme e menor no interstício dérmico. Outrossim, as amostras de LEC+/LES+ apresentaram maior expressão de IL-1 β nos queratinócitos, maior número de células inflamatórias ICAM-1+ e menor expressão de IL-17 no interstício, quando comparadas às de pacientes sem LES.

À IFD, nos três subtipos, encontraram-se depósitos granulares, na zona da membrana basal, de IgG, predominantemente, seguindo-se de IgM, C'3, IgA e C1q, inclusive nos espécimes de LEC tímido com resultado positivo. Nas amostras de LEC subagudo, o C'3 foi o mais frequente.

Estes resultados acrescentam informação sobre a patogênese do LEC tímido, entidade ainda pouco estudada. A semelhança na imunoexpressão dos biomarcadores, nas amostras de LEC subagudo e LEC+/LES+, aponta para uma modificação do microambiente inflamatório quando há acometimento sistêmico. Adicionalmente, o conjunto dos achados destaca a forma subaguda pela biomarcção distinta da discoide e da tímida, e enfatiza a semelhança destes dois subtipos, no que concerne à expressão dos imunomarcadores desta pesquisa. O estudo continuado sobre mecanismos imunopatogênicos nos subtipos de LEC poderá acrescentar elementos às diferenças que os caracteriza, otimizando o tratamento.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, Lúpus Eritematoso Cutâneo, Citocinas, Imunoglobulinas, Imunologia.

ABSTRACT

Cutaneous Lupus erythematosus (CLE) is classified in acute, subacute and tumidus. The mechanisms for the aberrant immunology response is not still elucidated.

In this research we studied the histopathological, direct immunofluorescence (DIF) and immunohistochemical aspects of discoid CLE (the most common subtype of the chronic form of CLE), subacute and tumidus CLE, correlating them with the concurrent diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE), in order to comprehend the immunopathogenesis of the disease subtypes and the clinical and histopathological differences between them.

Skin specimens with CLE (discoid = 21, subacute =17, tumidus =21) were analyzed through conventional and immunohistochemistry staining (CD4, CD8, CD25, CD56, granzyme A, granzyme B, granzyme C, perforin, FOXP3, ICAM-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 and TNF- α), using Image J® program analysis. Clinical and DIF data were obtained from the medical charts. The density of CD8+ cells were lower than CD4+ cells in all skin specimens, and lower in subacute group when compared with the other two groups. The same occurred with patients with CLE and SLE (CLE+/SLE+). The density of CD8+ cells was higher than CD56+ cells in all the groups studied. The three subtypes of CLE expressed granzyme A, B, granzyme C and perforin, and the density was not different between them. The tumid group showed positive association between the number of cells staining for each granule and also between these granules and the density of CD8+ cells, suggesting that the granule-mediated cytotoxicity, in this group, is promoted by CD8+ lymphocytes. Because CLE tumidus does not present with interface dermatitis/apoptosis, the granules, in this subtype, might have other function, like maintaining inflammation.

The number of CD25+ and FOXP3+ cells was inferior to 10% in the three subtypes of CLE, signaling to a defect in peripheral immunoregulatory mechanisms. The major diversity of cytokine expression occurred with subacute subtype. The immunoexpression of IL-10 and IL-6 was similar to the other subtypes. Subacute CLE showed more expression of L-1 β , IL-18 and TNF- α . IL-17 was more expressed in the epidermis and less in the dermal interstitium. CLE+/SLE+ skin specimens showed higher expression of IL-1 β in the keratinocytes, more density of ICAM-1+ cells and less expression of IL-17 in the dermal interstitium, when compared with patients without SLE. The DIF findings were, in the 3 subtypes, granular deposits at the basement membrane zone, mostly IgG, followed by IgM, C3, IgA and C1q, even in specimens of CLE tumidus with positive DIF. In subacute skin specimens, C'3 were the most frequent.

These results improve the knowledge around CLE tumidus pathogenesis, an entity still poorly studied. The similar pattern of biomarkers staining between subacute patients and CLE+/SLE+ patients might indicate systemic factors influencing the skin inflammatory microenvironment. Additionally, the findings of this study distinguishes the subacute form from discoid and tumidus subtypes, and emphasizes the similarities between these two entities, concerning to the biomarkers expression found in this study. The continued progress in understanding CLE subtypes immunopathogenesis will clarify the reason for different aspects of the disease and target the correct treatment.

Keywords: Immunohistochemistry, Cutaneous lupus erythematosus, Cytokines, Immunoglobulin, Immunology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** a) Paciente com LEC agudo e eritema malar, do dorso nasal e da região supralabial, poupando o sulco nasogeniano; b) Colo de uma paciente com LEC agudo apresentando lesões máculo-papulosas eritematosas confluentes. Créditos: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp.....23
- Figura 2.** Paciente com LEC discoide nas regiões malares (a) e orelha (b). Em (c), (d), (e), aspectos histopatológicos deste subtipo. Na lesão ativa (c), há epiderme atrófica e retificada, hiperkeratose e infiltrados linfocíticos dérmicos perivascular e perianexiais superficiais e profundos. Em (d), detalhe de uma rocha córnea folicular, degeneração hidrópica da camada basal com espessamento da ZMB e infiltrado inflamatório de interface dermoepidérmica. Já a lesão antiga de LEC discoide (e) apresenta menor intensidade do infiltrado inflamatório e fibrose da derme. (HE, 200x). Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo.....25
- Figura 3.** LEC crônico discoide: depósito de IgG (3+ em 3+), na zona da membrana basal da epiderme, padrão granuloso contínuo. (Imunofluorescência direta, aumento original 200X). Créditos: Acervo do Departamento de Anatomia Patológica/ Unicamp.....26
- Figura 4.** Paciente com LEC subagudo e placas eritematosas policíclicas no dorso e região cervical (a); na face, placas eritematosas com descamação fina (b). Estas lesões normalmente resultam em hipocromia transitória, sem cicatriz. À histopatologia (c) das lesões observa-se atrofia epidérmica e hiperkeratose, degeneração vacuolar da camada basal e infiltrado mononuclear na interface dermoepidérmica e também nas regiões perivascular e perianexiais superficiais. Discreto depósito dérmico de mucina pode ser observado. (HE, 200x). Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp.; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo28
- Figura 5.** Placas eritematosas e infiltradas na região malar de uma paciente com LEC tímido (b). A figura (a) ilustra os aspectos histológicos desse subtipo, como a ausência de alterações epidérmicas, denso infiltrado linfocítico perivascular e perianexial na derme superficial e profunda, além de intensa mucinose dérmica, mais evidentes no detalhe da figura (c). (HE, 200x) Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina

de Dermatologia da Unicamp; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo.....30

Figura 6. (a) e (b) Imunomarcção citoplasmática e membranosa de CD8 no LEC subagudo e LEC túmido, respectivamente, em amostras pertencentes ao estudo; (c) e (d) Imunomarcção citoplasmática e membranosa de CD56 na pele acometida por LEC subagudo e LEC túmido, respectivamente. (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-CD8 e anti-CD56, aumento original 400x)44

Figura 7. Imunomarcção citoplasmática de perforina (a), granulicina (b), granzima B (c) e granzima A (d) em amostras de pele do estudo, acometidas por LEC túmido. (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-perforina, anti-granulicina, anti-granzima A e B, aumento original 400x).....45

Figura 8. Imunomarcção citoplasmática e membranosa de ICAM-1 em amostra de pele do estudo, acometida por LEC subagudo (imuno-histoquímica, anticorpo anti-ICAM-1, aumento original 400x)45

Figura 9. Imunomarcção citoplasmática de CD4 nas células inflamatórias da derme e que também estão presentes na interface entre a derme e a epiderme (a) ou epitélio anexial (b) e migram para outros estratos do epitélio; imunomarcção citoplasmática de CD25 nas células inflamatórias da derme que migram para a epiderme (c) e epitélio anexial (d); imunomarcção nuclear de FOXP3 nos núcleos das células inflamatórias que migram pela epiderme (f) e estão também presentes entre as células linfoides na derme (e) (imuno-histoquímica, anticorpo anti- CD4, anti-CD25 e anti-FOXP3, aumento original de 400x).....46

Figura 10. Imunomarcção citoplasmática e intersticial da interleucina IL-1 β (a) e IL-18 na pele de um paciente com LEC discoide (b) ; de IL-17 na pele de um paciente com LE túmido (c) e de IL-10 em uma lesão de LE discoide (d) (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-IL-1 β , anti-IL-10, anti-IL-17 e anti-IL-18, aumento original 400x)48

Figura 11. (a) Imunomarcção de IL-6 nas células inflamatórias da derme e que também são vistas na espessura da epiderme; (b) imunomarcção de IL-6 nas células inflamatórias, dendríticas e endoteliais; (c) Imunomarcção de TNF- α na epiderme e dendrócitos dérmicos; (d) imunomarcção de TNF- α no infiltrado inflamatório dérmico (imuno-histoquímica, anticorpo anti- IL-6 e anti- TNF- α aumento original de 400x)48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação do lúpus eritematoso cutâneo.....	20
Quadro 2. Critérios clínicos para classificação do lúpus eritematoso sistêmico segundo a <i>American College of Rheumatology</i> , revisados em 1997.....	21
Quadro 3. Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Anti-Sm	Anticorpo anti-nuclear <i>Smith</i>
BAD	Agonista de morte celular associado ao Bcl-2
BAX	Proteína X associada ao Bcl-2
Bcl-2	Proteína Linfoma B2
BIM	Mediador interativo de morte celular da família Bcl-2
CSF-1	Fator estimulador de colônias 1
CD	Grupamento de Diferenciação
CXCL	Quimiocina ligante CXC
CXCR	Receptor de quimiocina CXC
DAB	3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro
DAMPS	Moléculas associadas ao dano intracelular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
EUA	Estados Unidos da América
Fas	Receptor ou proteína de membrana pro-apoptose
Fas-L	Proteína ligante da proteína de membrana pro-apoptose
FN- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
FOXP3	Fator de transcrição de células T regulatórias
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Sistema antígeno leucocitário humano
HLA-A1	Haplótipo A1 do sistema antígeno leucocitário humano de Classe I
HLA-B7	Haplótipo B7 do sistema antígeno leucocitário humano de Classe I
HLA-B8	Haplótipo B8 do sistema antígeno leucocitário humano de Classe I
HLA-DR2	Haplótipo DR2 do sistema antígeno leucocitário humano Classe II
HLA-DR3	Haplótipo DR3 do sistema antígeno leucocitário humano Classe II

HLA-DRw-52	Haplótipo DRw-52 do sistema antígeno leucocitário humano Classe II
HLA-DQ	Haplótipo DQ do sistema antígeno leucocitário humano Classe II
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
HSP 70	Proteína de choque térmico 70
HSP 90	Proteína de choque térmico 90
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular endotelial 1
IFD	Imunofluorescência direta
IFN-1	Interferon 1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IFN- κ	Interferon kappa
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF 5	Fator regulador de interferon 5
LE	Lúpus eritematoso
LEC	Lúpus eritematoso cutâneo
LEC+/LES-	Lúpus eritematoso cutâneo sem lúpus eritematoso sistêmico concomitantes
LEC+/LES+	Lúpus eritematoso cutâneo e lúpus eritematoso sistêmico concomitantes
LSAB-HRP	Estreptavidina-biotina-peroxidase de rábano
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro

Ro/SSA	Ribonucleoproteína tipo Ro
La/SSB	Ribonucleoproteína tipo La
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Treg	Célula T regulatória
TYK2	Tirosina-quinase 2
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Luz ultravioleta
U1 RNP	Ribonucleoproteína U1
VCAM	Molécula de adesão vascular 1

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
μm	Micrômetro
+/-	Mais/menos ou positivo/negativo
%	Porcento
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Manifestações clínicas, histopatológicas e de imunofluorescência direta do lúpus eritematoso cutâneo	22
1.1.1 Lúpus eritematoso cutâneo agudo	22
1.1.2 Lúpus eritematoso cutâneo crônico	23
1.1.2.1 Lúpus eritematoso cutâneo crônico discoide	23
1.1.2.2 Outras variantes de lúpus eritematoso cutâneo crônico	26
1.1.3 Lúpus eritematoso cutâneo subagudo	27
1.1.4 Lúpus eritematoso cutâneo tímido	29
1.2 Patogênese do lúpus eritematoso cutâneo.....	30
1.2.1 Fatores Genéticos	30
1.2.2 Radiação Ultravioleta.....	31
1.2.3 Infecções, drogas, fatores hormonais	32
1.2.4 Apoptose e ativação macrofágica no lúpus eritematoso cutâneo	33
1.2.5 Citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.....	34
1.2.6 Dano tecidual.....	36
1.2.7 Tolerância imunológica.....	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos gerais.....	39
2.2 Objetivos específicos:.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Desenho do estudo, tamanho amostral e variáveis	40
3.2 Técnica imuno-histoquímica	41
3.3 Análise da imunomarcção de CD8, CD56, granzima A, granzima B, perforina, granulisina, ICAM-1, CD4, CD25 e FOXP3.....	43
3.4 Análise da imunomarcção de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 e TNF-α.....	46
3.5 Análise Estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Capítulo I.....	50
4.2 Capítulo 2.....	56
4.3 Capítulo 3.....	68
5. DISCUSSÃO GERAL	86
6. CONCLUSÃO.....	91

7. REFERÊNCIAS	93
8. ANEXOS	101
8.1 ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)	101
8.2 ANEXO II: Autorização junto à editora (Copyright) para inclusão do artigo científico na tese (Capítulo 1).	103
8.3 ANEXO III: Declaração de Responsabilidade	108

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso (LE) é uma desordem multissistêmica autoimune que varia desde lesões cutâneas isoladas a acometimento interno grave e potencialmente fatal. O acometimento cutâneo é a segunda manifestação mais frequente da doença após o envolvimento articular e pode ser um marcador de acometimento sistêmico.¹⁻⁴ Porém, por ser uma doença de causa multifatorial e poligênica,³ a sequência de eventos responsáveis pela deflagração da doença e a preferência pelo acometimento de sítios orgânicos ou lesões cutâneas específicas ainda não foi completamente compreendida.

As lesões cutâneas do LE são espectrais e classificadas em específicas e não específicas da doença.^{1,4} As não específicas estão geralmente associadas ao LE sistêmico, como por exemplo livedo reticular, urticária vasculite, úlceras mucosas, telangiectasia periungueal e eritema multiforme (também denominado síndrome de Rowell), mas não são exclusivas da doença e podem estar presentes em outros tipos de patologia, autoimunes (como esclerodermia) ou não (como a farmacodermia).¹ As lesões específicas compreendem um grupo bem definido de subtipos da doença e são identificadas pelo termo “lúpus eritematoso cutâneo” (LEC).^{1,4} O LEC é classificado em três categorias, de acordo com suas características clínicas, duração média das lesões e alterações histopatológicas: LEC agudo, LEC subagudo e LEC crônico. Esta classificação, inicialmente proposta por Gilliam e Sontheimer^{1,5}, inclui o LEC crônico e o tímido, além das incomuns perniose lúpica e lúpus profundo (paniculite lúpica), como subtipos de LEC crônico. Entretanto, ela foi recentemente revisada e o LEC tímido vem sendo classificado como uma entidade individualizada e também denominada de subtipo intermitente, por apresentar peculiaridades histológicas e curso intermitente e de menor morbidade em relação aos demais subtipos⁴. (Quadro 1)

A doença é mais comum em mulheres do que em homens e mais frequente na quarta década de vida.⁶ Byazar C et al⁷, em um estudo recente com 1002 pacientes com LEC, encontrou a frequência de 76,6% mulheres e 23,4% de homens, e uma média de idade de 43 anos. Porém, a média de idade dos pacientes com LEC subagudo foi maior do que a de pacientes com LEC agudo ou tímido.

O acometimento sistêmico pode eventualmente ocorrer em qualquer subtipo de LEC,⁸ e varia de próxima de 100% em pacientes com LEC agudo a menos de 5% no LEC discoide.¹ Entretanto, quando o paciente de LEC discoide apresenta lesões cutâneas generalizadas, o risco de apresentar manifestações sistêmicas é de 20%.⁹ O LEC tímido, por sua vez, geralmente não está associado ao LE sistêmico.^{1,10} Em média, 10 a 15% dos

pacientes com LEC subagudo apresenta sintomatologia orgânica como artrite, porém aproximadamente 50% deles preenchem os critérios da *American College of Rheumatology* (ACR)¹ para diagnóstico de LE sistêmico.^{11,12} (Quadro 2) Em 2012, o grupo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* revisou e validou os critérios da ACR¹³ para aprimorar a relevância dos critérios clínicos e incorporar os atuais conhecimentos imunológicos sobre a doença sistêmica, o que poderá ter impacto nas estatísticas acerca da coexistência de LE sistêmico em pacientes com LE cutâneo. Entretanto, estes novos critérios ainda estão sendo avaliados na prática clínica e os critérios da ACR ainda permanecem como referência.¹⁴

Quadro 1. Classificação do lúpus eritematoso cutâneo

Lúpus eritematoso cutâneo agudo Forma Localizada Forma Generalizada
Lúpus eritematoso cutâneo subagudo Forma anular Forma papuloescamosa
Lúpus eritematoso cutâneo crônico Lúpus eritematoso discoide Forma localizada Forma disseminada Lúpus Eritematoso profundo ou paniculite lúpica Perniose lúpica
Lúpus eritematoso cutâneo intermitente Lúpus eritematoso tímido

Modificado de Kuhn A, Landmann A. The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2014;48-49:14–9.

Quadro 2. Critérios clínicos para classificação do lúpus eritematoso sistêmico segundo a *American College of Rheumatology*, revisados em 1997. São necessários 4, dos 11 critérios, para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico.

1. Lesão malar (“rash”): macular ou placar, tendendo a poupar sulcos naso-labiais
2. Lesão discoide: placas eritematosas com escamas aderentes e rolhas foliculares; cicatrizes atróficas em lesões antigas
3. Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não usual à exposição solar, de acordo com a história clínica do paciente ou observação clínica
4. Úlceras orais: úlceras orais ou nasofaríngeas, geralmente indolores, observadas pelo médico
5. Artrite não-erosiva: envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular
6. Pleurite ou pericardite: História convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico)
7. Comprometimento renal: proteinúria persistente (acima de 0,5 g/dia ou qualificado como 3+ quando quantificação não realizada) ou cilindros urinários (hemácias, hemoglobina, granulares, tubulares ou mistos)
8. Alterações neurológicas: convulsão ou psicose (descartadas outras causas)
9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica com reticulocitose ou leucopenia (menor do que 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm ³ , na ausência de outra causa)
10. Alterações imunológicas: presença de anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou anticorpo antifosfolípide com base em: <ul style="list-style-type: none"> a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis por, no mínimo, seis meses, confirmado por prova de imobilização de <i>Treponema pallidum</i> ou teste de imunofluorescência indireta para a determinação de anticorpos contra o <i>Treponema pallidum</i>
11. Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer tempo, e na ausência de drogas associadas a sua indução

1.1 Manifestações clínicas, histopatológicas e de imunofluorescência direta do lúpus eritematoso cutâneo

1.1.1 Lúpus eritematoso cutâneo agudo

O LEC agudo está associado a doença sistêmica em quase 100% dos casos¹ e pode preceder em semanas a meses o acometimento orgânico.⁴ A lesão típica de LEC agudo é o eritema (“rash”) malar ou em borboleta (figura 1), que consiste em eritema ou placas malares infiltradas com tendência a confluir, simetricamente distribuídas pelo dorso nasal e malares, que tendem a ser transitórias e se resolvem muitas vezes com hiperpigmentação temporária, porém sem cicatriz.^{1,4} Os sulcos nasolabiais geralmente são poupados, caracterizando a fotossensibilidade intensa destas lesões.¹ O LEC agudo também pode se apresentar como exantema macular ou papular em áreas fotoexpostas ou de forma generalizada em todo tegumento. Neste caso se apresenta também com acometimento de palmas e plantas e cursa com eritema do dorso das mãos que poupa apenas as regiões interfalangeanas.¹ Em 40-90% dos pacientes são detectados autoanticorpos anti-DNA e 10-30% são positivos para anticorpos anti-Sm no sangue.¹⁵ Os achados histopatológicos geralmente são pouco expressivos e apresentam discreta dermatite de interface e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário entremeado por alguns neutrófilos e depósitos de mucina. Inflamação perianexial é incomum.^{1,15,16} Raramente são coletadas biópsias deste subtipo da doença, uma vez que o aspecto clínico costuma ser típico. O exame de imunofluorescência direta (IFD) exhibe positividade granulosa contínua para imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) e complemento ao longo da junção dermo-epidérmica das lesões.¹

Alguns estudiosos utilizam o termo banda lúpica para se referir aos depósitos granulares contínuos de imunoglobulina e complemento no exame de imunofluorescência direta na pele lesional e não lesional de pacientes com LEC e LE sistêmico, enquanto outros reservam esta designação apenas em referência a estes achados no exame na pele não lesional.^{4,17,18} Entretanto, trata-se de exame unicamente complementar. Apenas a presença desses depósitos não caracteriza o diagnóstico de LE, uma vez que podem estar presente em peles com fotodano ou outras doenças inflamatórias. Sua ausência também não invalida o diagnóstico da doença.¹ Pacientes com LE sistêmico usualmente apresentam IFD positiva na pele exposta ao sol e acometida por lesões cutâneas, o que ocorre em 80-90% dos casos, sendo que na pele normal fotoexposta o exame é positivo em 80% dos pacientes. A IFD também costuma ser positiva na pele normal não exposta ao sol em 91% dos casos com

doença sistêmica em atividade, e 33% dos casos com doença inativa. Na pele acometida por LEC de outros subtipos (crônico e subagudo) e sem LE sistêmico concomitante, a IFD, quando positiva, ocorre apenas na pele comprometida.¹⁶

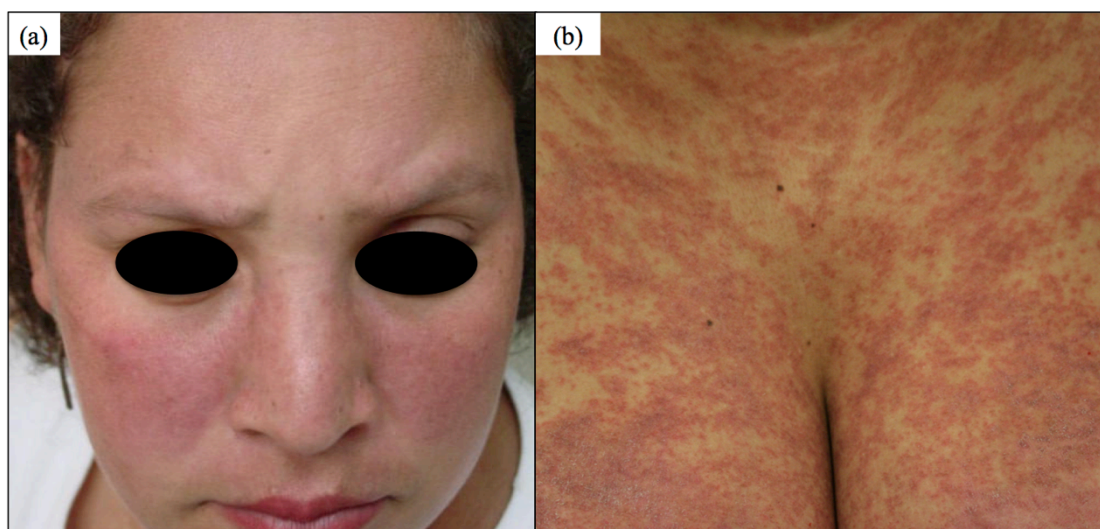


Figura 1. a) Paciente com LEC agudo e eritema malar, do dorso nasal e da região supralabial, poupando o sulco nasogeniano; b) Colo de uma paciente com LEC agudo apresentando lesões máculo-papulosas eritematosas confluentes. Créditos: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza-acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp.

1.1.2 Lúpus eritematoso cutâneo crônico

O LEC crônico corresponde a um subgrupo da doença de natureza recorrente e longa duração das lesões e é constituído pelo LEC discoide, paniculite lúpica e a perniose lúpica.

1.1.2.1 Lúpus eritematoso cutâneo crônico discoide

LEC discoide é o subtipo de LEC crônico mais comum.³ Manifesta-se tipicamente com pápulas ou placas eritematosas, com escamas aderentes, hiperqueratose ou atrofia central e tendência a hiperpigmentação das margens.¹ É bastante característica a hiperqueratose folicular. As lesões resultam em cicatriz e hipopigmentação, principalmente quando ocorrem no couro cabeludo, onde surgem áreas alopecias por destruição dos folículos pilosos.^{1,3,4,8} Localizam-se preferencialmente em áreas fotoexpostas, principalmente face e região cervical.

A distinção entre LEC discoide localizado, com lesões apenas acima da região cervical e o LEC discoide generalizado apresenta implicações prognósticas, pelo maior risco dos pacientes com quadro generalizado em desenvolver LE sistêmico¹

O LEC discoide clássico tipicamente envolve a face (fronte, supercílios, região nasal, lábios e orelhas, incluindo o conduto auditivo), colo, pescoço e faces extensoras dos membros superiores, mas também pode eventualmente surgir em áreas não expostas como a região inguinal e palmo-plantar. Alguns pacientes podem apresentar lesões na mesma distribuição em “asa de borboleta” do LEC agudo, porém as placas induradas e a hiperqueratose presentes na lesão discoide permitem diferenciá-la daquele subtipo. (figura 2) Mucosas, principalmente a oral, também podem ser acometidas.^{1,8}

Existem também variantes do LEC discoide. O LEC hipertrófico ou verrucoso, por exemplo, consiste em lesões discoides com hiperqueratose bastante proeminente, resultado de proliferação epitelial exagerada.^{1,8,16} As lesões podem ser semelhantes a carcinomas espinocelulares ou ceratoacantomas, porém a evolução para neoplasia epitelial em lesões de LEC hipertrófico é rara.¹⁹ Outro subtipo raro, denominado LEC hipertrófico e profundo, se manifesta como placas eritemato-violáceas, com escamas aderentes, porém atrofia central bastante pronunciada, com bordas induradas.¹ Também podem ocorrer lesões lineares, seguindo as linhas de Blaschko, o que também pode ocorrer em outros subtipos, como LEC subagudo ou túmido.^{1,8,20} Autoanticorpos nucleares séricos são encontrados em 10-30% dos casos.^{12,21}

A histopatologia das lesões discoides apresenta diferentes características, dependendo do estágio da doença. A lesão ativa é caracterizada por hiperqueratose e dilatação folicular, formando rolhas de queratina. A epiderme apresenta graus variáveis de atrofia e geralmente está retificada, embora possa existir acantose.^{22,23} A derme papilar é edematosa e telangiectasias estão frequentemente presentes. Há moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear perivascular e perianexial superficial e profundo. A agressão, pelas células inflamatórias, da interface dermoepidérmica, associada a degeneração vacuolar da camada basal e incontinência pigmentar, caracterizam a dermatite de interface, que acomete tanto a epiderme quanto os folículos. Geralmente, nestas lesões, está presente a deposição dérmica de mucina e há espessamento da zona da membrana basal e dos vasos.²² É característica a visualização, por meio do exame de imunofluorescência direta, o depósito granuloso de múltiplos imunorreagentes na junção dermoepidérmica, e algumas vezes ao redor dos vasos.^{1,4,12} (figura 3)

A lesão de lúpus discoide antiga, já em regressão, apresenta hiperqueratose ortoceratótica, que por vezes é paraceratótica, com rolhas córneas foliculares. O espessamento da membrana basal é evidente, porém a degeneração hidrópica da camada basal pode apresentar intensidades variáveis. A derme alta, ou eventualmente toda a derme, é substituída por fibrose, de modo que o infiltrado inflamatório pode ainda ser visto, porém de forma reduzida, e o exame de imunofluorescência direta pode ser negativo.²²

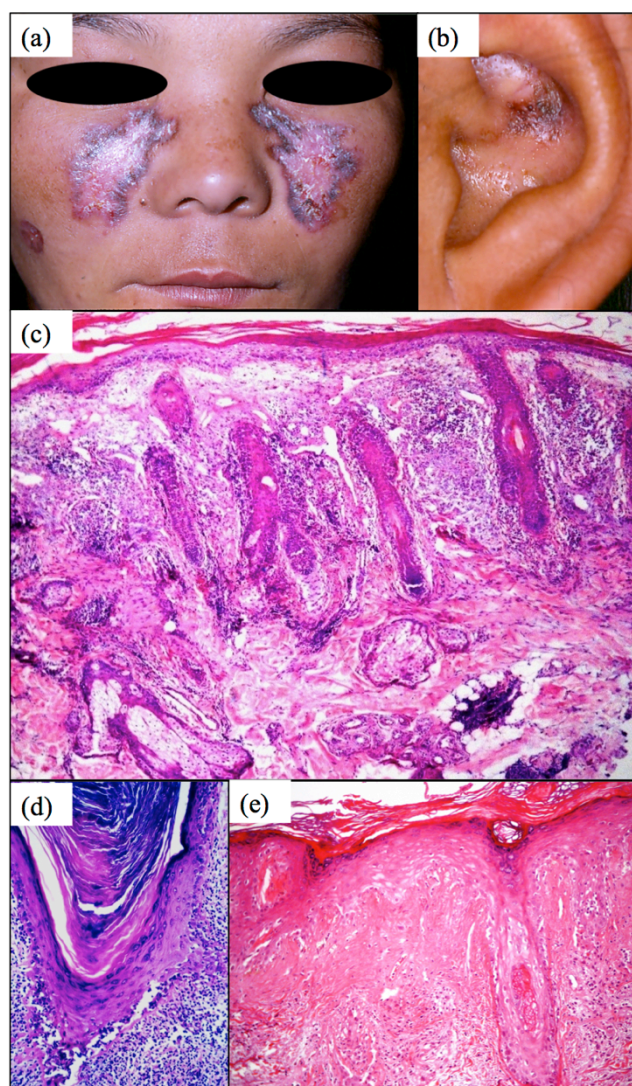


Figura 2. Paciente com LEC discoide nas regiões malaras (a) e orelha (b). Em (c), (d), (e), aspectos histopatológicos deste subtipo. Na lesão ativa (c), há epiderme atrófica e retificada, hiperqueratose e infiltrados linfóides dérmicos perivascular e perianexiais superficiais e profundos. Em (d), detalhe de uma rolha córnea folicular, degeneração hidrópica da camada basal com espessamento da ZMB e infiltrado inflamatório de interface dermoepidérmica. Já a lesão antiga de LEC discoide (e) apresenta menor intensidade do infiltrado inflamatório e

fibrose da derme. (HE, 200x). Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo.

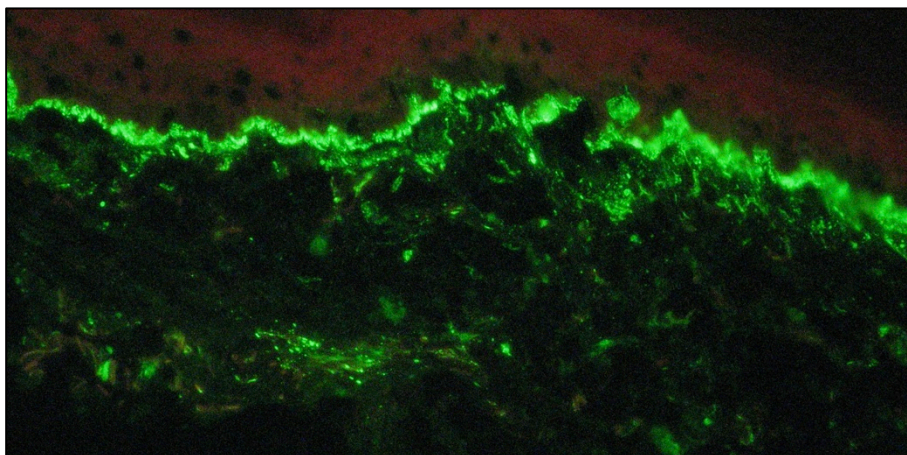


Figura 3. LEC crônico discoide: depósito de IgG (3+ em 3+), na zona da membrana basal da epiderme, padrão granuloso contínuo (Imunofluorescência direta, aumento original 200X). Este mesmo padrão de depósito também é observado em outros subtipos de LEC. Créditos: Acervo do Departamento de Anatomia Patológica/ Unicamp).

1.1.2.2 Outras variantes de lúpus eritematoso cutâneo crônico

O lúpus eritematoso profundo é incomum e caracteriza-se por nodulação firme subcutânea, que regride ao longo do tempo e leva à atrofia da derme e subcutâneo. Raramente pode ocorrer calcificação ou ulcerações. Afetam a face e região proximal dos braços, pescoço, nádegas, coxas e tórax.^{1,24,25}

A pele pode ser normal na sua superfície, porém pode haver lesões discoides. Alguns autores reservam o termo paniculite lúpica quando estas lesões não estão presentes, e lúpus profundo para casos que combinam alterações cutâneas sugestivas de LEC discoide e paniculite.¹ A histopatologia evidencia paniculite lobular e infiltrado inflamatório perivascular linfocitários, além de depósitos de mucina na derme inferior, com zonas de necrose de adipócitos que vão sendo substituídas por tecido esclerótico. Eventualmente há vasculite de pequenos vasos associada. A imunofluorescência não é diagnóstica, porém podem ocorrer depósitos granulosos esparsos de imunoglobulina na derme e subcutâneo.^{1,22,25}

A perniose lúpica também é uma rara manifestação de LEC e caracteriza-se por placas e nódulos eritemato-violáceos no dorso das mãos e dedos. A associação com LEC

discoide é mais comum, mas pode ocorrer em outros subtipos. É mais frequente no inverno. O exame histopatológico evidencia infiltrado linfocitário dérmico superficial e profundo, além de depósito de mucina e edema da derme em intensidades variáveis.^{12,25}

1.1.3 Lúpus eritematoso cutâneo subagudo

O LEC subagudo é caracterizado por lesões cutâneas recorrentes distribuídas simetricamente em áreas fotoexpostas, o que traduz a fotossensibilidade intensa que ocorre neste subtipo.¹ Dois tipos morfológicos são mais frequentemente vistos: lesões eritematosas de configuração anular, com bordas elevadas e clareamento central ou lesões pápuloescamosas de aspecto psoriasiforme ou eczematoso. Ambos podem estar presentes em um mesmo paciente, porém apresentar um ou outro tipo de lesão cutânea não traz implicações prognósticas distintas.^{1,24,25} Podem resultar em hipopigmentação, mas geralmente não resultam em cicatriz evidente.¹ Segundo Obermoser et al,¹ as lesões, de forma diferente do LEC agudo, raramente ocupam a região central da face e ocorrem mais nas laterais, porém, assim como o LEC agudo, também poupam as regiões interfalangeanas. O LEC subagudo podem ser induzido por drogas, em particular hidroclorotiazida e terbinafina, mas também por bloqueadores do canal de cálcio, anti-inflamatórios não-esteroidais, griseofulvina, anti-histamínicos e uma série de outros medicamentos.^{1,26} A regressão das lesões pode ou não ocorrer após a interrupção do uso da droga.²⁶ Anticorpos anti-núcleo são vistos em 70-80% dos pacientes, especialmente anti-Ro/SSA (41-70%) e anti-La/SSB (24-70%)¹⁵ e metade dos pacientes preenchem critérios para LE sistêmico.¹ Entretanto, apenas 10 a 15% dos pacientes com doença sistêmica desenvolvem lesões cutâneas de LEC subagudo.¹

Manifestações cutâneas semelhantes a LEC subagudo podem ocorrer em neonatos devido à passagem transplacentária de autoanticorpos anti-Ro/SS-A e/ou anti-La-SS-B, ou, mais raramente, anti-U1 RNP, que reagem com antígenos fetais e podem causar, além das lesões cutâneas, defeitos na condução cardíaca fetal e no neonato.¹

A histopatologia de lesões de LEC subagudo constitui-se em dermatite de interface com exocitose de linfócitos.^{1,16} O infiltrado inflamatório linfomonocitário, com número variável de plasmócitos, perianexial e perivascular, é menos proeminente que no LEC discoide e achados como rolhas córneas foliculares e espessamento da zona da membrana basal são mínimos ou ausentes. Além disso, não há fibrose dérmica. É característica a degeneração hidrópica da camada basal, com apoptose/corpos colóides na parte inferior da epiderme e derme superficial. Embora também curse com dermatite liquenoide, o LEC

subagudo difere do líquen plano por apresentar deposição de mucina, paraceratose, áreas de atrofia da camada espinhosa da epiderme e satelitose de linfócitos ao redor de ceratinócitos necróticos.^{16,23} Quando ocorre afluxo de eosinófilos para a derme e infiltrado também na profundidade da derme, deve-se suspeitar de LEC induzido por drogas.¹⁶ De forma semelhante aos subtipos agudo e crônico, os achados da IFD incluem deposição granular de imunoglobulinas e complemento na junção dérmico-epidérmica. Resultados de IFD negativos não excluem o diagnóstico e a positividade na pele normal pode indicar lúpus eritematoso sistêmico concomitante.^{16,27}

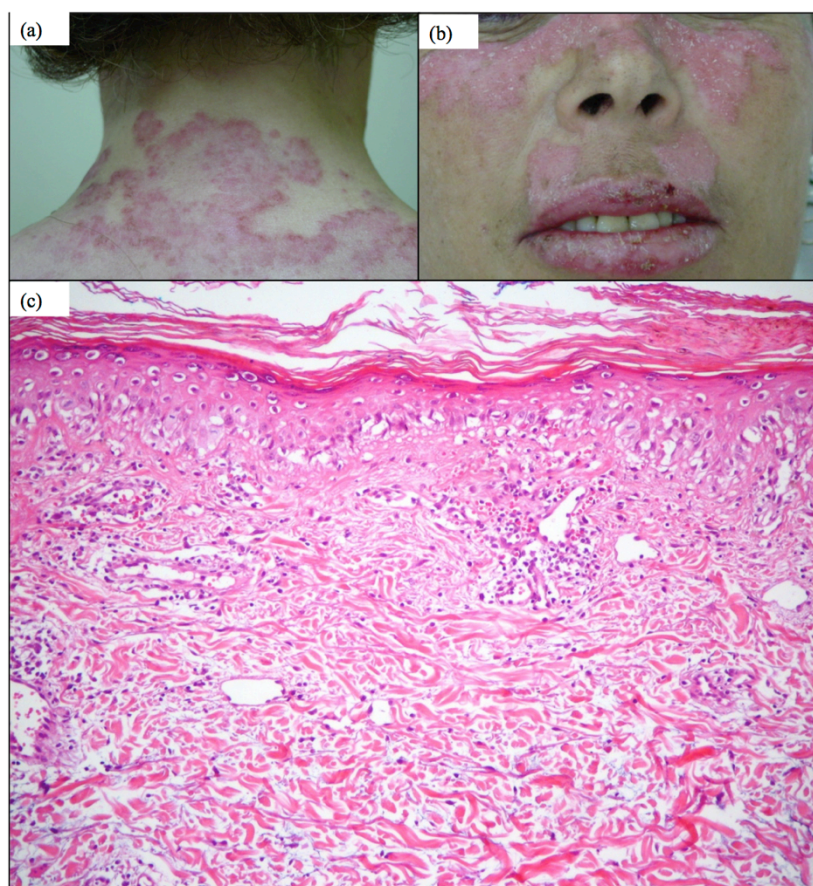


Figura 4. Paciente com LEC subagudo e placas eritematosas policíclicas no dorso e região cervical (a); na face, placas eritematosas com descamação fina (b). Estas lesões normalmente resultam em hipocromia transitória, sem cicatriz. À histopatologia (c) das lesões observa-se atrofia epidérmica e hiperqueratose, degeneração vacuolar da camada basal e infiltrado mononuclear na interface dermoepidérmica e também nas regiões perivascular e perianexiais superficiais. Discreto depósito dérmico de mucina pode ser observado. (HE, 200x). Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da

Disciplina de Dermatologia da Unicamp.; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo.

1.1.4 Lúpus eritematoso cutâneo túmido

O LEC túmido é incomum e provavelmente subdiagnosticado, uma vez que tem natureza intermitente e curso benigno.^{8,22} As lesões típicas são placas eritematosas infiltradas ou edematosas, urticária-símile, de superfície lisa. Predomina em áreas fotoexpostas, como face, dorso superior, colo e faces extensoras dos membros superiores, poupando as regiões interarticulares e axilas. As bordas das lesões são bem delimitadas e podem coalescer, conferindo aspecto arciforme a algumas lesões. Alguns pacientes apresentam lesões cutâneas anulares que se assemelham ao LEC subagudo, porém o LEC túmido não cursa com descamação. Resolvem-se sem cicatrizes ou discromias.²⁸ As alterações epidérmicas são mínimas ou ausentes nos cortes histopatológicos corados em H&E, e o espessamento da zona da membrana basal pode não ocorrer.²⁹ Nota-se um denso infiltrado inflamatório mononuclear, com número variável de plasmócitos, perivascular e perifolicular,. Deve-se salientar a densa deposição de mucina intersticial, tanto na superfície quanto na profundidade dérmica, característica deste subtipo.^{1,29} Mais da metade das amostras mostra IFD negativa; quando positiva inclui deposição granular de imunoglobulinas e complemento na junção dérmico-epidérmica.^{30,31}

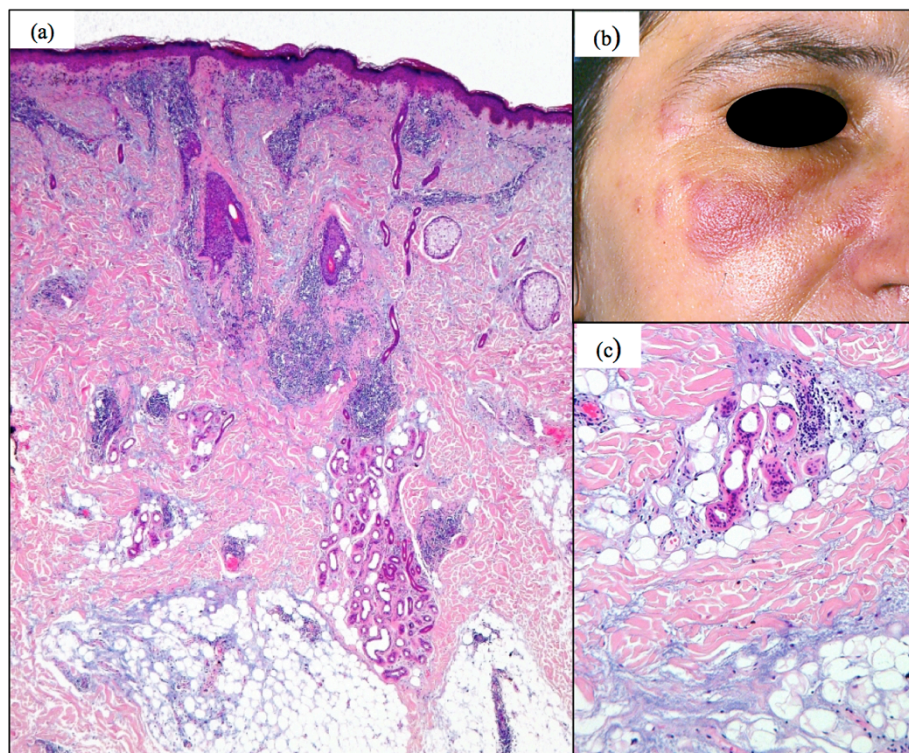


Figura 5. Placas eritematosas e infiltradas na região malar de uma paciente com LEC tímido (b). A figura (a) ilustra os aspectos histológicos desse subtipo, como a ausência de alterações epidérmicas, denso infiltrado linfoide perivascular e perianexial na derme superficial e profunda, além de intensa mucinose dérmica, mais evidentes no detalhe da figura (c). (HE, 200x) Créditos das imagens clínicas: Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza- acervo da Disciplina de Dermatologia da Unicamp; demais imagens: fotos histopatológicas de amostras do estudo.

1.2 Patogênese do lúpus eritematoso cutâneo

Vários estudos sobre a patogênese do lúpus eritematoso cutâneo vêm sendo publicados, principalmente em relação aos fatores responsáveis pela resposta imune aberrante e consequente dano tecidual. A patogênese depende de desregulação do sistema imune e uma complexa ação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.^{14,15} Entretanto, a deflagração do fenômeno autoimune ainda não é completamente compreendida.

1.2.1 Fatores Genéticos

O LE é uma doença multifatorial, com complexa participação e interação entre fatores genéticos, do ambiente e imunológicos. Alguns genes capazes de predispor ao desenvolvimento da doença já foram identificados. Estes genes medeiam a função de células imunes B e T, células apresentadoras de antígenos e processos de sinalização celular que se

baseiam na secreção de citocinas, como receptores toll-like (TLR) e fator nuclear kappa beta (FN- $\kappa\beta$) além de mudanças genéticas também ligadas à apoptose e depuração celular.^{32,33} Polimorfismos genéticos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), como HLA-DR2, HLA-DR3 e HLA-DRB1 são conhecidos como propensores ao desenvolvimento de LE³². Também foi observada forte associação entre LEC subagudo, anticorpos anti-Ro e os fenótipos HLA-B8, DR-3, DRw-52.^{15,34} No lúpus eritematoso crônico discoide há associações genéticas que incluem os haplótipos A1, B8, DR3, B7 e DR2.³⁵ Além disso, há várias regiões gênicas, fora das áreas de MHC, que parecem predispor a maior susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e cutâneo por codificarem citocinas e seus receptores, moléculas de adesão, além de genes que atuam na apoptose. Um exemplo são os polimorfismos próximos ao locus gênico de expressão cutânea de IFN- κ , e também polimorfismos de tirosina-quinase 2 (TYK2) e fator regulador de interferon 5 (IRF5), que tem sido associados ao LEC.^{32,36} Também existem deficiências herdadas de complemento que se relacionam ao surgimento de lúpus cutâneo, como por exemplo a deficiência de C1q, que leva a lesões lúpus-símile, fotoinduzidas, e deficiências de C2 e C4, que predispõem a LEC subagudo.³ Mutações no gene TREX-1, que altera a susceptibilidade a morte celular mediada por granzima A, está associada a lúpus pérnio familiar.³⁷

1.2.2 Radiação Ultravioleta

A relação de causa e efeito entre a luz ultravioleta (UV) e o LEC é clara, e a sua capacidade de induzir e exacerbar lesões cutâneas nos diversos subtipos de LEC já foi demonstrada em diversos estudos.³⁸ Entretanto, a vasta complexidade da resposta imune na pele dificulta prever a cascata de eventos e os efeitos exatos da radiação ultravioleta sobre a gênese de diferentes lesões cutâneas. Investigações anteriores definiam apenas a relação do espectro da luz UVB (290-320nm) com as formas cutâneas de lúpus eritematoso,³⁹⁻⁴³ porém está demonstrado que a luz UVA também pode contribuir para a indução de lesões cutâneas.^{14,34,44,45} A luz solar pode não somente agravar lesões cutâneas lúpicas, mas também exacerbar manifestações clínicas sistêmicas da doença.³⁴

Embora o exato mecanismo de indução do CLE pela luz UV não seja conhecido, acredita-se que a apoptose de queratinócitos, externalização de autoantígenos e ativação da cascata de liberação de citocinas promovidas pela irradiação contribuam para o desenvolvimento e progressão do LEC.^{32,46} A fotoexposição induz liberação vários fatores pró-inflamatórios, como IFN- α , TNF- α , IL-1, IL-6, ICAM-1, Hsp 70, Hsp 90, e iNOS.^{15,34,47-}

⁴⁹ Este microambiente inflamatório, associado ao dano do DNA celular, resulta na morte de ceratinócitos, liberando potenciais autoantígenos que servem como estímulo a células T e B autorreativas.³²

Anticorpos contra antígenos nucleoproteicos, Ro/SS-A e algumas vezes La/SS-B, estão altamente associados à fotossensibilidade, principalmente no lúpus eritematoso sistêmico e no LEC subagudo.^{1,50} Sabe-se que o antígeno Ro é um regulador negativo da produção de citocinas pró-inflamatórias, que incluem TNF- α , IFN- α , IFN- β e IL-12.¹⁵ Estudos em modelos animais demonstraram que defeitos no antígeno RO também levam a uma inflamação tissular via IL-23/Th17. A irradiação por UVB também induz a aumento dos níveis de CSF-1 (fator estimulador de colônias) tanto séricos quanto na pele, em modelos animais. Também há liberação de HMGB1 (high mobility group Box protein 1), uma citocina pró-inflamatória liberada por monócitos e macrófagos, que se correlaciona com a expressão de IL-1 β e TNF.⁵¹

1.2.3 Infecções, drogas, fatores hormonais

Outros fatores, além da radiação UV, provavelmente estão associados à indução do LE. Infecções por citomegalovírus, hepatite C e vírus Epstein-Barr tem sido implicados na patogênese da doença e os fenômenos de mimetismo molecular, superantígenos, disseminação de epítomos (“epitope spreading”) e alteração na ativação e sobrevivência de células imunes atuam na deflagração do fenômeno autoimune.³² De fato, altos níveis de anticorpos contra o vírus do Epstein-Barr se correlaciona com manifestações cutâneas e articulares de lúpus.⁵² Infecções bacterianas também poderiam estar implicadas no surgimento da doença, estimulando células plasmocitóides a produzir citocinas do tipo IFN e facilitar a produção de autoanticorpos.³² Medicamentos também podem estar associados ao surgimento do LE sistêmico e cutâneo, como terbinafina, bloqueadores de canal de cálcio e hidroclorotiazida, provavelmente por indução de fotossensibilidade. Existem também diversas publicações referindo surgimento de LEC durante terapias anti-TNF, embora também existam outras publicações referindo melhora de lesões cutâneas lúpicas com esta mesma terapia.¹⁴ O tabagismo também tem sido incriminado como um agravante das lesões lúpicas.⁵³ Fatores hormonais também parecem ser importantes, ilustrados pela maior frequência da doença em mulheres na pré-menopausa, e a piora durante a gestação. Acredita que sua participação se dê pelos estrogênios, que são capazes de modular a resposta T-helper (Th) para o padrão Th2 e aumentar a produção de IFN- α , IL-4, IL-10 e TNF- α .³²

1.2.4 Apoptose e ativação macrofágica no lúpus eritematoso cutâneo

Os mecanismos moleculares que atuam no fenômeno apoptótico do LE ainda não são completamente compreendidos, porém há evidências de seu papel crucial na patogênese da doença. Em um tecido normal, a formação das células apoptóticas se dá pela ativação das caspases, promovendo exposição de fosfolipídios de carga negativa na porção exterior da membrana celular, seguida da formação de espécies reativas de oxigênio e clivagem do DNA. O mecanismo apoptótico pode ocorrer via extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca é ativada pela ligação dos receptores de morte celular, como CD95/Fas, receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNF-R1) ou receptores TRAIL. A via intrínseca é iniciada por sensores de dano intracelular pró-apoptóticos da família Bcl-2, como BAX, BAD e BIM, que agem na membrana mitocondrial e levam à liberação do citocromo para o citosol.¹⁴ A etapa final é a depuração das células apoptóticas pelos fagócitos, que em situações fisiológicas ocorre em poucas horas e sem resposta autoimune direcionada contra autoantígenos provenientes dessas células.⁵⁴ Além disso, a preservação, pelo fenômeno apoptótico normal, da integridade da membrana celular até a sua fagocitose impede a liberação de moléculas associadas ao dano intracelular (DAMPs) e potenciais autoantígenos, como a HMGB1, proteínas de choque térmico, ácido úrico e complexos DNA-histona.¹⁴ As células apoptóticas também são conhecidas por iniciar respostas de tolerância e imunossupressão nas células dendríticas e nos macrófagos ativados.^{14,34} Estudos *in vitro* demonstraram a secreção de TGF- β e IL-10 pelos macrófagos após o encontro com células apoptóticas, e também um estado de baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e liberação de citocinas inflamatórias pelas células dendríticas.^{14,55,56} Deste modo, além de seu papel como principal removedor primário de restos celulares, os macrófagos podem promover tolerância e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , pelas células vizinhas. Entretanto, dependendo do tipo de célula fagocítica (macrófagos e células dendríticas imaturas versus células dendríticas maduras) que interage com a célula apoptótica, há o desenvolvimento de tolerância ou autoimunidade.³⁴

Há evidências de alterações do mecanismo apoptótico na patogênese do LE cutâneo. Já foi demonstrado o aumento do número de ceratinócitos apoptóticos na interface dermoepidérmica em lesões de LEC crônico e subagudo.⁵⁷⁻⁶⁰ Alto número de células apoptóticas tem sido apontado como gatilho na maturação das células dendríticas locais e na promoção de apresentação antigênica a células T MHC de classes I e II.³⁴

Acredita-se que um aumento do fenômeno apoptótico, associado a defeitos na depuração das células apoptóticas, poderia permitir a quebra da tolerância a auto-antígenos e ser responsável pela deflagração do fenômeno autoimune no lúpus.^{34,14} Acredita-se que a externalização de autoantígenos na membrana celular permitiria que autoanticorpos circulantes ganhassem acesso a estes autoantígenos.⁴⁶ Este processo poderia ser desencadeado por liberação de citocinas UV-induzidas ou diretamente pela luz UV por meio de fenômenos citotóxicos.³⁴ A citotoxicidade inclui vários mecanismos: liberação de perforina, granzimas e granulicina pelas células CD8 citotóxicas e *Natural Killer* (NK), liberação de citocinas (como TNF- α e IL-1), e o gatilho do Fas pelo Fas ligante.^{34,61} Também foi observado que o aumento do número de células apoptóticas na pele lesada de pacientes com a doença correlaciona-se com aumento da expressão da proteína p53.⁵⁸ A proteína p53 é uma proteína supressora de neoplasia e é ativada em resposta a dano UV-induzido ao DNA e em resposta às citocinas TNF- α e IFN- γ , podendo iniciar a morte celular por apoptose.³⁴ Além disso, sabe-se que o dano ao queratinócito pode promover sua necrose, liberando mediadores pró-inflamatórios potentes como a citocina HMGB1 por monócitos e macrófagos. Tem sido descrita expressão de HMGB1 extracelular em lesões de lúpus cutâneo, com seu pico 48 horas após a irradiação pelo UVB na pele humana, que se correlaciona à expressão de IL1- β e citocinas do tipo TNF.⁵¹

1.2.5 Citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão

O sistema IFN tem papel importante na patogênese do lúpus. Ele participa da ativação e modulação do sistema imune e age na interação entre a imunidade inata e adaptativa. Seus efeitos são amplos e inclui diferenciação das células B, na transformação de monócitos em células apresentadoras de antígeno, ativação da via Th1 e supressão de células T regulatórias. Na pele, ele aumenta o recrutamento de leucócitos por meio de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão.^{14,62} Estudos recentes estabeleceram evidência da participação do sistema IFN, particularmente quimiocinas pró-inflamatórias induzidas por ele, no desenvolvimento de lesões cutâneas lúpicas.¹⁵ Células dendríticas produtoras desta citocina foram encontradas em vários subtipos de lúpus cutâneo, incluindo os subtipos discoide, tímido e subagudo.^{63,64}

A participação da produção local de IFN- α no desencadeamento da doença cutânea é sugerida pela presença de proteínas relacionadas a IFN na pele lesada e pela expressão prolongada e aumentada das proteínas relacionadas a IFN-I, decorrente da

exposição à luz UVB.⁵¹ Além disso, os níveis de IFN-I correlacionam-se com a atividade da doença no lúpus sistêmico.^{65,66} O IFN-I é conhecido por aumentar a capacidade citotóxica dos linfócitos circulantes e induzir a produção de quimiocinas pró-inflamatórias como CXCL9 e CXCL10. Estas quimiocinas são ligantes para o receptor da quimiocina CXCR3 e causam recrutamento autoimune de linfócitos CXCR3+ e células dendríticas na pele. A quimiocina CXCL10, liberada nos tecidos-alvo, pode apresentar um mecanismo de recrutamento próprio amplificado que, em parte, seria responsável pela inflamação crônica vista no lúpus eritematoso cutâneo e por diferenças vistas no padrão epidérmico de expressão de CXCL9 e CXCL10. Um estudo encontrou expressão de CXCL 9 e 10, predominantemente na epiderme e zona juncional, nos diversos tipos de lúpus cutâneo. Entretanto, o CXCL9 foi observado em toda a epiderme e o CXCL 10 em áreas basais com intensa degeneração hidrópica.⁶⁵

Diversos trabalhos também têm avaliado a participação do TNF- α nas manifestações cutâneas do lúpus. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células, inclusive ceratinócitos, com importante papel na regulação do sistema imune.⁶² Além da sua produção pelos ceratinócitos mediante exposição à radiação UV, como mencionado anteriormente, existe o conhecimento crescente de que o sistema TNF- α hiperativado atua em várias doenças auto-imunes, incluindo o lúpus eritematoso. Entretanto, seu papel exato na patogênese do LEC ainda não foi definido.^{32,62} Níveis séricos elevados dessa citocina são encontrados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e eles se correlacionam com a atividade da doença.¹⁵ Zampieri et al. observaram que amostras de lesões refratárias de LE cutâneo subagudo exibem forte expressão de TNF- α , o que não se observa na pele não lesional do mesmo grupo de pacientes ou nos linfomas cutâneos de células T.⁶⁷ A IL-1, citocina pró-inflamatória liberada pelos ceratinócitos após estímulo pela luz UV, também age de forma sinérgica à liberação de TNF- α .⁶² Além disso, o TNF- α também se mostra importante na regulação da molécula de adesão intercelular endotelial ICAM-1 e da molécula de adesão vascular VCAM-1.⁵¹ A propósito, há evidências de que a expressão de ICAM-1 seja essencial para o desenvolvimento de lesões cutâneas em geral, já que modelos animais não produtores de ICAM-1 não desenvolvem lesões cutâneas.⁶⁸ Entretanto, o uso de drogas anti- TNF- α tem sido associado a reações adversas que incluem surgimento de lesões cutâneas lúpicas e lúpus eritematoso sistêmico, e a causa para esses achados paradoxais ainda não é conhecida.^{32,62,69}

A IL-6 também vem sendo estudada em relação à sua participação na patogênese do LE cutâneo. A IL-6 é uma citocina multifuncional primariamente produzida por monócitos

e macrófagos e que estimula a diferenciação de células B e secreção de imunoglobulinas e promove diferenciação de células T citotóxicas. Em estudos experimentais, níveis elevados de RNAm de IL-6 são detectados na pele irradiada por luz UV, juntamente com IL-1 e TNF- α .^{51,62} IL-10, embora seja principalmente uma citocina anti-inflamatória, também pode estimular hiperatividade de células B juntamente com IL-6, e os níveis de ambos estão aumentados no soro de pacientes com LE sistêmico. Os níveis de IL-10 se correlaciona com a presença de anticorpos anti-DNA e negativamente com níveis séricos de C3, C4 e linfócitos.^{70,71}

A IL-18 também vem sendo investigada por sua participação no desenvolvimento do LE cutâneo. A IL-18 pertence à “superfamília” das IL-1 e medeia o infiltrado celular no tecido. Além disso, estimula a expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-1, e induz liberação de quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11, além de estimular a expressão de Fas-L.^{51,62} A expressão de IL-18 é maior em ceratinócitos de pacientes com lúpus cutâneo do que em indivíduos normais e se correlaciona com apoptose.⁷² Sob o estímulo de IL-18, os ceratinócitos produzem TNF- α e não expressam IL-12 (uma citocina que protege os ceratinócitos da apoptose induzida pela UV).¹⁵

1.2.6 Dano tecidual

O estímulo ambiental de resposta imune aberrante em indivíduos geneticamente predispostos resulta na ativação de células efetoras e acúmulo de células inflamatórias. Estas incluem linfócitos B, T, células dendríticas e macrófagos, que danificam o tecido diretamente ou indiretamente por meio da produção de citocinas e anticorpos.⁵¹

A produção de anticorpos é uma condição inerente ao LE sistêmico. A quebra de tolerância imunológica, tanto central, quanto periférica, resulta em células B e plasmócitos autorreativos. As células B são focalmente aumentadas em lesões cutâneas lúpicas, entretanto seu papel, assim como de alguns anticorpos específicos relacionados ao LEC, ainda são indefinidos.^{32,73} O LEC subagudo, por exemplo, associa-se com frequência à presença de anticorpos anti-Ro/SSA, que são dirigidos ao RNA celular.³² Imunoglobulina IgG1 é uma subclasse de IgG encontrada em lesões de LEC subagudo e é conhecida por ativar complemento e iniciar a citotoxicidade celular anticorpo-dependente.³⁴ A presença do complexo de ataque à membrana, na junção dermoepidérmica de lesões cutâneas de LE, sugere uma patogênese também anticorpo-mediada para o dano celular visto no LE cutâneo. A presença do complemento (C5b-9) na pele lesional de pacientes com lúpus eritematoso

sistêmico, LEC subagudo e LEC crônico sugere que este complexo pode atuar na patogênese das lesões.³⁴

As células T são as predominantes nas lesões de LEC.⁵¹ Entretanto, o tipo predominante dessas células no infiltrado inflamatório ainda é controverso. Wenzel et al⁷⁴ encontrou maior expressão de células T CD8+ citotóxicas em amostras cutâneas de LEC discoide do que em amostras de LEC subagudo, porém outros estudos não confirmam.⁷⁵ A autoimunidade, no LE, até os dias atuais, também não é completamente explicada pelo paradigma Th1/Th2. As células T helper 17 (Th 17) podem auxiliar na caracterização da progressão do fenômeno autoimune nos pacientes acometidos por LE.⁶³ As citocinas mais conhecidas que são produzidas nesta forma de reação são a IL-17, IL17-F, IL-22 e IL-21. Tanasescu et al⁷⁶, estudaram a participação dessas citocinas em lesões cutâneas de LE sistêmico, LE crônico discoide e LE cutâneo subagudo pela técnica imuno-histoquímica. Os autores concluíram que a população de linfócitos Th17 pode estar implicada nas lesões cutâneas de pacientes com LE. IL-17 estimula as células T e também aumenta a produção de autoanticorpos, citocinas inflamatórias e quimiocinas.⁶²

1.2.7 Tolerância imunológica

Conforme já mencionado anteriormente, a quebra da tolerância imunológica, tanto periférica, quanto central, é fundamental no desencadeamento do fenômeno autoimune no LE sistêmico.⁷⁷ Entretanto, sua participação na patogênese do LEC ainda vem sendo estudada e permanece incompletamente compreendida. Acredita-se que defeitos nos mecanismos de tolerância imunológica periférica podem estar associados ao desenvolvimento de lesões cutâneas lúpicas. As células T regulatórias são CD4+CD25+ e assumem papel importante na supressão do sistema imune a auto-antígenos.⁷⁸ O FOXP3 (fator de transcrição *forkhead box P3*) é um fator de transcrição, pertencente a família *forkhead*, essencial para o desenvolvimento e função da maioria das células T regulatórias, sendo que as células T CD4+CD25+ expressam altos níveis deste fator.⁷⁹ Estas células mantêm a tolerância imunológica pela supressão da atividade de células CD4, CD8, NK, células B e dendríticas.⁴⁶ A presença de mutações no gene FOXP3, em murinos, resulta na ausência de linfócitos T regulatórios (Treg) CD4+CD25+ e doença autoimune em múltiplos sistemas.^{78,79} Dessa forma, o FOXP3 assume papel importante na regulação da resposta imune pelas células T periféricas. A teoria mais provável é de que as células Treg estejam reduzidas em pacientes de LE sistêmico, tendo em vista que a maioria dos estudos sobre a expressão das células T

regulatórias CD4+CD25+ no lúpus sistêmico encontrou uma expressão diminuída destas células neste grupo, em relação a controles normais, embora haja estudos que demonstraram aumento da expressão.⁷⁸ Tem também sido proposto as Treg em pacientes de LE sistêmico tenham uma falha em suprimir a produção de citocinas ou que as células T sejam resistentes a supressão pelas Treg.⁷⁷ Ainda são poucos os estudos sobre a participação deste grupo celular no LEC, porém há evidências de que ele esteja menos presente nas lesões cutâneas.^{75,78,80,81} Especula-se que as células Th17 e T regulatórias regulam-se reciprocamente.⁸²

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos deste trabalho foram:

a) Estudar, em amostras de pele acometida por LEC discoide, subagudo e tímido, os seus aspectos histológicos, de IFD e imuno-histoquímicos, de modo compreender melhor a patogênese destes subtipos de LEC e justificar as diferenças clinico-histopatológicas entre eles;

b) Comparar os subtipos de LEC, por meio da técnica imuno-histoquímica, quanto à resposta imune:

-T citotóxica mediada por grânulos

-inflamatória

-anti-inflamatória

c) Avaliar se a presença do diagnóstico concomitante de LE sistêmico (definido pelos critérios diagnósticos da ACR^{11,12}), modifica o microambiente inflamatório e a resposta T citotóxica nas lesões de LEC.

2.2 Objetivos específicos:

Capítulo I: Caracterizar e comparar a citotoxicidade mediada por grânulos em amostras de pele de LEC discoide, subagudo e tímido, por meio da expressão imuno-histoquímica de CD8, CD56, granzima A, granzima B, granzulina e perforina;

Capítulo II: Caracterizar e comparar a participação das células T regulatórias e a resposta imunológica anti-inflamatória em amostras cutâneas de LEC discoide, subagudo e tímido por meio da expressão imuno-histoquímica de CD4, CD8, CD25, FOXP3 e IL-10.

Capítulo III: Comparar o perfil de expressão imuno-histoquímica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α e da molécula de adesão ICAM-1 em amostras cutâneas de LEC discoide, subagudo e tímido e correlacioná-lo com o exame de imunofluorescência direta para imunoglobulinas e complemento nestas amostras, de modo a investigar a participação de fatores sistêmicos e inflamatórios locais que justifiquem as diferenças clínicas e histológicas observadas entre os subtipos de LEC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo, tamanho amostral e variáveis

O comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp aprovou a metodologia deste estudo, que está de acordo com a declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983.

Trata-se de estudo retrospectivo, em que foi realizado um levantamento de todas as biópsias realizadas no Departamento de Anatomia Patológica no período de 1995 a 2012, provenientes de pacientes atendidos na rotina dos ambulatórios da Disciplina de Dermatologia da FCM/Unicamp, com suspeita de LEC. Foram selecionados mais de 500 laudos de pacientes, que tiveram seus respectivos prontuários analisados quanto ao diagnóstico confirmado (pelos dados clínicos e histopatológicos) de LEC (discoide, tímido e subagudo), resultado positivo para depósito de imunoglobulinas ou complemento na zona da membrana basal da epiderme, e dados clínicos e laboratoriais que permitissem identificar a associação ou não com LE sistêmico (definida pela presença dos critérios da ACR). Destes, 202 pacientes com LEC foram potencialmente elegíveis para o estudo e 114 tiveram suas amostras de tecido cutâneo acometido por LEC, incluídas em parafina, recuperadas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ao todo, 59 pacientes com LEC (LEC discoide =21, LEC subagudo=17, LEC tímido=21) foram incluídos no estudo, sendo que, destes pacientes, 20 preenchiam critérios para o diagnóstico de LE sistêmico e 39 não preenchiam (70,58% da população estudada de LE subagudo e 19,04% da de LE discoide e tímido).

As 59 amostras de pele foram submetidas a cortes adicionais e analisadas histologicamente por meio da técnica imuno-histoquímica. Foram avaliadas, por meio de dados de prontuário, as variáveis: idade, sexo, cor e resultados da imunofluorescência direta, que foram analisadas em relação a positividade para os conjugados IgA, IgG, IgM, C3 e C1q e natureza e tipo do depósito (focal ou difuso, granular ou linear).

Critérios de inclusão:

- Diagnóstico confirmado de LEC e um dos seguintes subtipos: discoide, subagudo e tímido, de acordo com a literatura vigente¹;
- Amostra de pele estocada em parafina preenchendo os seguintes quesitos: em bom estado, em quantidade suficiente para a realização de novos cortes (para as reações imuno-histoquímicas), contendo alterações histopatológicas, sob a coloração de H&E,

ilustrativas do subtipo de LEC crônico definido à clínica para cada paciente, de acordo com a literatura vigente.^{16,22}

- Resultado positivo de exame de imunofluorescência direta da pele, exceto para o LEC tímido, por ser o resultado deste exame frequentemente negativo neste subtipo,

- Exame de imunofluorescência direta obtido a partir de amostras de pele sempre coletadas do mesmo local e na mesma data daquela obtida para exame histológico.

- Prontuários contendo dados clínicos, laboratoriais e de seguimento completos;

Crítérios de exclusão:

- Amostras com o resultado inadequado de reações imuno-histoquímicas, mesmo após repetição.

3.2 Técnica imuno-histoquímica

As amostras de tecido cutâneo incluídas em parafina foram encaminhadas para cortes histológicos na espessura de 4 µm adicionais para tratamento pelo método de reação imuno-histoquímica convencional com polímeros (Kit Novolink, Laboratórios Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido) ou pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase de rábano (LSAB-HRP, código 0609, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Cada anticorpo foi, inicialmente, testado com dois métodos de recuperação antigênica e diferentes diluições, para otimizar o resultado final de coloração. A visualização de cada complexo foi alcançada com o uso do substrato 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA). Os fragmentos foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer. Secções de linfonodos, apêndice cecal e amígdala foram tratadas, ao mesmo tempo, com anticorpos para os mesmos marcadores (controle positivo) e a omissão do anticorpo primário foi usada, nos cortes selecionados, para os controles negativos. Todos os procedimentos foram feitos pelo mesmo técnico. Cortes com dobras, rotura, acentuada coloração inespecífica de fundo ou imunomarcção de fraca intensidade foram excluídos e a coloração repetida.

Foram analisadas por meio da técnica imuno-histoquímica:

1. A resposta T citotóxica por meio da expressão dos seguintes marcadores: CD8, CD56, granzima A, granzima B, perforina e granulisina.
2. A resposta inflamatória por meio da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18.
3. A resposta anti-inflamatória por meio da expressão de CD4, CD25, FOXP3 (fator de transcrição das células T regulatórias) e IL-10.

O quadro 3 mostra a relação dos anticorpos utilizados nas reações, bem como o método de recuperação antigênica e o sistema de detecção utilizado.

Quadro 3. Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas do estudo.

Anticorpo primário	Clone	Diluição	Recuperação antigênica (vapor – panela de pressão)	Sistema de Detecção
CD4	SP35; Spring Bioscience, Pleasanton, California, EUA	1:100	Citrato, pH 6.0	Novolink.
CD8	M7103, Dako, Glostrup, Dinamarca	1:100	Citrato, pH 9.0	Novolink.
CD25	4C9; Cell Marque, Rocklin, California, EUA	1:100	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink
CD56	M7304, Dako, Glostrup, Dinamarca	1:150	Citrato, pH 6.0	Novolink.
FOXP3	PCH 101, eBioscience, San Diego, California, EUA	1:200	Tris- EDTA, pH 9.0	Novolink.
Granzima A	GA6; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA	1:60	Citrato, pH 6.0	Novolink
Granzima B	11F1; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink
Granulisina	RJT48; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink
ICAM-1	G5, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA	1:8000	Citrato, pH 6.0	Novolink

IL-1 β	H-153; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA	1:40	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP
IL-6	MQ2-13A5; Biolegend, San Diego, California, EUA	1:500	Citrato, pH 6.0	Novolink
IL-10	AF-217-NA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP
IL-17	H-132; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink
IL-18	N-19; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, EUA	1:40	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP
Perforina	5B10; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, Reino Unido	1:30	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink
TNF- α	AF-210-NA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA	1:50	Citrato, pH 6.0	LSAB-HRP.

3.3 Análise da imunomarcção de CD8, CD56, granzima A, granzima B, perforina, granulisina, ICAM-1, CD4, CD25 e FOXP3

A quantificação dos biomarcadores CD4, CD8, CD25, CD56, granzima A, granzima B, perforina, granulisina, ICAM-1 e FOXP3 no infiltrado dérmico foi feita da seguinte forma: foram selecionados randomicamente, por meio das amostras coradas em H&E, 3 a 10 campos de maior densidade inflamatória e sem artefatos, examinados em aumento de 400x. Esta variação no número de campos selecionados ocorreu pois, em algumas amostras, três campos foram suficientes para documentar todas as células inflamatórias presentes (como em alguns casos de LEC subagudo, em que a densidade inflamatória costuma ser menor e mais superficial). A seguir, estes mesmos campos, para cada seção corada com o

respectivo marcador, foram fotografados e analisados por meio do software Image J® (*Java-based image processing program*, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA), em que todas as células, tanto as imunomarcadas, como as negativas, foram contadas. Para cada marcador, a razão entre o número de células imunomarcadas sobre o total de células inflamatórias em cada imagem foi obtido e a média de valores foi documentada. (Figuras 6 a 9)

Além disso, também foram contadas as células imunorreativas para CD4, CD25 e FOXP3 presentes na espessura da epiderme ou epitélio infundibular. Foram contabilizadas apenas aquelas cujos núcleos estavam presentes no plano observado. Os valores foram tabulados da seguinte forma: expressão baixa= nenhuma célula até 9 a cada 3 mm lineares; expressão alta= 10 ou mais células a cada 3mm lineares. (Figura 9)

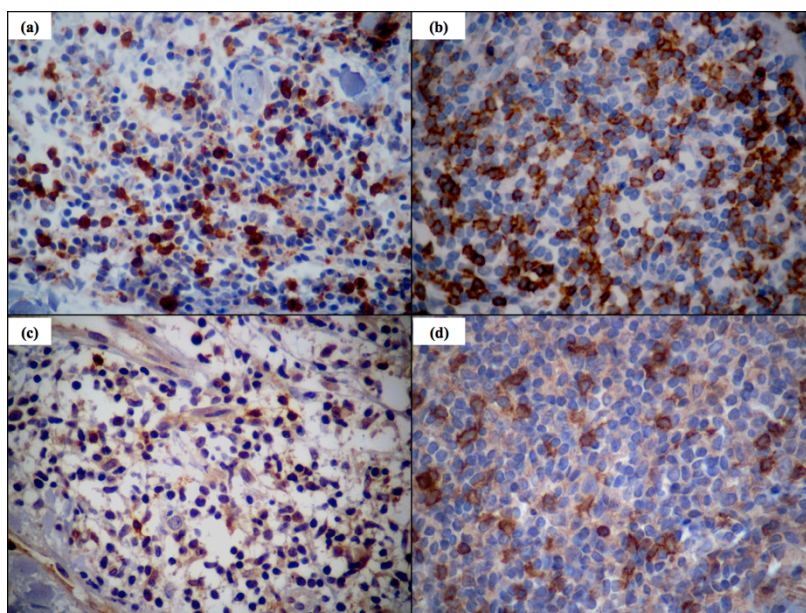


Figura 6. (a) e (b) Imunomarcção citoplasmática e membranosa de CD8 no LEC subagudo e LEC túmido, respectivamente, em amostras pertencentes ao estudo; (c) e (d) Imunomarcção citoplasmática e membranosa de CD56 na pele acometida por LEC subagudo e LEC túmido, respectivamente. (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-CD8 e anti-CD56, aumento original 400x)

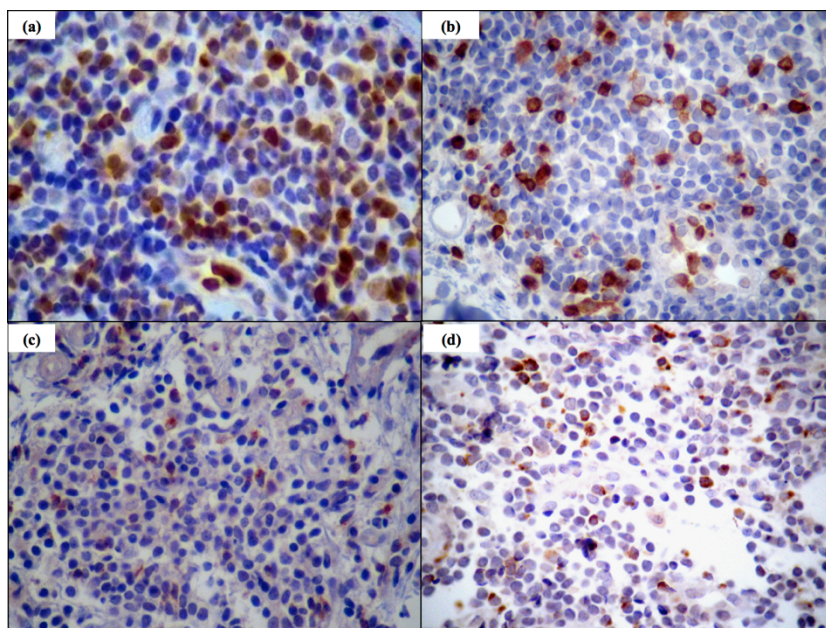


Figura 7. Imunomarcção citoplasmática de perforina (a), granulislina (b), granzima B (c) e granzima A (d) em amostras de pele do estudo, acometidas por LEC túmido. (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-perforina, anti-granulislina, anti-granzima A e B, aumento original 400x)

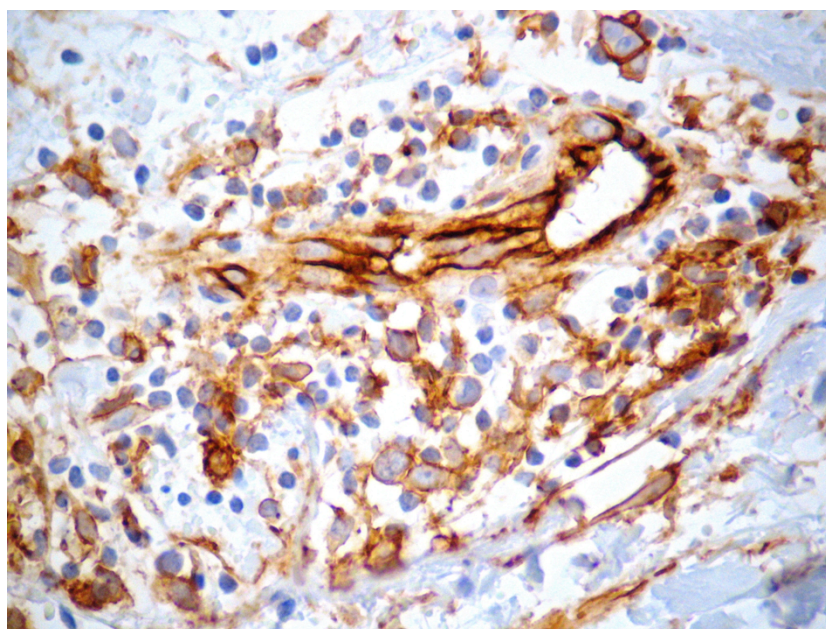


Figura 8. Imunomarcção citoplasmática e membranosa de ICAM-1 em amostra de pele do estudo, acometida por LEC subagudo (imuno-histoquímica, anticorpo anti-ICAM-1, aumento original 400x)

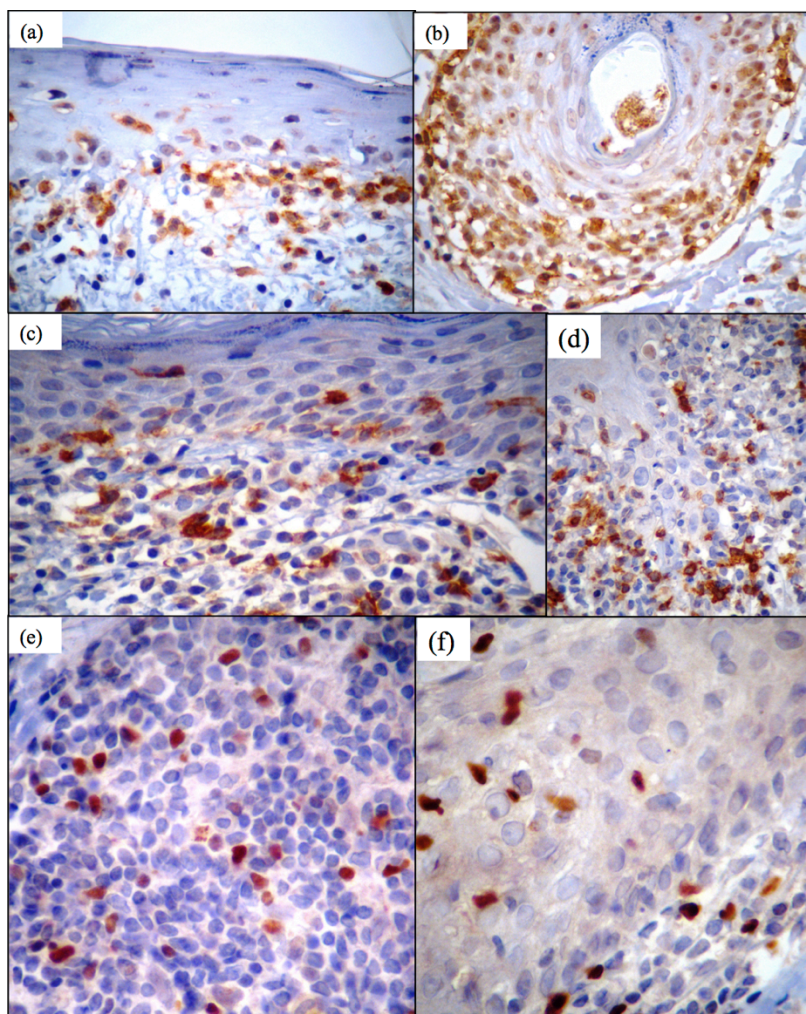


Figura 9. Imunomarcção citoplasmática de CD4 nas células inflamatórias da derme e que também estão presentes na interface entre a derme e a epiderme (a) ou epitélio anexial (b) e migram para outros estratos do epitélio; imunomarcção citoplasmática de CD25 nas células inflamatórias da derme que migram para a epiderme (c) e epitélio anexial (d); imunomarcção de FOXP3 nos núcleos das células inflamatórias que migram pela epiderme (f) e estão também presentes entre as células linfoides na derme (e). (imuno-histoquímica, anticorpo anti- CD4, anti-CD25 e anti-FOXP3, aumento original de 400x).

3.4 Análise da imunomarcção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 e TNF- α

De forma semelhante à metodologia de análise para os biomarcadores anteriormente descritos, para a análise da imunomarcção de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 e TNF- α , cada amostra do estudo foi examinada na coloração de H&E. Foram então selecionados, aleatoriamente, para cada amostra, três campos de maior densidade inflamatória e sem artefatos, em aumento de 400x. A seguir, estes mesmos campos, para cada seção corada

com o respectivo marcador imuno-histoquímico, foram analisados conforme o método empregado por Popovic et. al.⁸³, com as modificações abaixo descritas.

Por se tratar de trabalho retrospectivo, com tempos variados de fixação e demais procedimentos histotécnicos, houve certa dificuldade na avaliação das amostras, pela presença de coloração inespecífica (*background*) e variação na intensidade da coloração. Desta forma, para cada biópsia, a análise da intensidade da coloração baseou-se no seguinte procedimento: identificou-se, em primeiro lugar, no espécime a ser analisado, a estrutura mais corada, a que era atribuído valor “3” de intensidade. Para as demais estruturas, os valores eram relativos ao “3” observado. Dada a necessidade de se avaliar a secreção extracelular da interleucina, que era estimada girando-se o micrométrico do microscópio óptico, a avaliação se deu diretamente no microscópio e não sob análise digital, como no restante dos marcadores. (figuras 10 e 11) Para cada biópsia, a análise dos diversos imunomarcadores no microscópio foi sempre realizada nos mesmos campos representativos.

1. A epiderme foi examinada quanto à intensidade de imunomarcação (classificada como leve, moderada ou forte) e à porcentagem de imunomarcação citoplasmática na sua espessura (<5% = **0**, 5 a 25% = **1**, 26 a 75% = **2**, >75% = **3**);

2. O infiltrado dérmico foi analisado quanto à intensidade da imunomarcação (classificada como leve, moderada ou forte), quanto à porcentagem de células imuno-coradas (<5% = **0**, 5 a 25% = **1**, 26 a 75% = **2**, >75% = **3**) e quanto à porcentagem da ocupação do espaço extracelular pela citocina secretada, na área entre as células inflamatórias (<5% = **0**, 5 a 25% = **1**, 26 a 75% = **2**, >75% = **3**).

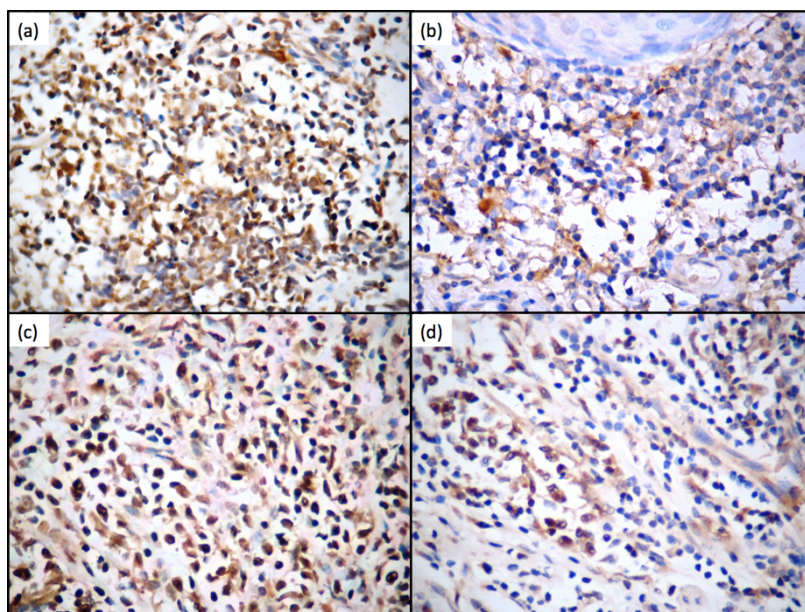


Figura 10. Imunomarcção citoplasmática e intersticial da interleucina IL-1 β (a) e IL-18 na pele de um paciente com LEC discoide (b) ; de IL-17 na pele de um paciente com LE túmido (c) e de IL-10 em uma lesão de LE discoide (d). (técnica imuno-histoquímica, anticorpos anti-IL-1 β , anti-IL-10, anti-IL-17 e anti-IL-18, aumento original 400x)

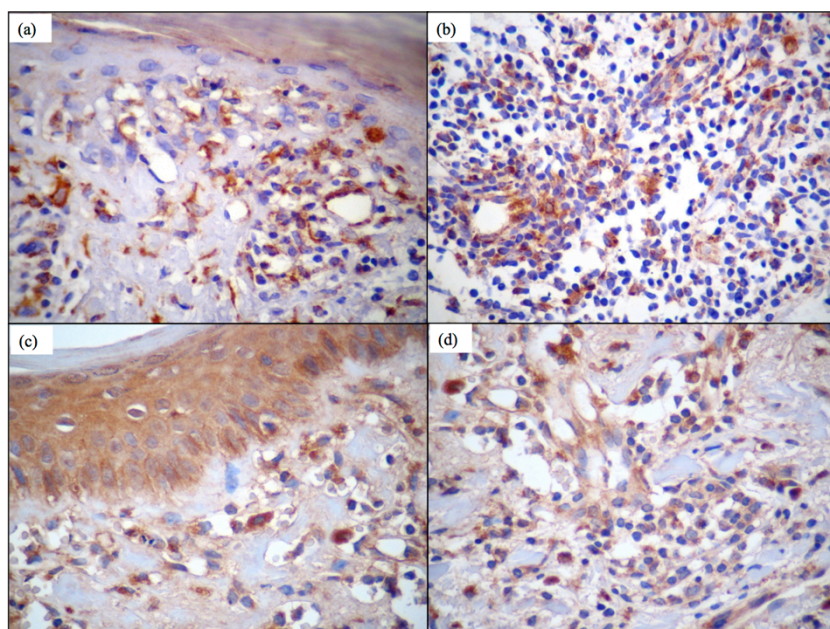


Figura 11. (a) Imunomarcção de IL-6 nas células inflamatórias da derme e que também são vistas na espessura da epiderme; (b) imunomarcção de IL-6 nas células inflamatórias, dendríticas e endoteliais; (c) Imunomarcção de TNF- α na epiderme e dendrócitos dérmicos;

(d) imunomarcção de TNF- α no infiltrado inflamatório dérmico (imuno-histoquímica, anticorpo anti- IL-6 e anti- TNF- α aumento original de 400x)

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram tabulados em planilha do Excel® e analisados estatisticamente por meio do software SAS 9.0 ®. O teste exato de Fisher ou qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre variáveis qualitativas. Mann-Whitney e Kruskal-Wallis- ANOVA ranqueado, seguido de pós-teste de Tukey, foram utilizados para testar diferenças entre as médias de variáveis quantitativas entre os grupos estudados. Teste de correlação de Spearman foi utilizado para testar associação entre variáveis quantitativas. Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Esta tese de doutorado está estruturada conforme o Formato Alternativo, normatizado pela Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas/ Unicamp, sob o parecer PG nº 1985/96.

4.1 Capítulo I

Fognolo L, Soares TCB, Senna CG, Souza EM, Blotta MHSL, Cintra ML. Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus. Clin Exp Dermatol 2014; 39:835-9

Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus

L. Fogagnolo,¹ T. C. B. Soares,¹ C. G. Senna,¹ E. M. Souza,² M. H. S. L. Blotta³ and M. L. Cintra¹

Departments of ¹Pathology, ²Dermatology and ³Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

doi:10.1111/ced.12428

Summary

In cutaneous lupus erythematosus (CLE), the pathogenetic role of cytotoxic granules has been demonstrated in the subacute and discoid subtypes, which show interface dermatitis, but little is known about tumid (T)CLE, which does not show this interface dermatitis, and evolves with minimal epidermal changes. We studied cytotoxic T lymphocytes and cytotoxic granules in discoid ($n = 21$), subacute ($n = 17$), and tumid ($n = 21$) CLE samples. Skin sections were immunohistochemically stained for CD8, CD56, perforin, granzyme A, granzyme B, and granulysin. Inflammatory cells containing the four subtypes of cytotoxic granules were found in all the three CLE forms; however, only the TCLE group showed a positive correlation between the density of CD8+ cells and each subtype of cytotoxic granule-positive cells. In addition, only the TCLE group showed synergy between the densities of cells containing cytotoxic granule subtypes. Cytotoxic granules are important in the pathomechanism of TCLE. They may perform functions other than apoptosis, including maintenance of inflammation and dermal mucinous deposits in TCLE.

Introduction

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is classified into acute, subacute and chronic types. Tumid (T)CLE, formerly considered a subtype of chronic CLE, has been reclassified as a distinct type because of its unique clinicopathological profile.¹ One feature distinguishing CLE subtypes is the way in which the lesions evolve; discoid (D)CLE lesions heal with scarring and atrophy, whereas subacute (S)CLE and TCLE lesions do not.²

The histopathological features also distinguish TCLE from the subacute and discoid subsets. In TCLE, dermal lymphocyte infiltrates and interstitial mucinosis are visible, but the epidermis is spared. Conversely, DCLE and SCLE lesions exhibit dermoepidermal interface involvement. Direct immunofluorescence tests are usually neg-

ative in TCLE, whereas DCLE and SCLE show basement membrane deposits of immunoglobulin and complement.²

There is evidence that apoptosis plays a role in LE by generating novel antigens that are then targeted by autoantibodies.³ Apoptosis can be induced by several processes, including cellular cytotoxic mechanisms, primarily through the release of perforin, granzymes and cytokines produced by cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells.^{4,5} The pathogenetic contribution of cytotoxic granules has been demonstrated in DCLE and SCLE, which present interface dermatitis.⁴ However, little is known about cytotoxicity in TCLE.

We compared the pathogenetic role of granule-mediated cytotoxicity in DCLE, SCLE and TCLE.

Report

The study was approved by our institutional ethics committee. No informed consent was needed, because this was a retrospective study that used only skin samples that are routinely stored at the hospital. No data that could identify the patients were used.

Correspondence: Dr Maria Letícia Cintra, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil
E-mail: marialet@fcm.unicamp.br

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflicts of interest.

Accepted for publication 24 February 2014

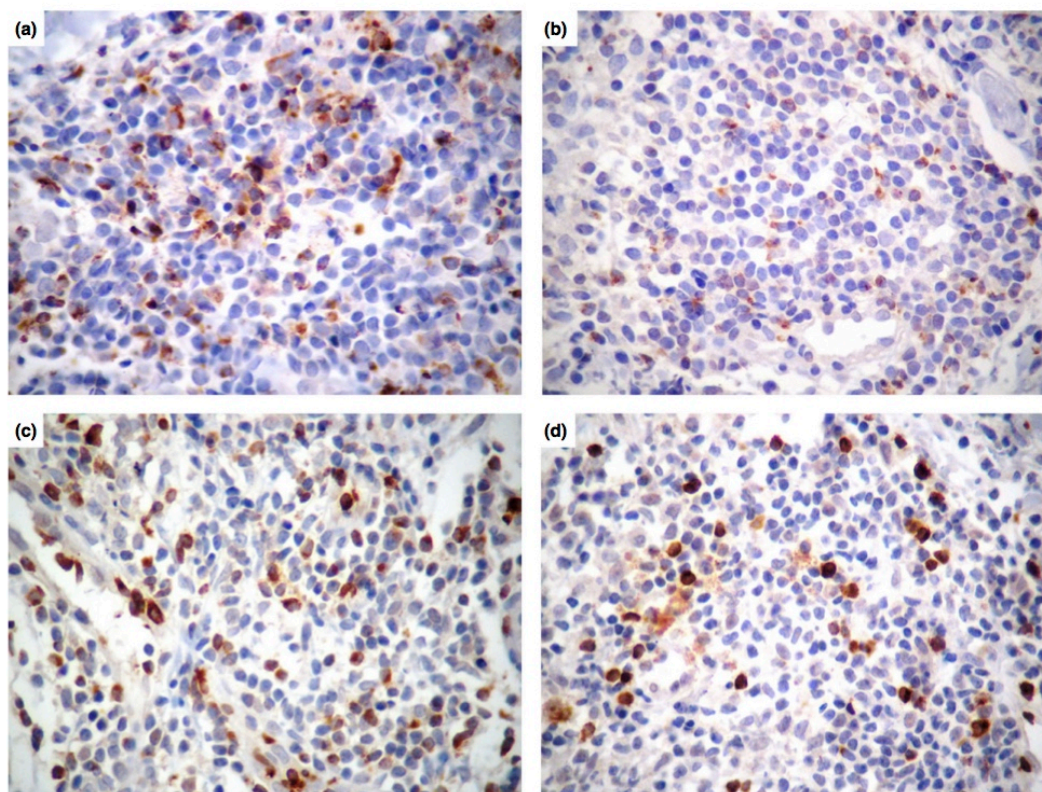


Figure 1 Immunohistochemical staining showed cells positive for (a) granzyme B, (b) granzyme A, (c) perforin and (d) granulyisin in dermal infiltrate of a patient with tumid cutaneous lupus erythematosus (original magnification $\times 400$).

Paraffin wax-embedded skin specimens of patients with CLE were retrieved from the Pathology Department files, and clinical information was obtained from the patients' medical charts. Inclusion criteria were the presence of complete clinical information and

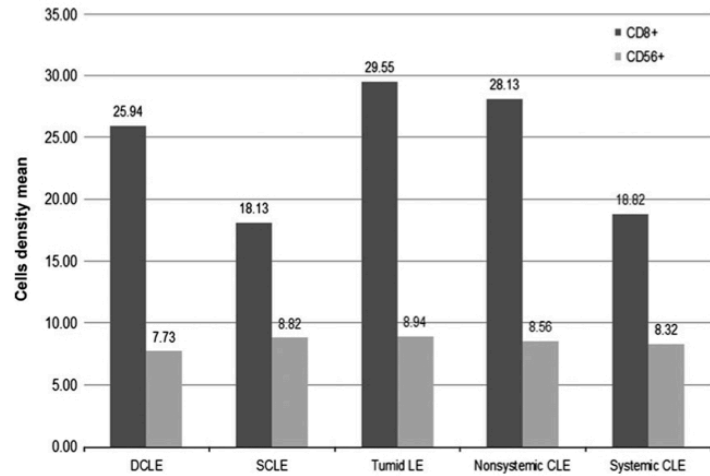
follow-up. Only patients with an unquestionable diagnosis of CLE were included. In total, 59 patients who had been diagnosed with CLE (21 DCLE, 17 SCLE and 21 TCLE) were studied. The three groups were similar in age and sex.

Table 1 Density of the biomarker-stained cells in the CLE subsets.

Variable	DCLE			SCLE			TCLE		
	<i>n</i>	Mean	Range	<i>n</i>	Mean	Range	<i>n</i>	Mean	Range
CD8	21	25.94	13.60–47.33	17	18.13	11.33–30.20	21	29.6	9.00–57.67
CD56	21	7.73	1.20–25.67	17	8.82	3.00–37.54	21	8.94	3.20–45.33
Granzyme A	19	7.98	2.27–17.20	17	7.9	3.62–16.53	21	8.41	3.42–20.96
Granzyme B	20	23.37	8.00–38.67	16	24.29	6.33–38.67	21	25.1	8.67–53.33
Perforin	21	12.09	2.66–39.07	17	14.43	2.00–52.86	21	17.5	1.33–49.84
Granulyisin	20	10.89	4.15–20.81	17	12.42	4.71–27.46	21	14.2	2.38–31.64

CLE, cutaneous lupus erythematosus; DCLE, discoid cutaneous lupus erythematosus, SCLE, subacute cutaneous lupus erythematosus, TCLE, tumid cutaneous lupus erythematosus.

Figure 2 Mean density of CD8+ and CD56+ cells in discoid cutaneous lupus erythematosus (DCLE), subacute cutaneous LE (SCLE), tumid LE, any subtype of cutaneous LE without systemic LE (nonsystemic CLE), and systemic CLE. Reduced CD8+ cells density in SCLE specimens compared with DLE ($P < 0.001$) and tumid LE ($P < 0.001$); in systemic compared with nonsystemic CLE ($P < 0.001$).



Freshly cut skin sections were immunohistochemically targeted with the following monoclonal antibodies: CD8 (M7103), CD56 (M7304) (both Dako, Glostrup, Denmark), granzyme A (GA6; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), granzyme B (11F1), and granulysin (RJT48) and perforin (5B10) (all Novocastra Laboratories, Newcastle-upon-Tyne, UK). A polymer-based immunohistochemical method (Novolink Kit; Novocastra Laboratories) was used. Quantifi-

cation of biomarker staining was performed by a single observer (LF). Ten randomly selected images with dermal inflammatory infiltrate in each section were photographed under $\times 400$ magnification and analysed using ImageJ software (Wayne Rasband; NIH, Bethesda, MD, USA). The ratio of the number of immunostained cells to the total number of cells per image was calculated, and the average values of this ratio were recorded. Association between qualitative

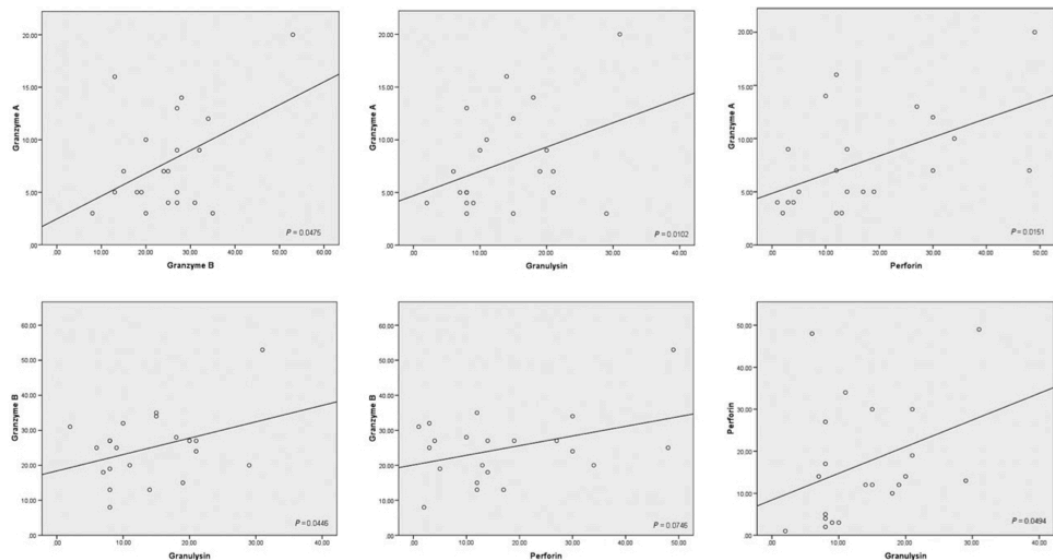


Figure 3 Strong correlation between density of cells positive for perforin, granulysin, granzyme A (grA) or granzyme B (grB) cells in the tumid cutaneous lupus erythematosus group.

values was analysed using the Fisher exact test. Pearson correlation coefficient was used to correlate quantitative variables. Analysis of variance was used to test differences between the mean values of quantitative variables in the three groups. $P < 0.05$ was considered significant.

No statistical differences were found between the three LE groups with regard to the numbers of cells stained with CD56, granzyme A, granzyme B, perforin or granzyme C. Figure 1 shows inflammatory cells targeted with the four cytotoxic granules in TCLE. CD8+ cells density was significantly higher than CD56+ in the three groups. CD8+ cells density was lower in the SCLE group (SCLE vs. DCLE: $P < 0.01$; SCLE vs. TCLE: $P < 0.001$) and in all patients with systemic LE, regardless of their CLE subtype (Table 1; Fig. 2). No differences were found in CD8+ cell density between the TCLE and DCLE groups ($P = 0.17$). In DCLE and SCLE, the number of grA+, grB+, perforin+ and granzyme C+ cells tended to increase when the CD8+ cell number rose, but values were not significant. Only in the TCLE group was a positive correlation found between CD8+ and grA+, grB+, perforin+ and granzyme C+ cell densities ($P < 0.05$). In addition, in this group only, when the density of a granule-positive cell was high, all the other granule-positive cell densities were also increased (Fig. 3).

The importance of ultraviolet light as a trigger of LE, inducing apoptosis and cytokine release, is well known.³ CTLs and NK cells recognize antigens and attack cells through the FAS/FAS ligand system or by releasing cytolytic granules, such as those of the granzyme B/perforin system.^{5,6} Granzymes enter the target cell through membrane pores created by perforin. Granzyme A causes caspase-independent cell death but less DNA damage than granzyme B.⁵ Granzyme C, like granzymes, also alters the permeability of the target cell, and causes mitochondrial dysfunction.⁷ These four granules represent local cytotoxic action markers, whereas CD8+ and CD56+ cells (which indicate CTLs and most NK cells, respectively) are potential cytotoxic lymphocytes.⁴

Our results support the role of granule-mediated cytotoxicity in CLE, as inflammatory cells containing the four cytotoxic granules were found in all three studied forms of CLE. However, the lack of synergy between cytotoxic granules in DCLE and SCLE, as opposed to TCLE, indicates that differences in their pathogenesis might exist. Only in TCLE specimens was a correlation found between CD8+ cells and cells positive for cytotoxic granules, as well as a correlation between the cells positive for the different cytotoxic granules. Because interface dermatitis and apoptosis

are not features of TCLE, these cytotoxic granules are likely to perform other functions, maintaining inflammation and causing dermal mucinosis. Granzymes have been shown to contribute to extracellular matrix degradation, stimulation of cytokine production and growth factor release.⁸

Studies from splenocytes and blood cells of patients with systemic LE revealed low numbers of CD8+ cells, which appeared to be defective in function, possibly due to a genetically determined CD8+ cell defect.⁹ In CLE skin specimens, we found that CD8+ cell density was lower in lesions of patients who had also systemic LE and in patients with SCLE, compared with patients with DCLE or TCLE. This probably reflects a greater susceptibility of patients with SCLE to develop systemic LE.

Our results also suggest that, at least in TCLE lesions, cytotoxic granules are predominantly produced by CD8+ cells. CD56+ cell density was low in all three CLE groups. Impaired NK cytotoxicity has already been verified, and possibly is genetically determined, in patients with systemic LE,¹⁰ indicating that both local and systemic factors act in CLE.

Continued progress in understanding apoptosis and other cytotoxic granule functions may help to clarify the clinical and histopathological differences between CLE subtypes.

Acknowledgements

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Learning points

- Cytotoxic granules play a role in the pathogenesis of TCLE, although this subset of LE does not evolve with interface dermatitis.
- In TCLE, cytotoxic granules may be involved in maintenance of inflammation and dermal mucinosis.
- CD8+ cell density was low in lesions of patients with SCLE and patients with CLE who also had systemic LE.
- In TCLE lesions, cytotoxic granules were produced predominantly by CD8+ cells.
- Improving our knowledge of apoptosis and other cytotoxic granules actions may help to clarify the clinical and histopathological differences between the different CLE subsets.

References

- 1 Kuhn A, Sticherling M, Bonsmann G. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; **5**: 1124–37.
- 2 Obermoser G, Sontheimer RD, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 2010; **19**: 1050–70.
- 3 Lin JH, Dutz JP, Sontheimer RD, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; **33**: 85–106.
- 4 Grassi M, Capello F, Bertolino L et al. Identification of granzyme B-expressing CD-8-positive T cells in lymphocytic inflammatory infiltrate in cutaneous lupus erythematosus and in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol* 2009; **34**: 910–14.
- 5 Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 361–70.
- 6 Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A et al. Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13525–32.
- 7 Zhang H, Zhong C, Shi L et al. Granzysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to necroptosis. *J Immunol* 2009; **182**: 6993–7000.
- 8 Joeckel LT, Bird PI. Are all granzymes cytotoxic in vivo? *Biol Chem* 2014; **395**: 181–202.
- 9 Pender MP. CD8+ T-cell deficiency, Epstein-Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis* 2012; **2012**: 189096.
- 10 Park YW, Kee SJ, Cho YN et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; **60**: 1753–63.

4.2 Capítulo 2

Immunomodulation in cutaneous lupus erythematosus subsets

(Manuscrito preparado para publicação)

Leticia Fogagnolo¹, Elemir Macedo de Souza², Maria Heloísa de Souza Lima Blotta³, César Galusni Senna¹, Cleide Aparecida Moreira Silva⁴, Maria Leticia Cintra¹

1. Pathology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
2. Dermatology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
3. Clinical Pathology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
4. Statistics division, Research Committee, Medical Sciences School, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.

Abstract

Background: cutaneous lupus erythematosus (CLE) presents a range of clinical and histopathological aspects. Regulatory T cells (Tregs) are being implied in the pathogenesis of the disease. A reduced number or function of these cells would result in the final process of altered lymphocyte activation, cytokine production and release of autoantibodies. There are few and controversial reports about Tregs on CLE.

Objective: we studied, retrospectively, 59 CLE subjects (Subacute CLE=17, Chronic discoid CLE=21, CLE tumidus=21) to investigate the potential involvement of immunoregulatory mechanisms behind the distinct clinical/ histologic/ prognostic features of each subtype.

Methods: The skin specimens were immunohistochemically targeted to CD8, CD4, CD25, FOXP3 and IL-10 antibodies.

Results: Twenty patients with CLE fulfilled the criteria for systemic lupus erythematosus (CLE⁺/SLE⁺) and 39 did not (CLE⁺/SLE⁻). CD4⁺ was significantly higher than CD8⁺ cells density in all groups studied. CD8⁺ cells density was significantly lower in subacute CLE when compared with CLE tumidus. Also CD8⁺ cells density was significantly lower in CLE⁺/SLE⁺ than in CLE⁺/SLE⁻ cases. The three subtypes showed CD25⁺ and FOXP3⁺ Tregs and IL-10 staining. However, CD25⁺ and FOXP3⁺ cells density was below 10% and

FOXP3/CD4 ratio low (around 20%) in the three CLE forms. There were no differences on CD25, FOXP3 and IL-10 staining results, by comparing CLE⁺/SLE⁺ and CLE⁺/SLE⁻ patients' specimens. However, only in subacute CLE group, was a significant association found between IL-10 expression and CD4⁺ and CD25⁺ cells density and this subtype presented the highest number of CLE⁺/SLE⁺ patients.

Conclusion: Regulatory T cells participate in cutaneous lupus erythematosus (CLE) pathogenesis. Low FOXP3/CD4 ratio in CLE lesions points to a loss of Tregs. Systemic factors may interfere with immunomodulation in CLE lesions. These results may contribute to a better understanding of CLE pathogenesis and thus the development of new therapeutic strategies.

Keywords: cutaneous lupus erythematosus; regulatory cells; FOXP3; interleukin

Introduction

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is an autoimmune disease with a range of well-defined skin manifestations, classified as acute-, subacute-, chronic- and tumidus subtypes, yet with an incompletely understood pathogenesis.¹ The loss of tolerance, a phenomenon mediated, among other factors, by regulatory T cells (Tregs), is being implied in the pathological process of lupus erythematosus, resulting in altered lymphocyte activation, cytokine and autoantibody production and tissue damage.² CD4⁺ Tregs are the most studied subtype of regulatory cells. They constitutively express CD25 (IL-2 receptor alpha- chain) and FOXP3 (Forkhead Box P3). CD25 is also expressed in effector T cells and even B cells, while FOXP3, an X-chromosome-encoded member of the Forkhead TF family, is essential for the development, maintenance and suppressor function of Tregs.^{3,4} Therefore, FOXP3 is the most specific marker of Tregs. The participation of Tregs in lupus erythematosus is not completely elucidated. The few published studies are controversial and most relied on cases of systemic lupus erythematosus. A reduced number of Tregs was found in the systemic disease,^{3,5-7} but there are studies suggesting normal number but defective function of these cells.^{8,9} Little is known about the role of these cells in CLE and the differences between CLE subtypes regarding the immunoregulatory mechanisms that underlie the disease.

Materials and Methods

The institutional ethics committee approved the methodology. Since this was a retrospective study that used skin samples routinely stored at the University Hospital files, informed consent was dismissed.

Fifty-nine subjects entered the study (CLE tumidus =21; subacute CLE=17, chronic discoid CLE=21). Inclusion criteria were as follows: 1) complete medical files; 2) positive direct immunofluorescence (DIF) tests; discoid and subacute CLE skin paraffin embedded specimens should have been obtained from the same place where the DIF biopsies had been taken. Since DIF results are often negative in LET, this test was not an inclusion criterion for this group; 3) unquestionable diagnosis of the CLE subtype on clinical and histological bases [1]. The stored paraffin wax-embedded skin tissue was freshly cut and immunohistochemically targeted with the following monoclonal antibodies: CD8 (M7103, Dako, Glostrup, Denmark), CD4 (SP35; Bioscience, Pleasanton, USA), CD25 (4C9; Cell Marque, Rocklin, USA), FOXP3 (PCH 101, eBioscience, San Diego, CA, USA), IL-10 (AF-217-NA; R&D Systems, Minneapolis, USA). Labeled Streptavidin-Biotin method (LSAB-HRP, Dako Cytomation) was used to perform IL-10 staining technique and Polymer-based immunohistochemical method (Novolink kit; Novocastra Laboratories) was performed for the other immunomarkers. The CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ and FOXP3⁺ cells density was assessed in three to ten full dermal high power fields (HPFs). One observer blindly performed cells' quantification, using Image J software®. The ratio between the immunostained- and total number of inflammatory cells per image was calculated, and the average values per specimen were recorded. Intraepithelial stained cells were counted and the ratio to the total number of examined HPFs was recorded. IL-10 was evaluated all over each specimen, as follows: a) staining intensity (mild, moderate or strong); b) relative area of epidermis immunostaining within its thickness, c) percentage of immunostained inflammatory cells and d) percentage of extracellular staining within inflammatory fields (0 -<5%; 1 = 5-25%, 2 = 26-75%, > 75% = 3). The statistical package SAS System Software (Cary, NC, USA) was used for data analysis (Fisher's exact test to verify association between qualitative values; Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis- ANOVA on ranks followed by Tukey post-roc test to evaluate differences between quantitative values and Spearman test, for correlation analysis). P-values <0.05 were considered significant.

Results

The table, figure and graph summarize our results. The groups were similar in

relation to age and sex. Of the 59 patients, 20 fulfilled the American College of Rheumatology criteria for classification of systemic lupus erythematosus (CLE⁺/SLE⁺) and 39 did not (CLE⁺/SLE⁻). Subacute CLE group had significantly more cases with concurrent systemic disease. The 3 subtypes showed higher density of CD4⁺ than CD8⁺ cells, but the CD4/CD8 ratio was significantly higher in subacute CLE when compared with CLE tumidus: the CD8⁺ cells density was lower in that former group. Also CD8⁺ cells density was lower in CLE⁺/SLE⁺ than in CLE⁺/SLE⁻ cases. There was no difference between the groups regarding the cells expression of CD25 and FOXP3, but their density was low than 10% in the 3 CLE subtypes. FOXP3/CD4 ratio was around 20% in all CLE specimens and CD25⁺ average density was higher than that of Foxp3⁺. There were no statistical differences between groups regarding intraepidermal CD4, FOXP3 and CD25-positive cells. All the skin specimens stained for IL-10 and the three CLE subtypes showed a similar pattern of immunomarking. CD4, CD25, FOXP3 and IL-10 staining resulted similar in CLE⁺/SLE⁺ and CLE⁺/SLE⁻ patients. Only in subacute CLE, was a significant association between IL-10 and CD4⁺ and CD25⁺ expression found: the higher the CD4⁺ density, the higher the IL-10 dermal expression. However, specimens with the highest CD25⁺ density presented the lowest IL-10 immunostaining.

Discussion

Lupus erythematosus is a spectral disease that ranges from pure cutaneous to systemic and potentially fatal systemic disease.¹ Clinical and histopathological features differ among CLE subtypes. Discoid CLE (the most common subtype of chronic CLE) presents with erythematous scaly plaques that heal with scarring and dyschromia. On histopathological view, there is interface dermatitis with periadnexal lymphocyte infiltrate. Subacute and CLE tumidus heal without scarring, but their clinical aspects differ for the edematous and succulent nature of the tumidus skin lesion, while subacute subtype presents with flat erythematous plaques. The histopathology of these subtypes also differs, since CLE tumidus usually does not affect the epidermis, presents a superficial and deep inflammatory infiltrate, and exuberant mucin deposits. Subacute subtype, similar to discoid CLE, also presents with interface dermatitis, but the dermal inflammatory infiltrate generally is milder and superficial.¹

Tregs help maintain self-tolerance by suppressing CD4, CD8, NK, dendritic and B cells activity.^{10,11} They probably are involved in both systemic lupus erythematosus (SLE) and CLE pathogenesis.¹⁰ Most Tregs are CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and most of the studies found

reduced numbers in SLE patients' serum, particularly in active disease^{10,12}, although it has been proposed that Tregs would have defective function in suppressing cytokine synthesis or T cells would be resistant to Tregs-induced suppression.^{8,9,12} There is a lack of data on the number of FOXP3⁺ cells in normal skin. In a few studies on psoriasis, atopic dermatitis and lichen planus [13-15], was more than 20% of FOXP3⁺ cells among the dermal inflammatory cells found, and, in CLE specimens^{13,15}, a decreased Tregs number. Franz et al¹³ studied 15 cases of CLE, five of each subtype (CLE tumidus, subacute CLE and chronic discoid CLE) and found a FOXP3/CD4 ratio around 10% in CLE subtypes and more than 30% in other cutaneous inflammatory diseases. The percentage of FOXP3⁺ in relation to the total of inflammatory cells was also less than 10%. We found less than 10% of Foxp3⁺ cells within the dermal infiltrate and a Foxp3/CD4 mean ratio of 20% in CLE. Solomon et al¹⁵ reported similar findings, studying subacute and discoid CLE lesions. Like us, no differences in Foxp3⁺ cells density were found between the groups. Because some of CD25⁺ cells are effector T, their average density was higher than that of Foxp3⁺ in the three CLE subtypes. Just as Wenzel et al,¹⁶ we found lower CD8⁺ cells density in subacute CLE skin lesions than in the other subsets, increasing CD4/CD8 ratio. Aligned to Kuhn et al¹⁷ results, in our series, CD4⁺ predominated over CD8⁺ cells in all CLE subtypes. However, Gambichler et al¹⁸ found, in their series, lower density of CD4⁺ cells in subacute group, compared with the other subtypes.

IL-10 cytokine induces B cell hyperactivity but has also an anti-inflammatory function. Lower IL-10 levels in SLE patients' serum were previously described¹⁹ In our series, IL-10 was consistently immunomarked, with variable staining intensity, stained cells density, and extent of extracellular synthesis. It is interesting that the association found between IL-10, CD4 and CD25 expression in subacute CLE illustrate the interplay between IL-10 and inflammatory/anti-inflammatory responses. The immunomarkers expression was similar by comparing CLE⁺/SLE⁺ and CLE⁺/SLE⁻ patients' specimens. However, only in subacute CLE was an association found between IL-10 and CD4⁺ and CD25⁺ expression and this was the subtype with the highest number of CLE⁺/SLE⁺ patients. So, we cannot exclude interference of systemic factors on the CLE immunomodulatory mechanisms.

We consider that the strengths of this study are as follows: the patients' age and sex were relatively uniform, in each group; the diagnoses of the CLE subtypes were established on clinical/ pathological/ direct immunofluorescence and follow-up bases; Tregs

were directly analyzed within lesion tissue: the immunologic alterations observed in the affected tissue is necessary to understand the mechanisms underlying the cutaneous disease, since it might be different from those of peripheral blood seen in patients with SLE. Among the works so far published on Tregs in CLE, this studied the largest number of patients. Even so, due to the use of strict diagnostic criteria, the small sample size for individual CLE subtypes may have restricted the variables test power and is a limitation of our work. A better statistics on higher number of patients would be beneficial to evaluate any impairment in immunomodulation in CLE subtypes.

References

1. Obermoser G, Sontheimer RD, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 2010; 19(9):1050–70.
2. Tselios K, Sarantopoulos A, Gkougkourelas I, Boura P, The influence of therapy on CD4+CD25(high)FOXP3+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus patients: a prospective study. *Scand J Rheumatol.* 2015;44(1):29-35.
3. Cava A, Regulatory cells in SLE, in: Wallace DJ, Hahn BH (eds.), *Dubois lupus erythematosus*, 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins; 2013, p. 96-103.
4. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, Peng X, Reynolds A, Sandstrom R, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell.* 2012;151(1):153–66.
5. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann Rheum Dis.* 2006;65(4):553–4.
6. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2005;175(12): 8392– 400.
7. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+ CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007;178(4): 2579–88.

8. Vargas-Rojas MI, Crispín JC, Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*. 2008;17(4):289–94.
9. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, Nasonov EL, Bykovskaia SN. Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:113–9
10. Yu C, Chang C, Zhang J. Immunologic and genetic considerations of cutaneous lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2013;41:34-45.
11. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler D. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system, *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
12. Tsokos GC, Crispín JC. T cells. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois lupus erythematosus*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2013. p.96-103.
13. Franz B, Fritzsching B, Riehl A, Oberle N, Klemke CD, Sykora J, et al. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1910–20.
14. Gambichler T, Terras S, Kampilafkos P, Kreuter A, Skrygan M. T regulatory cells and related immunoregulatory factors in polymorphic light eruption following ultraviolet A1 challenge. *Br J Dermatol*. 2013; 169(6):1288-94.
15. Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol*. 2008;35(11):1032–9.
16. Wenzel J, Uerlich M, Wörrenkämper E, Freutel S, Bieber T, Tüting T. Scarring skin lesions of discoid lupus erythematosus are characterized by high numbers of skin-homing cytotoxic lymphocytes associated with strong expression of the type I interferon-induced protein MxA. *Br J Dermatol*. 2005;153(5):1011–5.
17. Kuhn A, Sonntag M, Lehmann P, Megahed M, Vestweber D, Ruzick T. Characterization of the inflammatory infiltrate and expression of endothelial cell adhesion molecules in lupus erythematosus tumidus. *Arch. Dermatol Res*. 2002;294(1-2):6-13.

18. Gambichler T, Pätzholz J, Schmitz L, Lahner N, Kreuter A. FOXP3 + and CD39 + regulatory T cells in subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(10):1972-7.

19. Robinson ES, Werth VP. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine.* 2015;73(2):326-34.

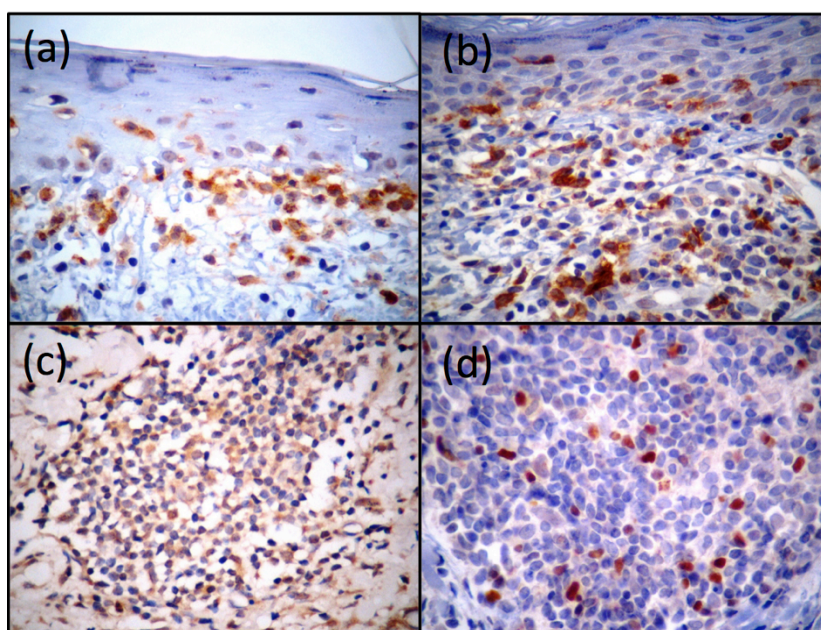
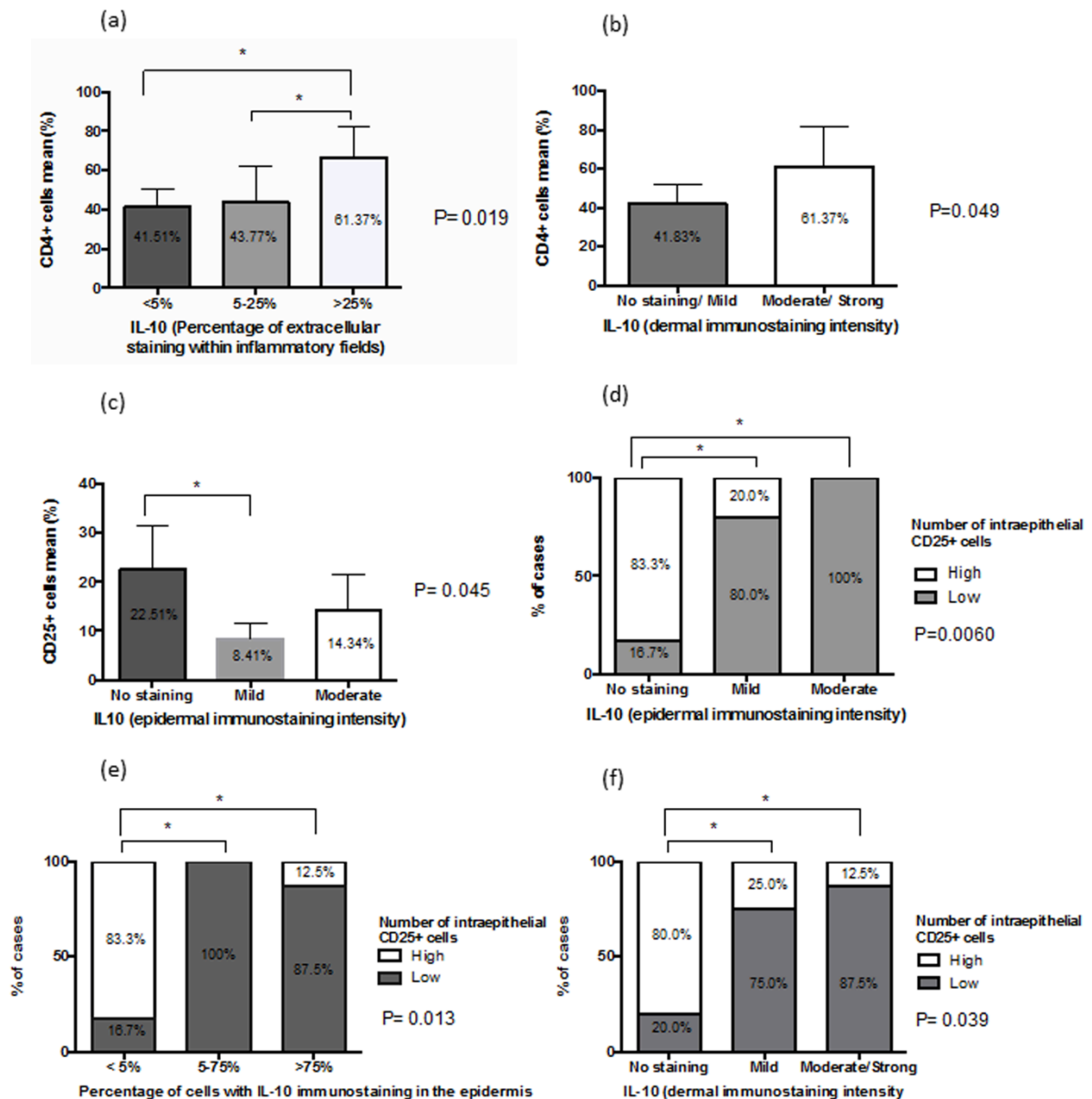


Figure - CD4 (a), CD25 (b), IL-10 (c), and Foxp3 (d) immunostaining in intra-epidermal and dermal inflammatory cells [IHC, original magnification x400; subacute CLE (a); discoid CLE (b,c); CLE tumidus (d)].



Graph: Immunoexpression of IL-10, CD4 and CD25 in subacute CLE. Percentage of IL-10 extracellular staining within inflammatory fields and its relation to the mean of CD4⁺ cells counting (a); IL-10 immunostaining intensity in dermal inflammatory cells and its relation to the mean of CD4⁺ cells counting (b); IL-10 immunostaining intensity in epidermis and the correspondent mean of dermal CD25⁺ cells counting (c) and number of CD25⁺ cells within the epidermis or adnexal structures (d); Percentage of IL-10 immunostained cells in the epidermis and its relation to the number of CD25⁺ cells within the epidermis or adnexal structures (e); IL-10 immunostaining intensity in the dermis and the correspondent number of CD25⁺ cells counting within the epidermis or adnexal structures (f) (c,d,e: high, when the

median number of immunostained cells was higher than 9 per high-power field; low, when less than 10)

Table 1. Clinical and immunohistochemical scores in cutaneous lupus erythematosus (CLE) subtypes

	Discoid CLE (n=21)	Subacute CLE (n=17)	CLE tumidus (n=21)	P-value
Age in years (Mean ± SD) (n)	42.6 ± 10.7 (n=21)	40.2 ± 11.9 (n=17)	36.0 ± 11.6 (n=21)	0.23
Gender male/female	3/18	3/14	1/20	0.48
Criteria for SLE (yes/no)	4/17	12/5*	4/17	0.0008
CD4 (Mean ± SD) (n)	48.79 ± 15.60 (n=21)	51.02 ± 18.03 (n=17)	48.69 ± 14.43 (n=8)	0.95
CD8 (Mean ± SD) (n)	25.94 ± 8.89 (n=21)	18.13 ± 4.93 (n=17)	29.55 ± 10.16 (n=21)	0.0003* <i>Discoid ≠ Subacute CLE (0.01); tumidus ≠ Subacute CLE (0.0001)</i>
CD4/CD8 (Mean ± SD) (n)	2.2 ± 1.1 (n=21)	3.0 ± 1.5 (n=17)	1.9 ± 1.1 (n=21)	0.0051* <i>tumidus ≠ Subacute CLE (0.005)</i>
CD25 (Mean ± SD) (n)	15.71 ± 8.56 (n=21)	15.92 ± 8.94 (n=16)	18.85 ± 9.45 (n=21)	0.44
Foxp3 (Mean ± SD) (n)	9.04 ± 5.79 (n=21)	9.47 ± 5.19 (n=16)	9.42 ± 7.9 (n=21)	0.83
Foxp3/CD4 (Mean ± SD) (n)	0.2 ± 0.1 (n=21)	0.2 ± 0.2 (n=16)	0.2 ± 0.2 (n=21)	0.79

IL-10 (epidermal immunostaining intensity) (n, %)				<i>0.82</i>
Mild	10 (47.6)	6 (35.3)	10 (47.6)	
Moderate	6 (28.6)	5 (29.4)	7 (33.3)	
Strong	5 (23.8)	6 (35.3)	4 (19.0)	
IL-10 (Relative area of epidermis immunostaining within its thickness) (n, %)				<i>0.84</i>
<5%	10 (47.6)	6 (35.3)	10 (47.6)	
5-75%	5 (23.8)	3 (17.6)	4 (19.0)	
>75%	6 (28.6)	8 (47.1)	7 (33.3)	
IL-10 (Intensity of cells immunostaining in the dermis) (n, %)				<i>0.65</i>
No staining	5 (23.8)	5 (29.4)	6 (28.6)	
Mild	6 (28.6)	4 (23.5)	6 (28.6)	
Moderate	8 (38.1)	3 (17.6)	7 (33.3)	
Strong	2 (9.5)	5 (29.4)	2 (9.5)	
IL-10 (Number of immunostained cells in the dermis) (n, %)				<i>0.72</i>
<5%	8 (38.1)	7 (41.2)	11 (52.4)	
5- 25%	5 (23.8)	4 (23.5)	6 (28.6)	
>25%	8 (38.1)	6 (35.3)	4 (19.0)	
IL-10 (Percentage of extracellular staining within inflammatory fields) (n,%)				<i>0.72</i>
<5%	6 (28.6)	6 (35.3)	7 (33.3)	
5- 25%	4 (19.0)	5 (29.4)	7 (33.3)	

>25%	11 (52.4)	6 (35.3)	7 (33.3)	
CD4 (epidermal and adnexal) (n, % of cases)				<i>0.43</i>
≤ 9 cells	6 (28.6)	6 (35.3)	10 (47.6)	
> 9 cells	15 (71.4)	11 (64.7)	11 (52.4)	
CD25 (epidermal and adnexal) (n, % of cases)				<i>0.50</i>
≤ 9 cells	10 (47.6)	11 (64.7)	13 (61.9)	
> 9 cells	11 (51.4)	6 (35.3)	8 (38.1)	
FOXP3 (epidermal and adnexal) n, % of cases)				<i>0.57</i>
≤ 9 cells	17 (81.0)	16 (94.1)	18 (85.7)	
> 9 cells	4 (19.0)	1 (5.9)	3 (14.3)	

4.3 Capítulo 3

Cytokines and immunoglobulin expression in cutaneous lupus erythematosus subsets

(Manuscrito preparado para publicação)

Leticia Fogagnolo¹, Elemir Macedo de Souza², Maria Heloísa de Souza Lima Blotta³, César Galusni Senna¹, Cleide Aparecida Moreira Silva⁴, Maria Leticia Cintra¹

1. Pathology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
2. Dermatology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
3. Clinical Pathology Department. School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.
4. Statistics division, Research Committee, Medical Sciences School, State University of Campinas (UNICAMP). Campinas (SP), Brazil.

Abstract

Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus (CLE) is still not completely understood. There is evidence of a complex interplay between cytokines, chemokines and adhesion molecules acting in the process of skin injury. Our aim was to characterize the participation of cytokines and immunoglobulin in different subtypes of CLE. This retrospective study enrolled 59 subjects (subacute CLE=17, discoid CLE=21, CLE tumidus=21). Twenty patients with CLE fulfilled American College of Rheumatology criteria for systemic lupus erythematosus (CLE+/SLE+) and 39 did not (CLE+/SLE-). The skin specimens were immunohistochemically targeted with the following monoclonal antibodies: IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-10, IL-6, TNF- α and ICAM-1. Compared with the other two subtypes, subacute CLE patients showed increased immunoexpression of dermal IL-1 β , IL-18 and TNF- α . The density of IL-17+ epidermal cells was higher, but dermal IL-17 immunostaining was lower in the subacute group, compared with discoid and tumidus CLE groups. This was also found in CLE+/SLE+ skin specimens, which showed lower dermal expression of IL-17 than CLE+/SLE- cases. The density of epidermal IL-1 β + cells and ICAM-1+ dermal inflammatory cells was higher in CLE+/SLE+ skin specimens compared with CLE+/SLE- cases. There was no difference between cutaneous LE groups with regard to

immunoexpression of IL-10 and IL-6. Testing for association between the cytokines expression in each studied group showed positive association between TNF- α and IL-1 β immunostaining in discoid and tumidus lesions and also between the expression of IL-10 and IL-1 β in CLE tumidus and CLE+/SLE- lesions. Although the three groups showed a similar pattern of immunoglobulin and complement deposits in the direct immunofluorescence (DIF) test, the subacute CLE group showed more statistically significant cases of C3 deposits. A positive association was also verified between IgM deposits at the basement membrane zone and dermal TNF- α + cells in CLE+/SLE+ cases. Our findings demonstrate the participation of cytokines in the pathogenesis of CLE subtypes. The subacute CLE subtype was the group with major significant data and a higher number of cases with systemic disease; tumidus lesions showed similar results to discoid lesions. The differences found between CLE patients who also have systemic disease compared with those with pure cutaneous disease suggest the influence of systemic factors in a skin inflammatory environment.

Introduction

Lupus erythematosus (LE) is an autoimmune disease that results from genetic and environmental interactions. Clinical variability ranges from mere skin involvement to potentially fatal systemic disease.¹ Cutaneous lesions are spectral and divided into “LE-specific” and “LE-nonspecific.” “LE-nonspecific” lesions are usually related, but not exclusive, to systemic LE (SLE) (e.g. urticarial vasculitis and mucosal ulcers). LE-specific or cutaneous LE (CLE) subsumes a group of well-defined disease subsets. CLE lesions are classified as acute-, subacute- and chronic. CLE tumidus, first considered to be a subtype of chronic CLE, has been classified as a distinct type of CLE, based on its unique clinical-pathological profile.^{2,3,4}

Among the clinical features that distinguish subtypes of CLE is the way the lesions evolve: discoid LE, the most common subtype of chronic CLE,³ heals with atrophy and scarring,^{2,5} while subacute- and CLE tumidus do not.^{1,2,6}

Besides the known clinical differences, histopathology also distinguishes tumidus, subacute, and discoid lesions. CLE tumidus shows superficial and deep dermal perivascular and periadnexal lymphocyte infiltrates, and usually exuberant deposits of interstitial mucin. As a rule, the epidermis and the basement membrane zone (BMZ) are spared. On the other hand, in discoid CLE, the epidermis presents thinning of the stratum Malpighi, hydropic degeneration of basal cells, dyskeratosis, and thickening of the BMZ, besides less prominent mucin deposits. With regard to subacute CLE, dermoepidermal interface involvement

predominates. However, hyperkeratosis and inflammatory infiltrate are less prominent and the edema of upper dermis is greater than in discoid lesions. The result of direct immunofluorescence (DIF) testing on lesional skin of CLE also differs: normally, in CLE tumidus the test result is negative, while discoid CLE and subacute CLE lesions show deposits of immunoglobulin and complement along the BMZ.^{2,5}

The pathogenesis of CLE is a result of a complex interplay between genetic predisposition and hormonal and environment stimuli (such as UV radiation or infection) acting under a loss of tolerance towards self-antigens by innate and adaptive immune systems. This multifactorial nature of the disease is not completely understood, but involves keratinocyte apoptosis, activation of T and dendritic cells, cytokine and chemokine release, and synthesis of autoantibodies by B cells.^{7,8} Further studies could help to develop target-oriented therapeutic strategies for susceptible and affected patients.

This study aimed to compare cytokine profiles in CLE subtypes and investigate the role of systemic factors and local inflammatory environments as a basis for the clinical/histopathological differences seen between these subsets.

Material and Methods

The institutional ethics committee approved the study methodology, which is in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Since this was a retrospective study that used skin samples routinely stored at the hospital, informed consent was not needed. No data was used that could identify the patients.

Paraffin wax-embedded specimens collected from skin biopsies of patients with CLE treated at the State University of Campinas Hospital, Brazil, were retrieved from archives at the Department of Pathology, State University of Campinas, Brazil; the corresponding clinical and direct DIF data were obtained from the patient medical charts. 202 patients with lupus erythematosus were potentially eligible for the study and 114 had their skin specimens examined. Fifty-nine patients with CLE (discoid CLE=21, subacute CLE=17, CLE tumidus=21) were eligible for this study. Inclusion criteria were as follows: 1) medical files with complete clinical and laboratorial data and follow up were required; 2) discoid and subacute CLE skin paraffin embedded specimens were obtained from the same place where the DIF biopsies had been taken (Since DIF results are often negative in CLE tumidus, this test was not an inclusion criterion for this group); 3) H&E samples were blindly analyzed to support the diagnosis defined by clinical criteria; only patients with unquestionable diagnosis

of CLE through published criteria³ were included in the study; 4) only specimens with sufficient paraffin embedded material for further cuts, adequate technical conditions or presenting histological features that reflected the typical CLE subset established on clinical grounds and follow up were included. The results of the DIF analysis were based on data collected from the patients' medical charts and were recorded as granular or linear patterns and positive or negative deposits of IgA, IgM, IgG, C3 and C1q at the ZMB.

Immunohistochemical analysis

The stored skin specimens were freshly cut and immunohistochemically targeted with the following monoclonal antibodies (Table 1): ICAM-1, IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-10, IL-6, TNF- α . Visualization of the antigen-antibody complex was achieved using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate (Sigma, St Louis, Missouri, USA). Sections were counter-stained with Mayer hematoxylin. Lymph node, cecal appendix and tonsil sections stained with antibodies of the same biomarkers were used as a positive control while the omission of the primary antibody provided a negative control. The same technician performed all procedures. Sections with folds, rupture, strong background staining or weak target antigen staining were excluded and the procedures were repeated. A single observer performed blind quantification of the cytokines and ICAM-1. Ten randomly selected images of the dermal inflammatory infiltrate expressing ICAM-1 in each section were captured under a light microscope (x400 magnification) and analyzed using Image J software® (Wayne Rasband; NIH, Bethesda, MD, USA). The ratio of the number of immunostained cells to the total number of cells per image was calculated, and the average values of this ratio were recorded. Cytokine immunohistochemical specimens were also independently analyzed under a light microscope at x400 magnification, according to the method used by Popovic et al.,⁹ with the following modifications. Since this is a retrospective study with varied technical processing, in order to remove the bias of background and staining intensity variations, in each section, the skin component presenting higher stain intensity received a value of "3." For each biopsy specimen, the analysis of the several immunomarkers studied was always performed in the same three representative fields.

1. The epidermis was examined for staining intensity (classified as mild, moderate or strong) and for relative area of cytoplasmic immunostaining within its thickness (<5 = 0%; 1 = 5-25%, 2 = 26-75%, > 75% = 3).

2. The dermal infiltrate was analyzed for staining intensity (classified as mild, moderate or strong), percentage of immunostained cells (0 = <5%; 1 = 5-25%, 2 = 26-75%, >

75% = 3) and percentage of extracellular stained space within inflammatory fields (0 = <5%; 1 = 5-25%, 2 = 26-75%, > 75% = 3).

Statistical analysis was performed using Fisher's exact test or Chi-square to verify association between qualitative values. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to evaluate possible association between quantitative values. Missing data were addressed as an empty value and were excluded from analysis. P-values < 0.05 were considered significant. It was not possible to test differences between patients with and without systemic lupus erythematosus inside each group of CLE because the study size did not allow multiple regression analysis; however, it was possible to additionally test differences between patients with any subtype of CLE and systemic disease and patients that did not have systemic lupus erythematosus.

Results

Tables 2 and 3 display patients' clinical data and significant cytokines immunostaining results. The three groups were similar in relation to age and sex. Of the 59 patients, 20 patients with CLE fulfilled the American College of Rheumatology criteria for classification of systemic lupus erythematosus (CLE+/SLE+) and 39 did not (CLE+/SLE-). 70.58% of subacute CLE patients were SLE+ and specimens of subacute CLE patients presented the highest number of significant results.

Most cases of discoid CLE, subacute CLE and CLE tumidus had strong intensity of IL-1 β immunolabelling in the epidermis; at least 25% of the epidermis and dermal inflammatory cells were immunostained for IL-1 β (Fig1A). The subacute CLE group presented a higher percentage of IL-1 β + cells in the dermal inflammatory infiltrate than the other two groups (P=0.036) and also a higher number of epidermal cells immunostaining for IL-1 β , but without significant difference. However, CLE+/SLE+ patients showed a significantly higher number of epidermal cells than immunoexpressed IL-1 β , when compared with CLE+/SLE- patients (P=0.024).

TNF- α immunostaining was found in the three subtypes of CLE, but the percentage of extracellular stained space within inflammatory fields was higher in the dermal interstitium of subacute CLE patients, with the lowest percentage being found in the tumidus group (P = 0.012) (Fig1B). Subacute CLE specimens also showed higher IL-17 expression in epidermal cells (P= 0.043) and lower expression in the dermal interstitial space (P=0.0092), compared with discoid and tumidus subtypes (Fig1C). The same occurred in the dermal interstitium of CLE+/SLE+ cases, compared with CLE+/SLE- (P=0.0003). The weakest

intensity of IL-17 immunolabeling in the epidermis was found in the discoid group ($P=0.0041$). IL-18 immunostaining was evaluated only in dermal inflammatory cells because of weak expression at the other sites of the skin. The density of IL-18+ cells was higher in the subacute group than in the other two groups ($P=0.0014$).

There was no difference between subacute, discoid and CLE tumidus values with regard to immunoexpression of IL-6 and IL-10. Evaluation of IL-6 was only possible in sweat glands and dermal inflammatory cells, because of lack of immunostaining on the epidermis and dermal interstitium. However, the three CLE subtypes showed IL-6 immunostaining in at least 25% of the dermal cells and the extracellular space of the inflammatory dermis. IL-10 was immunoexpressed in all skin samples, but staining intensity varied from weak to strong in both the dermis and epidermis; the density of dermal IL-10+ cells and the immunolabeling at the interstitium also had a large variation in the three subtypes.

The density of ICAM-1+ cells in the dermis was similar in the three CLE subtypes, but CLE+/SLE+ cases had a higher number of these cells than CLE+/SLE- skin specimens ($P=0.0095$) (Fig.1D).

Graph 1 depicts the interrelation between the staining results of studied cytokines. We found some IL-1 β and TNF- α expression particularities in all groups. In the discoid subtype, specimens with mild IL-1 β staining intensity in the dermis interstitium also had lower density of TNF- α + inflammatory cells ($P=0.0022$). In the epidermis of the CLE tumidus group, the higher the density of IL-1 β + cells, the higher the epidermal staining intensity of TNF- α ($P=0.030$). In the tumidus group, the higher the IL-1 β immunostained extracellular area, the higher the IL-10 ($P=0.021$). Interestingly, skin of CLE+/SLE- patients with a higher number of epidermal or dermal cells staining for IL-1 β also had stronger expression of IL-10 on the epidermis ($P=0.043$), higher number of cells staining for IL-10 dermal infiltrate ($P=0.025$) and stronger dermal staining of this cytokine ($P=0.0086$). Subacute CLE cases with stronger staining intensity of IL-17 in the epidermis and dermis also had stronger immunostaining of IL-1 β in the dermis ($P=0.022$ and $P=0.028$, respectively).

DIF findings were similar in discoid, subacute and tumidus subtypes. All cases showed granular deposits of immunoglobulin and complements at the BMZ, mostly IgG, followed by IgM, C3, IgA and C1q, in this order. (Table 4) However, C3 deposits were more frequently found within the subacute group ($P=0.015$). No significant relationship was found between DIF findings and CLE+/SLE+ or CLE+/SLE- patients.

Few remarkable associations were found between DIF findings and interleukin

expression in CLE subtypes. As shown in Graph 2, deposits of IgM in the CLE+/SLE+ group were associated with higher density of TNF- α cells in the dermis (P=0.017). Also, deposits of IgA were associated with stronger staining intensity of TNF- α on the epidermis (P=0.020) and dermis (P=0.0054). Conversely, CLE+/SLE- cases expressing C3 at the BMZ had a higher percentage of extracellular stained space within inflammatory fields for TNF- α (P=0.0055) and mild immunolabeling in the epidermis (P=0.016).

Discussion

Lesions of CLE typically arise on sun-exposed sites, but they differ in morphology. Annular erythematous lesions or scaly plaques that resolve without scarring are typical of subacute CLE. The atrophic or hyperkeratotic erythematous plaques with follicular plugging that heal with scarring and hyperpigmentation are characteristic of discoid CLE. The CLE tumidus can sometimes be misdiagnosed as an early lesion of discoid or subacute CLE, but its erythematous plaques have a particular infiltration with a “succulent” appearance. On H&E sections, CLE tumidus shows a lymphocytic infiltrate in superficial and deep dermis that is surrounded by mucin, sparing the epidermis. This differs from skin specimens of discoid CLE, which usually present follicular plugging and liquefactive degeneration of the BMZ, besides the chronic dermal inflammatory infiltrate of lymphocytes and histiocytes. Subacute CLE may present similar histopathological features of discoid CLE, but hair follicles are usually spared and the mononuclear infiltrate is milder and more superficial.² In addition, subacute CLE is more frequently associated with SLE than discoid and tumidus subtypes.^{2,4,6} The exact mechanisms that produce their distinct clinical and histopathological features are still unknown. Many reports have highlighted the relevance of cytokines in the pathogenesis of LE. The profiles of cytokines synthesized in the inflammatory environment of the various subtypes of CLE may be different, depending on their association with SLE. The results of this present study showed some differences between the CLE subtypes and the possible role of systemic factors in the cytokines expression.

Ultraviolet (UV) light is a well-known trigger of SLE and CLE, inducing keratinocyte apoptosis and a proinflammatory environment, with synthesis of IFN, TNF- α , TGF- β , IL-1 α / β , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-17. Notably, IL-1 and TNF- α act synergistically and are capable of triggering the expression of adhesion molecules and other inflammatory cytokines and chemokines, recruitment of leucocytes and consequent tissue inflammation and injury.^{7,8,10-12} TNF- α is involved in B cell activation and also increases the expression of nuclear antigens on keratinocytes, with possible inflammatory and immunomodulatory roles

in CLE.⁷

There are only a few studies about cytokines in CLE, with most of the current knowledge coming from the study of the systemic form.^{9, 13-17} In our study, immunoexpression of IL-1 β , TNF- α , IL-17 and IL-18 was higher in the subacute- than discoid- and CLE tumidus lesions. Zampieri et al.¹⁷ found increased levels of TNF- α in subacute CLE lesions compared to normal skin. Previous studies have demonstrated that UV irradiation increases expression of IL-1 β and TNF- α in keratinocytes.^{7,18,19} Higher IL-1 β serum levels in patients with SLE were found that correlated with SLE disease activity.²⁰ We also found a significant increase of dermal IL-1 β and TNF- α expression in subacute CLE patients. IL-1 β immunoexpression was significantly higher in the keratinocytes in CLE+/SLE+ patients than in CLE+/SLE-. In the present study, most patients with subacute CLE also had SLE, which may have influenced the results. Conversely, in skin specimens of CLE tumidus and discoid CLE patients, the higher the expression of TNF- α , the higher the IL-1 β . These findings demonstrate that these cytokines participate in all CLE subtypes pathogenesis both in the epidermis and dermis.

IL-17 expression in subacute CLE and CLE+/SLE+ patients was similar, both presenting lower staining in interstitial dermis, when compared, respectively, with discoid/tumidus and CLE+/SLE- groups. Conversely, IL-17 expression was higher in the epidermal cells of subacute CLE as compared with discoid and tumidus CLE cases. IL-17 is a pleiotropic cytokine, mainly produced by Th17 cells to enhance the synthesis of proinflammatory molecules.²¹ Its involvement in the pathogenesis of CLE is controversial. Some study results demonstrated increased IL-17 synthesis in lesional subacute and discoid CLE skin,¹⁴ but another work, studying discoid lesions, did not.²² This is the first study showing IL-17 expression in the CLE tumidus subset, and the result was similar to what was found in the discoid group.

Our results revealed the participation of IL-18 in CLE pathogenesis, with evidence of higher immunoexpression in the dermis of subacute CLE specimens. IL-18 is a member of the IL-1 superfamily and helps immune cells to migrate into tissue. There is evidence that serum levels of IL-18 correlate with SLE disease activity.⁷ Wang D et al.²³ found high expression of the IL-18 receptor in keratinocytes in subacute and discoid CLE patients. In this study we also found the participation of IL-6 and IL-10, which are cytokines capable of inducing B cell hyperactivity. IL-10 is also an anti-inflammatory cytokine, important as a negative feedback factor in immunoregulatory responses. Previous publications

have shown increased IL-6 and IL-10 levels in SLE patients' serum, and also keratinocyte-induced IL-6 synthesis eliciting SLE in a murin model.^{7,8} Serum immunocomplexes in SLE patients were demonstrated to induce IL-10 synthesis.²⁴ We also found strong expression of ICAM-1 in all CLE subsets, higher in CLE+/SLE+, compared with CLE+/SLE- patients. This might reflect the potential role of systemic factors on CLE affected skin. Finally, significant associations observed between immunoglobulin/complement deposits at the BMZ and cytokines expression emphasize the multiple pathways and complex mechanisms that compose the pathogenesis of CLE.

Considering the results of this present study, the group showing major particularities was subacute CLE, which was most commonly associated with SLE. Accordingly, besides the importance of local cytokine synthesis in the pathogenesis of CLE, the influence of systemic factors in its development must be emphasized. Additionally, tumidus CLE is a subtype that is still poorly studied. We demonstrated that cytokine expression in this subtype did not differ significantly from discoid lesions. The inclusion criteria set out for this study was rigorous, decreasing our series. Further research with a greater number of cases might aid in understanding the role of interleukins in the clinical and histopathological manifestations of each CLE subtype and in characterizing the influence of systemic factors in CLE pathogenesis.

References

1. Wenzel J, Zahn S, Tüting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets *J. Lupus*. 2010; 19(9):1020-8.
2. Obermoser G, Sontheimer RD, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 2010; 19(9):1050-70
3. Kuhn A, Ruzicka T. Classification of cutaneous lupus erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, and Ruzicka T eds. *Cutaneous Lupus Erythematosus*, 1st ed. 2004, pp. 53–58. Heidelberg, Springer.
4. Kuhn A, Sticherling M, Bonsmann G. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5(12):1124-37.
5. Crowson AN, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol*. 2001; 28(1):1-23
6. Stead J, Headley C, Ioffreda M, Kovarik C, Werth V. Coexistence of tumid lupus erythematosus with systemic lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus: a

- report of two cases of tumid lupus. *J Clin Rheumatol* 2008;14:338–41
7. Robinson ES, Werth VP. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine*. 2015;73(2):326-33
 8. Kirchhof MG, Dutz JP. The immunopathology of cutaneous lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014;40(3):455-74
 9. Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3639-45.
 10. Avalos-Diaz E, Alvarado-Flores E, Herrera-Esparza R. UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Rev Rheum Engl Ed*. 1999;66(1):13–9.
 11. Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1b, IL-10, IL-10r, TNF alpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm Res*. 2000;49(6):290–6.
 12. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, Muller A, Lauceviciute I, Rieker J, et al. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: an amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1504-16.
 13. Gambichler T, Genc Z, Skrygan M, Scola N, Tigges C, Terras S, et al. Cytokine and chemokine ligand expression in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Dermatol* 2012; 22(3): 319-23
 14. Tanasescu C, Balanescu E, Balanescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern Med* 2010; 21(3):202–7.
 15. Marques ERMC, Lourenço SV, Lima DM, Nico MMS. Oral lesions in lupus erythematosus-cytokines profiles of inflammatory infiltrate. *J Cutan Pathol*. 2010;37(4):439–5.
 16. Maczynska I, Millo B, Ratajczak-Stefańska V, Maleszka R, Szych Z, Kurpisz M, et al. Proinflammatory cytokine (IL-1b, IL-6, IL-12, IL-18 and TNF-alpha) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). *Immunol Lett*. 2006 102(1):79–82.
 17. Zampieri S, Alaibac M, Iaccarino L, Rondinone R, Ghirardello a, Sarzi-Puttini P, et al. Tumour necrosis factor alpha is expressed in refractory skin lesions from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65(4):545–8.

18. Carneiro JRM, Fuzii HT, Kayser C, Alberto FL, Soares FA, Sato EI, et al. IL-2, IL-5, TNF- α and IFN- γ mRNA expression in epidermal keratinocytes of systemic lupus erythematosus skin lesions. *Clinics* 2011; 66(1):77–82.
19. Yu C, Chang C, Zhang J. Immunologic and genetic considerations of cutaneous lupus erythematosus: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2013;41:34-45
20. McCarthy EM, Smith S, Lee RZ, Cunnane G, Doran MF, Donnelly S, et al. The association of cytokines with disease activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology.* 2014;53(9):1586-94
21. Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal.* 2011;23(7):1069-75.
22. Jabbari A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gonzalez J, Cueto I, Franks AG Jr, et al. Dominant Th1 and minimal Th17 skewing in discoid lupus revealed by transcriptomic comparison with psoriasis. *J Invest Dermatol* 2014;134(1):87–95
23. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B, Werfel T, Wittmann M. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):3205–15.
24. Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyper- activity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1995;181(3):839–44.

Table 1. Immunohistochemical technique: antibodies and staining results

Primary Antibody	Clone	Dilution	Buffer antigen retrieval protocol (Steamer was used)	Detection System
ICAM-1	G5, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA	1:8000	Citrate, pH 6.0	Novolink kit. Novocastra Laboratories
IL-1 β	H-153; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA	1:40	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP. Dako Cytomation
IL-17	H-132; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	Novolink kit. Novocastra Laboratories
IL-18	N-19; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA	1:40	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP. Dako Cytomation
IL-10	AF-217-NA; R&D Systems, Minneapolis, USA	1:50	Tris-EDTA, pH 9.0	LSAB-HRP. Dako Cytomation
IL-6	MQ2-13A5; Biolegend, San Diego, USA	1:500	Citrate, pH 6.0	Novolink kit. Novocastra Laboratories
TNF- α	AF-210-NA; R&D Systems, Minneapolis, USA	1:50	Citrate, pH 6.0	LSAB-HRP. Dako Cytomation

Table 2. Patient's clinical data and relevant cytokines immunostaining results. [IL-1 β (dermal cells): percentage of dermal inflammatory cells immunostained for IL-1 β ; TNF- α (dermal interstitium): percentage of the extracellular space within inflammatory fields immunostained for TNF- α ; IL-17 (epidermal staining intensity): immunostaining of IL-17 in the epidermis; IL-17 (epidermal cells): percentage of epidermal cells immunostained for IL-17; IL-18 (dermal cells): percentage of dermal inflammatory cells immunostained for IL-18]

	LED	LESA	LET	P-
	(n=21)	(n=17)	(n=21)	value
Age in years, median (range)	42 (25-65)	40 (18-62)	36 (17-54)	0.23
Gender male/female	3/18	3/14	1/20	0.48
Criteria for SLE (yes/no)	4/17	12/5*	4/17	0.0008
IL-1β (dermal cells) (n, %)				0.036
5-75%	11 (52.4)	5 (29.4)	15 (71.4)	
>75%	10 (47.6)	12 (70.6)*	6 (28.6)	
TNF-α (dermal interstitium) (n, %)				0.012
<5%	1 (4.8)	0 (0.0)	7 (33.3)*	
5-25%	13 (61.9)	7 (41.2)	6 (28.6)	
>25%	7 (33.3)	10 (58.8)	8 (38.1)	
IL-17 (epidermal staining intensity)				0.0041
Mild	13(61.9)	2 (11.8)	6 (28.6)	
Moderate or strong	8 (38.1)	15 (88.2)	15 (71.4)	
IL-17 (epidermal cells) (n, %)				0.043
<5%	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
5- 25%	4 (19.0)	0 (0.0)	1 (4.8)	
26-75%	5 (23.8)	1 (5.9)	7 (33.3)	
>75%	12 (57.1)	16 (94.1)*	13 (61.9)	
IL-17 (dermal interstitium) (n, %)				0.0092
<5%	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
5-25%	7 (33.3)	14 (82.4)*	10 (47.6)	
>25%	14 (66.7)	3 (17.6)	11 (52.4)	

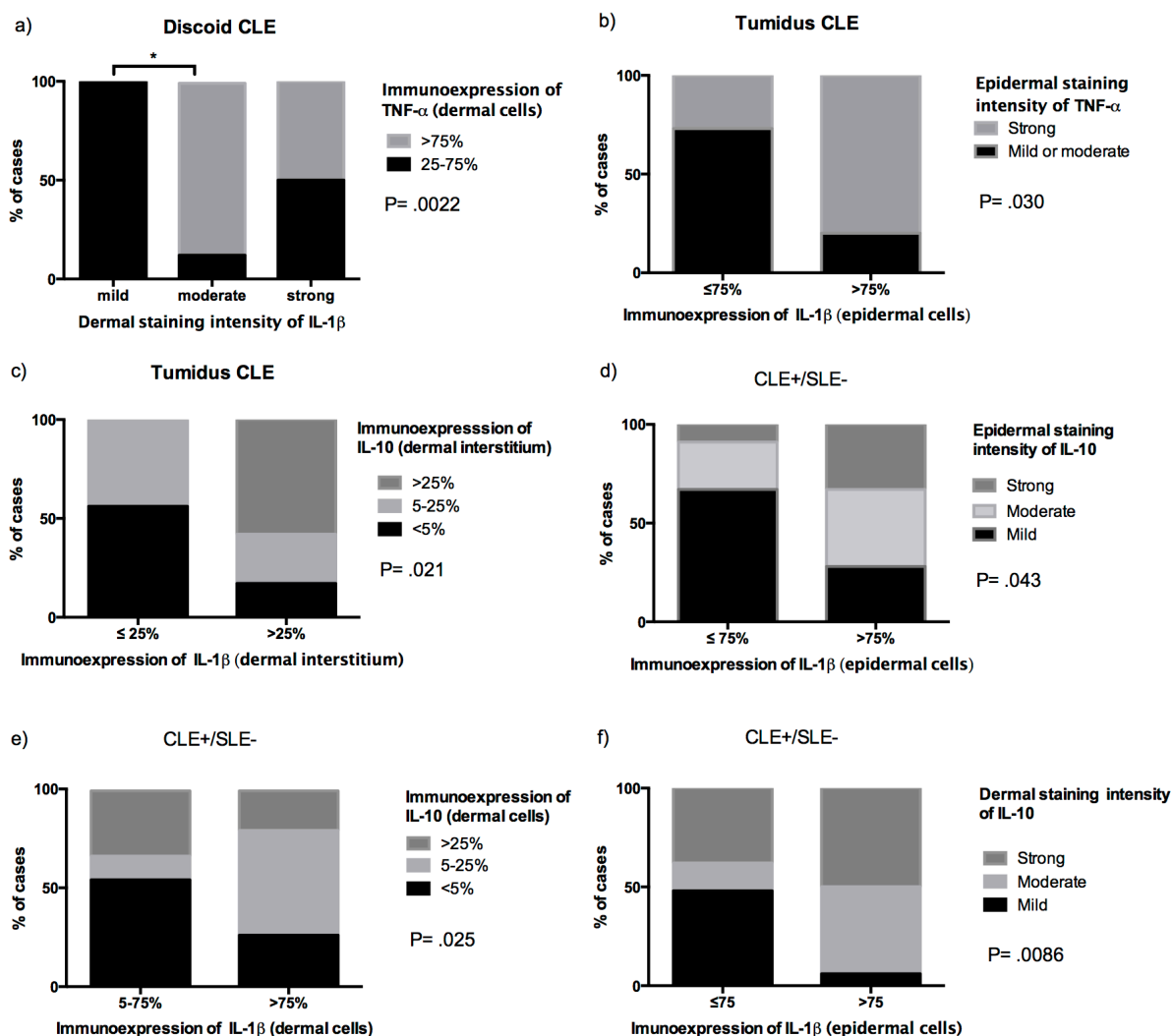
IL-18 (dermal cells) (n, %)				<i>0.0014</i>
< 5%	13 (65.0)	3 (18.8)	16 (76.2)	
5- 25%	7 (35.0)	13 (81.3)*	5 (23.8)	
>25%	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

Table 3. Comparison of relevant variables between patients with and without systemic lupus erythematosus. [CLE+/ SLE+: Cutaneous lupus erythematosus and coexistent systemic lupus erythematosus; CLE+/ SLE-: Cutaneous lupus erythematosus without systemic lupus erythematosus; IL-1 β (epidermal cells): percentage of epidermal cells immunostained for IL-1 β ; IL-17 (dermal interstitium): percentage of the extracellular space within inflammatory fields immunostained for IL-17]

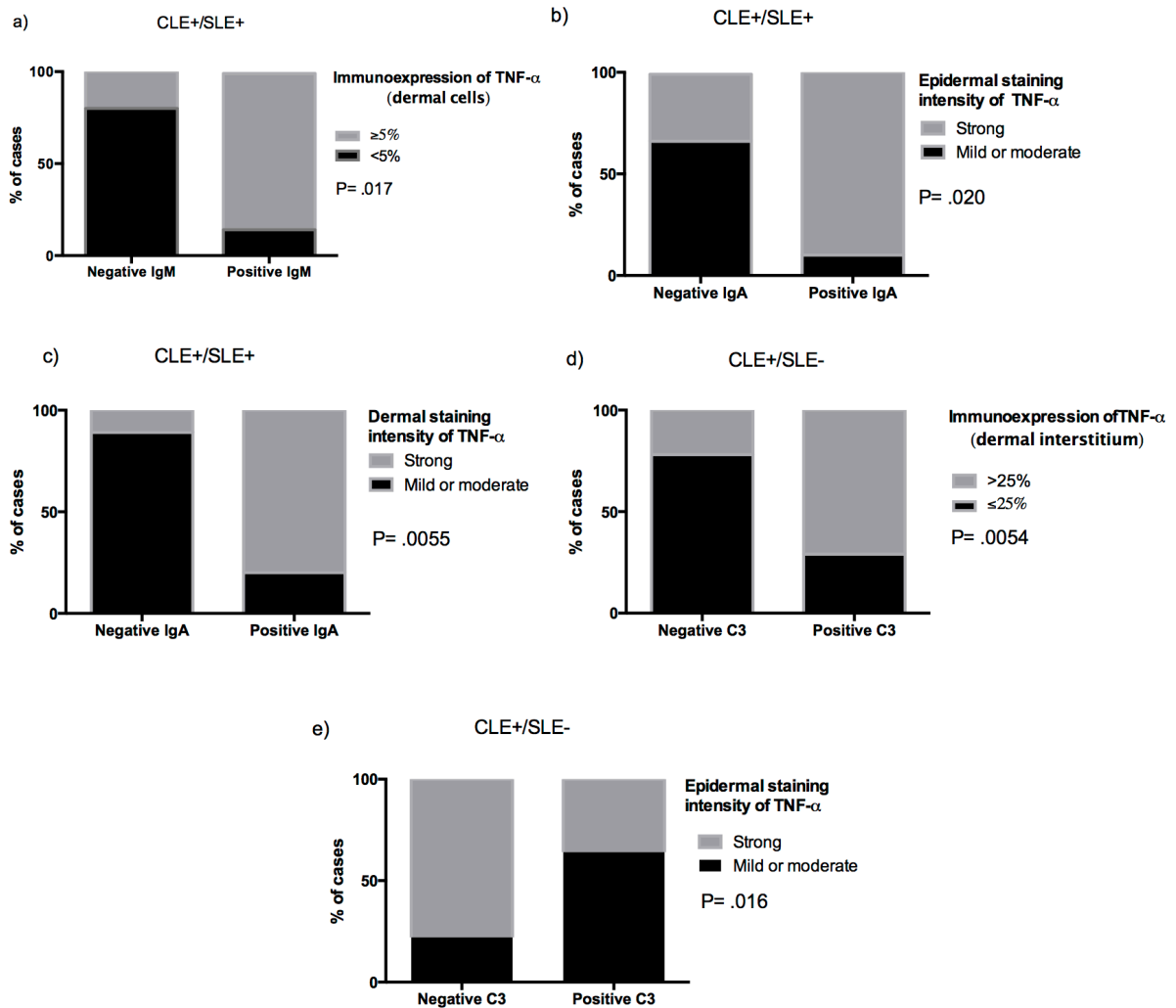
	CLE+/ SLE+ (n=20)	CLE+/ SLE- (n=39)	<i>P-value</i>
ICAM-1 mean (%) \pm SD (n)	47.5 \pm 6.7 (20)	41.8 \pm 7.7 (39)	<i>0.0095</i>
IL-1 (epidermal cells) (n, %)			<i>0.024</i>
<5%	0 (0.0)	0 (0.0)	
5- 25%	2 (10.0)	5 (12.8)	
26-75%	2 (10.0)	16 (41.0)	
>75%	16 (80.0)	18 (46.2)	
IL-17 (dermal interstitium) (n, %)			<i>0.0003</i>
<5%	0 (0.0)	0 (0.0)	
5-25%	17 (85.0)	14 (35.9)*	
26-75%	3 (15.0)	25 (64.1)	
>75%	0 (0.0)	0 (0.0)	

Table 4. Immunoglobulin and C3/C1q pattern of deposits between cases with positive results of direct immunofluorescence test

Direct Immunofluorescence (n, % of positive cases)	Discoid CLE (n=21)	Subacute CLE (n=17)	Tumidus CLE (n=13)	<i>P-value</i>
IgG	18 (85.7)	15 (88.2)	7 (53.8)	<i>0.064</i>
IgM	12 (57.1)	13 (76.5)	6 (46.2)	<i>0.22</i>
C3	11 (52.4)	13 (76.5)	3 (23.1)	<i>0.015</i>
IgA	10 (47.6)	8 (47.1)	3 (23.1)	<i>0.31</i>
C1q	9 (42.9)	9 (52.9)	3 (23.1)	<i>0.25</i>



Graph 1. Association between cytokine expression in CLE skin specimens. [CLE+/SLE+: Cutaneous lupus erythematosus and coexistent systemic lupus erythematosus; CLE+/SLE-: Cutaneous lupus erythematosus without systemic lupus erythematosus; a) Immunoexpression of TNF- α (dermal cells)=percentage of dermal inflammatory cells stained for TNF- α ; b) Immunoexpression of IL-1 β (epidermal cells)=percentage of epidermal cells stained for IL-1 β ; c) Immunoexpression of IL-10 (dermal interstitium)=percentage of extracellular stained space within inflammatory fields; Immunoexpression of IL-1 β (dermal interstitium)=percentage of extracellular stained space within inflammatory fields stained for IL-1 β ; d) Immunoexpression of IL-1 β (epidermal cells)=percentage of immunostained cells for IL-1 β in the epidermis; e) Immunoexpression of IL-10 (dermal cells)=percentage of dermal inflammatory cells stained for IL-10; Immunoexpression of IL-1 β (dermal cells)=percentage of dermal inflammatory cells stained for IL-1 β ; f) Immunoexpression of IL-1 β (epidermal cells)=percentage of stained epidermal cells for IL1 β



Graph 2. Association between immunoglobulin and complement at the epidermis basement membrane zone and TNF- α immunoexpression. [CLE+/ SLE+: Cutaneous lupus erythematosus and coexistent systemic lupus erythematosus; CLE+/SLE-: Cutaneous lupus erythematosus without systemic lupus erythematosus a) immunoexpression of TNF- α : (dermal cells): percentage of TNF- α stained inflammatory cells, and d) immunoexpression of TNF- α (dermal interstitium): percentage of TNF- α stained extracellular space within inflammatory fields.

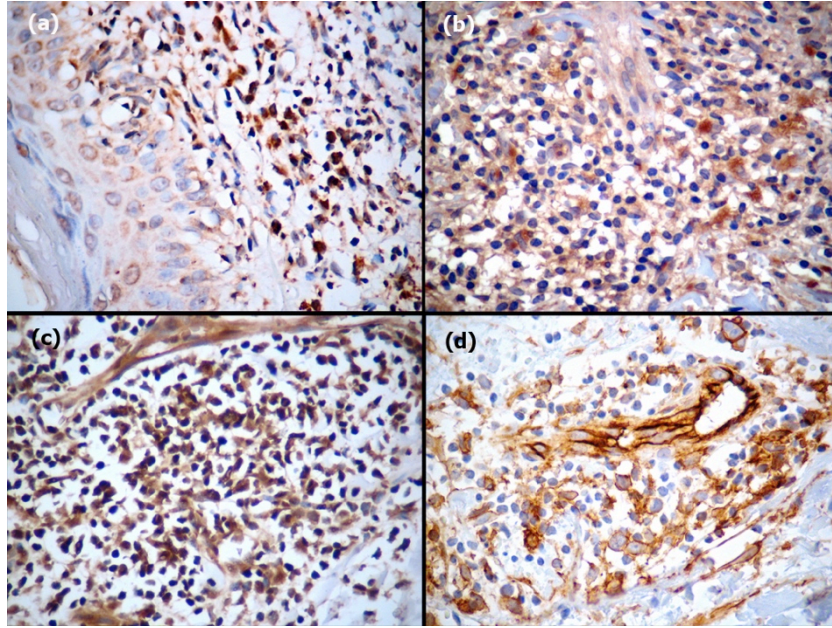


Figure 1. Immunohistochemical staining for a) IL-1 β ; b) TNF- α ; c) IL-17; d) ICAM-1 [IHC, original magnification $\times 400$; discoid CLE/SLE+ (a); subacute CLE/SLE- (b, d); subacute CLE/SLE+ (c)].

5. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados encontrados traçam um panorama da resposta imune na pele acometida por LEC discoide, subagudo e tímido. É interessante mencionar que este estudo acrescenta novas informações a respeito da apoptose nos subtipos de LEC. O fenômeno apoptótico já foi demonstrado na patogênese das dermatites liquenoides, especialmente líquen plano e doença enxerto versus hospedeiro.⁸⁴⁻⁶ Nos subtipos discoide e subagudo, que cursam com dermatite de interface dermoepidérmica, este evento parece ser um fator importante na patogênese da doença.⁶² Entretanto, não havia até então estudos prévios sobre a citotoxicidade mediada por grânulos em lesões de LEC tímido, que não apresenta alterações na interface dérmico-epidérmica. O presente trabalho demonstrou a presença dos quatro grânulos nas amostras deste subtipo, além da correlação positiva entre a expressão dos grânulos e a expressão de CD8, o que pode significar que os grânulos citotóxicos podem assumir outras funções além do dano apoptótico direto, como manutenção da inflamação. Por ter um curso intermitente e benigno, além apresentar histopatologia distinta dos outros subtipos, o LEC tímido tem sido recentemente classificado como um subtipo único, independente do LEC crônico.⁴ A justificativa para a perda do interesse pela epiderme, a grande quantidade de mucina dérmica nas lesões túmidas e o infiltrado inflamatório dérmico em toda sua extensão, além da imunofluorescência frequentemente negativa, permanece um desafio ainda não elucidado. O subtipo tímido, neste estudo, mostrou expressão dos biomarcadores de certa forma semelhante ao LEC discoide, uma vez que não foi encontrada diferença estatística entre os dois grupos. O LEC tímido é de ocorrência incomum e ainda é uma entidade pouco estudada, em que não há dados sobre a sua real incidência.⁸⁷ Embora a literatura não associe este subtipo de LEC a manifestações sistêmicas,^{1,3,5,8,9}, o presente estudo apresentava quatro pacientes de LEC tímido com diagnóstico de LE sistêmico, de acordo com os critérios da *American College of Rheumatology*. Este estudo foi realizado em hospital terciário, de modo que a maior frequência de pacientes com doenças de alta complexidade na instituição pode ter sido um viés em atrair pacientes com lesões túmidas e que também apresentavam doença sistêmica. Entretanto, é provável que o LEC tímido seja mais frequente do que o que se conhece, uma vez que seu curso é benigno e muitos não devem procurar auxílio médico. De toda forma, é interessante ilustrar a riqueza de sinais e sintomas que podem estar vistos em um paciente de LE sistêmico, de modo que dermatologistas e patologistas devem ter em mente toda a diversidade de diagnósticos possíveis nesta doença.

Também é importante mencionar que as células CD56⁺ foram menos frequentes do que as células CD8⁺ e CD4⁺ nos 3 subtipos de LEC estudados, sugerindo que o fenômeno citotóxico mediado por linfócitos é orquestrado mais por linfócitos T CD8⁺ do que pelas células NK, que normalmente são CD56⁺.

O grupo de LEC subagudo foi o que apresentou o maior conjunto de alterações na expressão dos biomarcadores nas amostras cutâneas. É interessante que, embora o infiltrado inflamatório neste subtipo seja menos denso, apesar de cursar com a dermatite de interface que é característica deste subtipo e também apresente menor quantidade de depósitos de mucina dérmicos do que em pacientes de LEC túmido,^{1,16,22} neste grupo foi onde ocorreu a maior expressão das citocinas inflamatórias. A expressão de IL-1 β e TNF- α foram mais intensas no infiltrado inflamatório dérmico de pacientes com LEC subagudo do que nos demais subtipos. De fato, Zampieri et al⁶⁷ encontraram maior expressão de TNF- α em lesões subagudas do que na pele normal e é sabido que estes dois marcadores agem de forma sinérgica.⁴⁶ Deve-se ressaltar também que, antes do nosso estudo, não havia análise comparativa, na literatura, da expressão de IL-1 β nos subtipos de LEC. É interessante que, embora IL-1 β e TNF- α estivessem mais expressos nas amostras de LEC subagudo, apenas nos subtipos discoide e túmido foi encontrada associação positiva entre estes dois marcadores.

A maior expressão de IL-17 nas células da epiderme de pacientes do grupo subagudo e menor no interstício que os outros subtipos também inicia o entendimento da participação do padrão Th17 na patogênese do LEC. 94,1% dos pacientes com LEC subagudo tiveram mais de 75% de expressão nas células epidérmicas e todos os pacientes apresentaram imunomarcagem no infiltrado inflamatório, porém 82,4% dos pacientes tiveram menos de 25% de expressão no interstício, enquanto mais de 50% dos pacientes de LEC subagudo e túmido tiveram mais de 25% de expressão. Existem evidências da sua participação na patogênese das lesões cutâneas, demonstradas por estudos prévios que observaram expressão maior deste marcador no infiltrado inflamatório dérmico de pacientes com lesões discoides e subagudas, comparadas com a pele normal, entretanto sem diferenças entre os subtipos.^{76,88}

IL-18 é uma citocina pró-inflamatória membro da família IL-1 que também foi mais expressa nas células inflamatórias do infiltrado dérmico das amostras do grupo subagudo. Existem estudos prévios que identificaram maior expressão de IL-18 no LEC do que nos grupos controle,^{72,89} porém são estudos realizados apenas nos ceratinócitos e são estudos realizados em amostras de LEC discoide e subagudo que foram incluídos em um único grupo, ou seja, não foram estudados de forma individualizada. A IL-10 e a IL-6, que

são interleucinas capazes de induzir hiperatividade de células B, também estavam igualmente expressas nas amostras dos três grupos de LEC. É provável que elas atuem na patogênese do LE sistêmico, uma vez que trabalhos prévios mostraram aumento dos níveis séricos dessas citocinas na doença, além de indução da doença pela produção de IL-6 por ceratinócitos.^{62,32} Entretanto, seu papel no LEC, bem como o modo como o IL-6 poderia produzir as lesões cutâneas do LEC ainda é incerto.

Os resultados semelhantes encontrados entre os grupos discoide e tímido quanto à expressão das citocinas são importantes no sentido de não somente caracterizar melhor a patogênese do subtipo tímido, mas também compará-lo com outros subtipos de LEC, de forma que este estudo inicia uma progressão para a o entendimento da doença.

O grupo subagudo, além de se mostrar diferente dos outros dois grupos quanto à expressão das citocinas inflamatórias, também apresentou algumas semelhanças com pacientes LEC+/LES+, como por exemplo a maior expressão de IL-1 β . Esta citocina foi mais expressa nas células inflamatórias dérmicas dos pacientes de LEC subagudo do que nos outros dois subtipos e também mais expressa nas células epidérmicas de pacientes com LEC e LE sistêmico associado (LEC+/LES+) do que em pacientes sem LE sistêmico (LEC+/LES-). A IL-17 também foi menos expressa no interstício dos pacientes de LEC+/LES+, assim como nas amostras de LEC subagudo. Além disso, a densidade de células CD8+ foi menor no subtipo subagudo do que nos subtipos discoide e tímido, de modo que a relação CD4/CD8 observada naquele grupo também foi menor. O mesmo foi encontrado em pacientes LEC+/LES+, que também tiveram menor expressão de CD8 do que pacientes com LEC que não tinham LE sistêmico (LEC+/LEC-). Entretanto, a maioria dos pacientes com LEC subagudo tinham LE sistêmico (70,58%), e a maioria dos pacientes com LEC discoide e tímido não tinham doença sistêmica concomitante. Isto pode ter causado um viés na semelhança de resultados encontrados entre LEC subagudo e pacientes LEC+/LES+. Entretanto, dos 20 pacientes com LEC+/LES-, 12 apresentavam LEC subagudo, ou seja, metade desta população. E, mesmo assim, foram vistas semelhanças entre o grupo subagudo e o grupo LEC+/LES+. Estas considerações sugerem que, mesmo que a semelhanças entre os dois grupos se dê pela maior frequência de LE sistêmico na população subaguda, deve haver algum fator circulante, e não local, que diferencie o microambiente inflamatório do grupo subagudo em relação ao LEC discoide e tímido. Identificar este fator, e elucidar se esta afirmação procede, é um desafio. Um estudo que individualizasse cada subtipo de LEC em um grupo com doença sistêmica e outro sem doença sistêmica poderia esclarecer melhor os

mecanismos imunopatogênicos de cada subtipo e individualizar fatores responsáveis pelas diferenças vistas entre os subtipos. Entretanto, isso somente seria possível em um estudo com maior casuística, de modo a haver maior força estatística nos resultados encontrados.

A expressão de ICAM-1 não foi diferente nas células inflamatórias entre os subtipos subagudo, discoide e túmido, embora a expressão deste marcador tenha sido alta em todos os grupos estudados. Sabe-se que esta molécula de adesão é essencial para migração de leucócitos ao sítio inflamatório e que aumento da sua expressão foi descrita em lesões de LEC induzidas experimentalmente pela radiação ultravioleta.^{90,91} Além disso, Khun e colaboradores, em 2002, estudaram pacientes com LEC subagudo, discoide e túmido e, de forma semelhante ao nosso estudo, também verificou porcentagem alta de células expressando esta molécula nos subtipos de LEC, que foi em torno de 75%.⁹² O presente estudo identificou em torno de 40% de expressão nas células inflamatórias dos três subtipos. Entretanto, pacientes LEC+/LES+ tiveram, de forma estatisticamente significativa, maior expressão desta molécula do que pacientes LEC+/LES-, o que pode significar maior estímulo à inflamação na pele sob ação de uma doença sistêmica. Estes resultados, analisados em conjunto, podem indicar que a microambiente inflamatório da pele pode sofrer alterações quando fatores sistêmicos estão presentes, e poderá eventualmente justificar diferenças clínico-histopatológicas observadas entre os subtipos.

Os resultados da IFD foram semelhantes nos três subtipos de LEC estudados, inclusive nos pacientes de LEC túmido que tiveram este exame positivo. A IFD também foi semelhante entre pacientes LEC+/LES+ e LEC+/LES-. Os pacientes apresentaram, de um modo geral, positividade para mais de uma imunoglobulina ou complemento, e foi mais frequente para IgG, seguida de IgM, C3, IgA e C1q. Neste estudo C3 foi um depósito mais frequente na zona da membrana basal das amostras de LEC subagudo do que de LEC discoide e túmido, embora a literatura mencione não haver diferenças em relação ao padrão e o tipo dos depósitos na IFD dos três subtipos. É interessante que, nos testes estatísticos de associação, a presença de depósitos de IgM e IgA no exame de IFD ocorreu em casos de pacientes LEC+/LES+ com maior imunoexpressão de TNF- α no infiltrado inflamatório dérmico, mas não nos pacientes LEC+/LES-. Por outro lado, depósitos de C3 se associaram a maior expressão de TNF- α no interstício dérmico e menor expressão epidérmica dessa citocina nos pacientes LEC+/LES-. Estes resultados ressaltam a relação entre as citocinas e as imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento no LEC e ressaltam a rede interligada das moléculas do sistema imune atuando na patogênese da doença.

Também é importante mencionar o estudo que fizemos sobre o mecanismos imunorregulatório nos três subtipos de LEC. Sabe-se que, no LE sistêmico, distúrbios na tolerância imunológica central e periférica são cruciais para a deflagração do fenômeno autoimune.⁷⁷ Entretanto, são poucos os estudos que analisaram este processo nas lesões LEC.⁷⁵ Embora a caracterização dos fenômenos de tolerância não estejam bem definidos na doença cutânea, a presença de autoanticorpos é, frequentemente associada ao LEC, como por exemplo o anti-Ro nos pacientes com LEC subagudo. Acredita-se também que outros anticorpos podem estar associados ao LEC, como anti-anexina e anti-C1q.^{1,46,93} Além disso, é provável que a citotoxicidade mediada por autoanticorpos seja um dos vários mecanismos responsáveis pelo dano tecidual.⁹⁴ Está estabelecida que a reação imune humoral é dependente de células T, e recentemente vem sendo estudada a importância das células T regulatórias (Treg) na imunomodulação do LE. Entretanto, a maioria dos resultados encontrados provem de estudos com LE sistêmico. Alguns estudos sobre a participação desta célula no LEC vem sendo feitos, e não foram encontradas diferenças entre os subtipos, porém foi verificada a diminuição do número e função das Treg na pele acometida pela doença.^{80,91} As células Treg expressam o fator de transcrição FOXP3, que é crucial para a manutenção e função desse tipo celular. A maioria destas células são CD4+ e também expressam CD25. Embora nosso estudo não tenha encontrado diferenças entre os subgrupos quanto à expressão FOXP3, que é um marcador de célula Treg, a expressão nos três subtipos foi baixa em relação ao número de células CD4+, de modo que favorece a teoria de uma menor atuação dessas células na doença, cursando assim com um desequilíbrio da tolerância periférica. Nos três subgrupos, a média de expressão de células CD25+ foi maior do que a de células FOXP3+. Embora CD25 também esteja presente em células T ativadas, isto pode também indicar uma perda da função Treg nas células CD25+ FOXP3-. Novos estudos com dupla marcação de FOXP3 e CD25 poderão confirmar esta hipótese. Também é interessante mencionar a associação encontrada entre IL-10 e células CD25+ no grupo subagudo, o que sugere a participação desta interleucina na imunomodulação das lesões cutâneas lúpicas, uma vez que a IL-10 executa várias funções, como proliferação e ativação das células B, mas é eminentemente anti-inflamatória.^{46,48}

6. CONCLUSÃO

1) A densidade de células CD8+ foi mais baixa em pacientes de LEC subagudo e pacientes com LEC e lúpus eritematoso sistêmico concomitante;

2) Em todas as amostras dos subtipos estudados, a densidade de células CD4+ foi maior do que a porcentagem de células CD8+ e CD56+ no infiltrado inflamatório dérmico;

3) Os grânulos citotóxicos, no lúpus eritematoso cutâneo, são principalmente produzidos por células CD8+. Células CD56 + estão presentes em pequeno número nas amostras dos subtipos discoide, subagudo e tímido;

4) Não houve diferença entre os subtipos de LEC em relação à expressão dos grânulos citotóxicos. Entretanto, houve correlação positiva entre a imunexpressão dos grânulos e também entre a densidade de células CD8+ e expressão dos grânulos no grupo tímido;

5) Não foram encontradas diferenças entre a imunomarcção de CD4, CD25 e FOXP3 entre os subtipos. Entretanto, a média da densidade de células CD25+ e FOXP3+ foi baixa, em relação à densidade de células CD4+ nos 3 grupos estudados.

6) Pacientes com LEC subagudo apresentaram maior imunomarcção dérmica de IL-1 β , IL-18, TNF- α do que os outros subtipos. Também apresentaram maior expressão de IL-17 nas células da epiderme e menor expressão no interstício dérmico;

7) Pacientes com LEC e lúpus eritematoso sistêmico concomitante apresentaram maior expressão de IL-1 β nas células epidérmicas e maior densidade de células inflamatórias ICAM+ no infiltrado inflamatório dérmico. A expressão de IL-17 foi menor no interstício dérmico, quando comparada à de pacientes com LEC e sem lúpus eritematoso sistêmico;

8) Depósitos de IgM e IgA na imunofluorescência direta se associaram a maior imunexpressão de TNF- α no infiltrado inflamatório dérmico de pacientes com LEC e LE sistêmico concomitante;

9) Depósitos de C3 na imunofluorescência direta se associaram a maior expressão de TNF- α no interstício dérmico e menor expressão epidérmica dessa citocina nos pacientes com LEC e que não tinham LE sistêmico

O conjunto destes resultados sugere a participação da citotoxicidade mediada por grânulos, da síntese local de citocinas e de distúrbios da imunorregulação na patogênese do lúpus eritematoso cutâneo. Desta forma, ele corrobora a grande complexidade da patogênese do LEC, que é arquitetada por uma interação entre diversos mecanismos do sistema imune e

envolve fenômenos de citotoxicidade, inflamação mediada por células T, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, além de defeitos no mecanismo imunorregulatório e geração de autoanticorpos. Este estudo cria novas perspectivas para o entendimento da doença e das razões para diferentes manifestações clínico-histopatológicas no LEC. Alguns desafios persistem, como definir a interferência de fatores sistêmicos no microambiente inflamatório da pele acometida por LEC e a justificativa para ausência de alterações epidérmicas e mais mucinose dérmica nos pacientes com lesões túmidas.

7. REFERÊNCIAS

1. Obermoser G, Sontheimer RD, Zelger B. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 2010; 19(9):1050–70.
2. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* 1993; 72(2):113–24.
3. Lee LA. Lupus Erythematosus. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 2nd ed. Spain: Mosby Elsevier; 2008. p.561-74.
4. Kuhn A, Landmann A. The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2014 11;48-49:14–9.
5. Gilliam JN, Sontheimer RD. Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1981;4(4):471-5.
6. Luiz A, Villela C. Lupus eritematoso cutâneo - Aspectos clínicos e laboratoriais. *An Bras Dermatol*. 2005;80(2):119–31.
7. Biazar C, Sigges J, Patsinakidis N, Ruland V, Amler S, Bonsmann G, et al. Cutaneous lupus erythematosus: first multicenter database analysis of 1002 patients from the European Society of Cutaneous Lupus Erythematosus (EUSCLE). *Autoimmun Rev*. 2013; 12(3):444–54.
8. Kuhn A, Sticherling M, Bonsmann G. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007; 5(12):1124–37.
9. Costner MISR, Sontheimer RD, Provost TT. Lupus Erythematosus. In: Sontheimer RD, Provost TT (eds). *Cutaneous Manifestations of Rheumatic Diseases*. 2nd ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p.15-64.
10. Patel P, Werth V. Cutaneous lupus erythematosus: a review. *Dermatol Clin* 2002; 20(3): 373–85.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271-7.
12. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(9): 1725.

13. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2677-86.
14. Kuhn A, Wenzel J, Weyd H. Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a Critical Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014; 47:148–62.
15. Wenzel J, Zahn S, Tuting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus.* 2010; 19(9):1020-8.
16. Winfield H, Joaworsky C. Connective tissue diseases. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson Jr BL, Murphy GF, Xu X. *Lever's histopathology of the skin.* 10th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2009: 279- 310.
17. Cardinali C, Caproni M, Fabbri P. The utility of the lupus band test on sun- protected non-lesional skin for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 1999; 17(4):427-32.
18. Cardinali C, Caproni M, Fabbri P. The composition of the lupus band test (LBT) on the sun-protected non-lesional (SPNL) skin in patients with cutaneous lupus erythematosus (CLE). *Lupus.* 1999; 8(9):755-60.
19. Fernandes MS, Girisha BS, Viswanathan N, Sripathi H, Noronha TM. Discoid lupus erythematosus with squamous cell carcinoma: a case report and review of the literature in Indian patients. *Lupus.* 2015; 24(14):1562-6.
20. Abe M, Ishikawa O, Miyachi Y. Linear cutaneous lupus erythematosus following the lines of Blaschko. *Br J Dermatol* 1998; 139(2):307–10.
21. Wenzel J, Bauer R, Bieber T, Bohm I. Autoantibodies in patients with Lupus erythematosus: spectrum and frequencies. *Dermatology* 2000; 201(3): 282–3.
22. Luzar B, Calonje E. Idiopathic connective tissue disorders. In: Calonje E, Brenn T, Lazar A, Mckee PH. *McKee's Pathology of the skin.* 4th ed. China: Elsevier Saunders; 2012; 711-59.
23. Crowson AN, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol.* 2001;28(1):1–23.
24. Werth VP. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2005;4(5):296–302.
25. Rothfield N, Sontheimer R, Bernstein M. Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. *Clin Dermatol* 2006; 24(5): 348-62.

26. Lowe GC, Henderson CL, Grau RH, Hansen CB, Sontheimer RD. A systematic review of drug-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 2011;164(3):465-72.
27. David-Bajar KM, Davis BM. Pathology, immunopathology and immunohistochemistry in cutaneous lupus erythematosus. *Lupus*. 1997;(6):145-57.
28. Kuhn A, Bein D, Bonsmann G. The 100th anniversary of lupus erythematosus tumidus. *Autoimmun Rev*. 2009; 8(6):441–8.
29. Teixeira M, Ferreira M, Alves R, Selores M. Lupus erythematosus tumidus: an underestimated entity. *Lupus*. 2006;15(5):296–300.
30. Alexiades- Armenakas M, Baldassano M, Bince B, Werth V, Bystryn J, Kamino H et al. Tumid Lupus Erythematosus: criteria for classification with immunohistochemical analysis. *Arthr Rheum*. 2003; 49(4):494-500.
31. Kuhn A, Sonthag M, Ruzicka T, Lehmann P, Megahed M. Histopathologic findings in lupus erythematosus tumidus: review of 80 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48:901-8.
32. Kirchhof MG, Dutz JP. The Immunopathology of Cutaneous Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am*. 2014; 40(3):455–74.
33. Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT, Langefeld CD, et al. Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet* 2011; 7(2):e1001311.
34. Lin JH, Dutz JP, Sontheimer RD, Werth VP. Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2007; 33(1-2):85-106.
35. Millard TP, McGregor JM. Molecular genetics of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26(2):184-91.
36. Jarvinen TM, Hellquist A, Koskenmies S, Einarsdottir E, Koskinen LL, Jeskanen, et al. Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol*. 2010; 19(2):123–31.
37. Lee-Kirsch MA, Gong M, Schulz H, Ruschendorf F, Stein A, Pfeiffer C, et al. Familial chilblain lupus, a monogenic form of cutaneous lupus erythematosus, maps to chromosome 3p. *Am J Hum Genet*. 2006; 79(4): 731–7.
38. Bennion SD, Norris DA. Ultraviolet light modulation of autoantigens, epidermal cytokines and adhesion molecules as contributing factors of the pathogenesis of cutaneous LE. *Lupus*. 1997; 6(2):181-92.

39. Epstein JH, Tuffanelli D, Dubois EL. Light sensitivity and lupus erythematosus. *Arch Dermatol.* 1965; 91:483–5.
40. Baer RL, Harber LC. Photobiology of lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1965; 92:124–8.
41. Cripps DJ, Rankin J. Action spectra of lupus erythematosus and experimental immunofluorescence. *Arch Dermatol* 1973; 107(4):563–7.
42. Freeman RG, Knox JM, Owens DW. Cutaneous lesions of lupus erythematosus induced by monochromatic light. *Arch Dermatol.* 1969; 100(6):677–82.
43. Kochevar IE. Action spectrum and mechanisms of UV radiation-induced injury in lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 1985; 85 (1 Suppl):140s–3s.
44. Lehmann P, Hölzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22:181–7.
45. Klein RS, Werth VP, Dowdy JC, Sayre RM. Analysis of compact fluorescent lights for use by patients with photosensitive conditions. *Photochem Photobiol.* 2009;85:1004–10.
46. Yu C, Chang C, Zhang J. Immunologic and genetic considerations of cutaneous lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2013; 41:34–45.
47. Avalos-Diaz E, Alvarado-Flores E, Herrera-Esparza R. UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Rev Rhum Engl Ed.* 1999; 66(1):13–9.
48. Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNF alpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm Res.* 2000;49(6):290–6.
49. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene. *J Invest Dermatol.* 2009;129(4):994-1001.
50. Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D, Oslislo C, Megahed M, Ruzicka T, Lehmann P. Phototesting in lupus erythematosus: a 15-year experience. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(1):86–95.
51. Ghoreishi M, Dutz JP. Cutaneous lupus erythematosus: recent lessons from animal models. *Lupus.* 2010; 19(9): 1029-35.

52. Verdolini R, Bugatti L, Giangiacomi M, Nicolini M, Filosa G, Cerio R. Systemic lupus erythematosus induced by Epstein-Barr virus infection. *Br J Dermatol*. 2002;146(5):877–81.
53. Kuhn A, Sigges J, Biazar C, Ruland V, Patsinakidis N, Landmann A, et al. Influence of smoking on disease severity and antimalarial therapy in cutaneous lupus erythematosus: analysis of 1002 patients from the EUSCLE database. *Br J Dermatol*. 2014; 171(3):571–9.
54. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of the dead cells. *Cell*. 2010; 140(5):619–30.
55. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997; 390(6658): 350–1.
56. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine- dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion. *J Clin Invest*. 2002; 109(1):41–50.
57. Norris D, Whang K, David-Bajar K, Bennion S. The influence of ultraviolet light on immunological cytotoxicity in the skin. *Photochem Photobiol*. 1997; 65(4):636–46.
58. Chung JH, Kwon OS, Eun HC, Youn JI, Song YW, Kim JG, Cho KH. Apoptosis in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Am J Dermatopathol*. 1998; 20(3):233–41.
59. Qin J, Bacon P, Panella J, Sitailo L, Denning M, Nickoloff B. Low-dose UV radiation sensitizes keratinocytes to TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Physiol*. 2004;200(1):155–66.
60. Kuhn A, Herrmann M, Kleber S, Beckmann-Welle M, Fehsel K, Martin-Villalba A, et al. Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):935–50.
61. Grassi M, Capello F, Bertolino L, Seia Z, Pippione M. Identification of granzyme B-expressing CD-8-positive T cells in lymphocytic inflammatory infiltrate in cutaneous lupus erythematosus and in dermatomyositis. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(8):910–14.
62. Robinson ES, Weth VP. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Cytokine* 2015;73(2)326–34.
63. McNiff JM, Kaplan DH. Plasmacytoid dendritic cells are present in cutaneous dermatomyositis lesions in a pattern distinct from lupus erythematosus. *J Cutan Pathol*. 2008; 35(5):452–6.
64. Obermoser G, Schwingshackl P, Weber F, Stanarevic G, Zelger B, Romani N, et al.


- Recruitment of plasmacytoid dendritic cells in ultraviolet irradiation-induced lupus erythematosus tumidus. *Br J Dermatol.* 2009; 160(1):197–200.
65. Wenzel J, Zahn S, Bieber T, Tüting T. Type I interferon-associated cytotoxic inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301(1):83–6.
 66. Wenzel J, Proelss J, Wiechert A, Zahn S, Bieber T, Tüting T. CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 56(4):648-50.
 67. Zampieri S, Alaibac M, Iaccarino L, Rondinone R, Ghirardello A, Sarzi-Puttini P, et al. Tumour necrosis factor alpha is expressed in refractory skin lesions from patients with subacute lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(4): 545-8.
 68. Normam MU, James WG, Hickey MJ. Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/ faslpr mice. *J Leukoc Biol.* 2008; 84(1):68-76.
 69. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008; 22(5): 847–61
 70. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Yebra-Bango M, Tutor-Ureta P, Rosado S, et al. Monocytes and T lymphocytes contribute to a predominance of interleukin 6 and interleukin 10 in systemic lupus erythematosus. *Cytomet B Clin Cytomet.* 2009; 76(4):261–70.
 71. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg I. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18(5):565–70.
 72. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B, Werfel T, Wittmann M. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(10): 3205–15.
 73. Magro CM, Segal JP, Crowson AN, Chadwick P. The phenotypic profile of dermatomyositis and lupus erythematosus: a comparative analysis. *J Cutan Pathol.* 2010; 37(6): 659–71.
 74. Wenzel J, Uerlich M, Wörrenkämper E, Freutel S, Bieber T, Tüting T. Scarring skin lesions of discoid lupus erythematosus are characterized by high numbers of skin-homing cytotoxic lymphocytes associated with strong expression of the type I interferon-induced protein MxA. *Br J Dermatol.* 2005;153(5):1011–15.

75. Gambichler T, Pätzholz J, Schmitz L, Lahner N, Kreuter A. FOXP3⁺ and CD39⁺ regulatory T cells in subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(10):1972-7.
76. Tanasescu C, Balanescu E, Balanescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, et al. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur J Intern Med.* 2010; 21(3):202–7.
77. Tsokos GC, Crispín JC. T cells. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois lupus erythematosus.* 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2013. p.96-103.
78. Kuhn A, Beissert S, Kammer PH. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301(1):71–81.
79. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299(5609):1057–61.
80. Franz B, Fritzsching B, Riehl A, Oberle N, Klemke CD, Sykora J, et al. Low number of regulatory T cells in skin lesions of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(6):1910–20.
81. Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol.* 2008;35(11):1032–39.
82. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.* 2007; 19(6):400-8.
83. Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3639-45.
84. Lage D, Pimentel VN, Soares TC, Metze K, Cintra ML. Perforin and granzyme B expression in oral and cutaneous lichen planus - a comparative study. *J Cutan Pathol.* 2011;38(12):973-8.
85. Lage D, Juliano PB, Metze K, de Souza EM, Cintra ML. Lichen planus and lichenoid drug-induced eruption: a histological and immunohistochemical study. *Int J Dermatol.* 2012; 51(10):1199-205.
86. Pimentel VN, de Matos LS, Soares TC, Adam R, Metze K, Correa ME, et al. Perforin and granzyme B involvement in oral lesions of lichen planus and chronic GVHD. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(10):741-6.
87. Kuhn A, Bein D, Bonsmann G. The 100th anniversary of lupus erythematosus tumidus. *Autoimmun Rev.* 2009;8(6):441–8.

88. Oh S, Roh H, Kwon J, Lee S, Kim J, Choit H, Lim BJ. Expression of interleukin-17 is correlated with interferon- α expression in cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2011; 36(5):512-20.
89. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B, Werfel T, Whittmann M. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(10): 3205-15.
90. Norris DA. Pathomechanisms of photosensitive lupus erythematosus. *J Invest Dermatol*. 1993;100(1):58S–68S.
91. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425–34.
92. Kuhn A, Sonntag M, Lehmann P, Megahed M, Vestweber D, Ruzicka T. Characterization of the inflammatory infiltrate and expression of endothelial cell adhesion molecules in lupus erythematosus tumidus. *Arch Dermatol Res*. 2002; 294(1):6–13.
93. Yoshimasu T, Hiroi A, Ohtani T, Uede K, Furukawa F. Comparison of anti60 e 52 kDa SS-A/Ro antibodies in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol Sci*. 2002;29(1):35-41.
94. Stavropoulos PG, Goules AV, Avgerinou G, Katsambas AD. Pathogenesis of subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 22(11):1281–9.
95. Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L et al. Th17 and natural Treg cell population dynamic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5):1472-83.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/ Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

 UNICAMP	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
<p>CEP, 21/12/10 (Grupo III)</p> <p>PARECER CEP: N° 1214/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto). CAAE: 0945.0.146.000-10</p>	
<p>I - IDENTIFICAÇÃO:</p> <p>PROJETO: “LUPUS ERITEMATOSO CUTÂNEO: ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA”. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leticia Fogagnolo INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/12/2010 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/12/11 (O formulário encontra-se no <i>site</i> acima).</p>	
<p>II - OBJETIVOS</p> <p>Analisar os achados clínicos, histológicos, de imunofluorescência direta e imunohistoquímicos de pacientes com lúpus eritematoso cutâneo e correlacioná-los entre si, de modo a caracterizar os eventos que levam ao surgimento das lesões.</p>	
<p>III - SUMÁRIO</p> <p>Pesquisa que tem por finalidade a realização de dissertação de mestrado. Trata-se de estudo retrospectivo, mediante consulta em prontuário e análise de amostras de pele acometida por lúpus eritematoso cutâneo, coletadas nos últimos 3 anos, de pacientes atendidos no HC da UNICAMP e armazenadas em arquivos nos laboratórios de Anatomia Patológica da UNICAMP. A amostra é estimada em prontuários e material de biópsia de 50 sujeitos. A metodologia de análise do material está claramente descrita no protocolo de pesquisa. As pesquisadoras esperam que os resultados possam auxiliar na elaboração de novas armas diagnósticas e novos alvos terapêuticos, com possível impacto na qualidade de vida e prognóstico dos doentes acometidos.</p>	
<p>IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES</p> <p>A pesquisa é de interesse clínico. São descritos os aspectos éticos e as autoras solicitam dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devido à característica de estudo retrospectivo, com consulta a prontuário e análise de material armazenado em arquivo.</p>	
<p>V - PARECER DO CEP</p> <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.</p>	
<p>Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas - SP</p>	<p>fone (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br</p>
<p>- 1 -</p>	



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

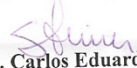
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de dezembro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.2 ANEXO II: Autorização junto à editora (Copyright) para inclusão do artigo científico na tese (Capítulo 1).

RightsLink Printable License

05/10/15 02:12



JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 05, 2015

This Agreement between Leticia Fogagnolo ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3722310603795
License date	Oct 05, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Clinical and Experimental Dermatology
Licensed Content Title	Cytotoxic granules in distinct subsets of cutaneous lupus erythematosus
Licensed Content Author	L. Fogagnolo,T. C. B. Soares,C. G. Senna,E. M. Souza,M. H. S. L. Blotta,M. L. Cintra
Licensed Content Date	Sep 12, 2014
Pages	5
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Cutaneous Lupus Erythematosus: histological, immunohistochemical and direct immunofluorescence analysis
Expected completion date	Dec 2015
Expected size (number of pages)	120
Requestor Location	Leticia Fogagnolo Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126 Campinas, Brazil 13083-887 Attn: Leticia Fogagnolo
Customer VAT ID	BR22017888800
Billing Type	Invoice
Billing Address	Leticia Fogagnolo Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126 Campinas, Brazil 13083-887 Attn: Leticia Fogagnolo
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking accept in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your Rightslink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process This license, **and any content (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this licence must be completed within two years of the date of the grant of this licence (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the **STM Permissions Guidelines** only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times

remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- **NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.**
- **WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.**
- **You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.**
- **IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.**
- **Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.**
- **The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not**

constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\)License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organisations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated May 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

8.3 ANEXO III: Declaração de Responsabilidade

DECLARAÇÃO

A aluna Leticia Fogagnolo e a orientadora Profa. Dra. Maria Leticia Cintra declaram que as cópias de artigos de sua autoria ou co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam desta Tese de Doutorado, intitulada “Lúpus Eritematoso Cutâneo: análise histológica, imuno-histoquímica e de imunofluorescência direta” não infringem os dispositivos da Lei no 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

O documento contendo as respectivas assinaturas para esta declaração encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.