



Divisione di Guna S.p.a.

ABSTRACT da Journal of Dermatological Science (maggio 2015)

Prof. Torello Lotti

Specializzazione in Dermatologia - Full Professor & Chair of Dermatology and Venereology Chair, Executive Scientific Committee Vitiligo Research Foundation, New York, NY, USA

IL TRATTAMENTO CON CITOCHINE A BASSO DOSAGGIO RIDUCE LE LESIONI DA STRESS OSSIDATIVO NEI CHERATINOCITI PERILESIONALI DA PAZIENTI AFFETTI DA VITILIGINE

Generale

La vitiligine è una malattia sistemica della pelle caratterizzata da perdita della pigmentazione della pelle, dovuta a un danno o ad alterata funzione del melanocita. Dati recenti sottolineano la sua etiologia multifattoriale fra cui spicca la componente autoimmune e alterazioni redox.

La causa più importante dell'etiologia autoimmune della vitiligine si estrinseca in una aumentata risposta della popolazione Th1/Th17 e dalla ridotta risposta TReg e Th2.

Studi precedenti indicano una marcata ossidoriduzione dei cheratinociti (il tipo di cellule più abbondante nell'epidermide) perilesionali (ottenuti dall'area di pelle sana che circonda l'area depigmentata di pazienti affetti da vitiligine) dove si verifica la maggiore infiltrazione di cellule infiammatorie. Non esiste una terapia definita per la vitiligine. Sebbene un certo numero di diversi approcci siano stati usati per l'induzione di cellule Treg e Th2, questi sono stati associati a risultati non pienamente soddisfacenti.

Obiettivo

Per individuare un approccio soddisfacente per il trattamento della vitiligine abbiamo in primo luogo puntato a identificare la possibile causa della sovrapproduzione di ROS nei cheratinociti perilesionali. Lo studio ha quindi testato l'effetto della somministrazione di citochine a basso dosaggio sulla produzione intra ed extracellulare di ROS, sulla possibilità di sopravvivenza della cellula e sul ciclo cellulare dei cheratinociti perilesionali.

Metodologia

Lo studio in vitro è stato condotto su cheratinociti perilesionali primari ottenuti dalla pelle dei pazienti affetti da vitiligine. L'attività del NADPH ossidasi è stata misurata su cheratinociti perilesionali intatti, trattati o no con le citochine, attraverso analisi fluorimetrica.

Per il trattamento dei cheratinociti perilesionali sono state utilizzate le seguenti citochine IL-10 and IL-4 (prodotte da TREGs e Th2, rispettivamente), basic fibroblasts growth factor (bFGF) e b-endorphin (con azione rispettivamente di modulazione della resistenza cellulare allo stress ossidativo e di modulazione della risposta immunitaria).

Tutte le citochine sono state utilizzate a una concentrazione di 10 fg/ml e sono state preparate attraverso la tecnica SKA (*Sequential Kinetic Activation*). La produzione intracellulare di ROS e il ciclo cellulare sono stati



Divisione di Guna S.p.a.

analizzati attraverso citometria a flusso usando rispettivamente H2DCFDA e tintura di ioduro di propidio. La vitalità delle cellule è stata misurata attraverso il metodo delle riduzione fluorimetrica della resazurina.

Risultati

I nostri risultati suggeriscono che l'ossidasi del NADPH ossidasi rappresenta una delle cause principali della sovrapproduzione di ROS da parte dei cheratinociti perilesionali. La SKA low-dose IL-10, b-endorphin e, in particolare, IL-4 e bFGF mostrano un effetto positivo sull'omeostasi dell'ossidazione e sulla vitalità cellulare e, nelle condizioni del nostro esperimento, non incidono sul ciclo cellulare dei cheratinociti perilesionali.

Conclusione

I dati preliminari suggeriscono che un basso dosaggio di IL-10, IL-4, b-endorphin e bFGF può essere proposto come un nuovo strumento terapeutico per il trattamento della vitiligine.

Bibliografia

1. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview, Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol* 2011;65(3):473–91.
2. Tarle' RG, Nascimento LM, Mira MT, Castro CC. Vitiligo—Part 1. *An Bras Dermatol* 2014;89(3):461–70.
3. Laddha NC, Dwivedi M, Mansuri MS, Gani AR, Ansarullah M, Ramachandran AV, et al. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. *Exp Dermatol* 2013;22(4):245–50.
4. Dwivedi M, Kemp EH, Laddha NC, Mansuri MS, Weetman AP, Begum R. Regulatory T cells in vitiligo: implications for pathogenesis and therapeutics. *Autoimmun Rev* 2015;14(1):49–56.
5. Sandoval-Cruz M, Garcí'a-Carrasco M, Sa'nchez-Porras R, Mendoza-Pinto C, Jime'nez-Herna'ndez M, Mungui'a-Realpozo P, et al. Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmun Rev* 2011;10(12):762–5.
6. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677–88.
7. Bassiouny DA, Shaker O. Role of interleukin-17 in the pathogenesis of vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2011;36(3):292–7.
8. Prignano F, Pescitelli L, Becatti M, Di Gennaro P, Fiorillo C, Taddei N, et al. Ultrastructural and functional alterations of mitochondria in PL vitiligo skin. *J Dermatol Sci* 2009;54(3):157–67.
9. Becatti M, Prignano F, Fiorillo C, Pescitelli L, Nassi P, Lotti T, et al. The involvement of Smac/DIABLO, p53, NF- κ B, and MAPK pathways in apoptosis of keratinocytes from perilesional vitiligo skin: Protective effects of curcumin and capsaicin. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(9):1309–21.
10. Roberti ML, Ricottini L, Capponi A, Sclauzero E, Vicenti P, Fiorentini E, et al. Immunomodulating treatment with low dose interleukin-4, interleukin-10 and interleukin-11 in psoriasis vulgaris. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014;28(1):133–9.
11. Radice E, Miranda V, Bellone G. Low-doses of sequential-kinetic-activated interferon-g enhance the ex vivo cytotoxicity of peripheral blood natural killer cells from patients with early-stage colorectal cancer. A preliminary study. *Int Immunopharmacol* 2014;19(1):66–73.
12. D'Amico L, Ruffini E, Ferracini R, Roato I. Low dose of IL-12 stimulates T cell response in cultures of PBMCs derived from non small cell lung cancer patients. *J Cancer Ther* 2012;3(4):337–42.
13. Mozzanica N, Villa ML, Foppa S, Vignati G, Cattaneo A, Diotti R, et al. Plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone, beta-endorphin, met-enkephalin, and natural killer cell activity in vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 1992;26(5 Pt 1):693–700.
14. Burdzin' ska A, Bartoszek-Bruzzone U, Godlewski MM, Orzechowski A. Sodium ascorbate and basic fibroblast growth factor protect muscle-derived cells from H₂O₂-induced oxidative stress. *Comp Med* 2006;56(6):493–501.
15. Zhang HX, Du GH, Zhang JT. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:385–9.
16. Takac I, Schro'der K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, et al. The Eloop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem* 2011;286(15):13304–13.
17. Kumar Mukhopadhyay A. History and evolution of pigmentary disorders in human. In: Lahiri Koushik, Chatterjee Manas, Sarkar Rashmi, editors. *Pigmentary disorders: a comprehensive compendium*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Pub; 2014. p. 1–7.
18. Lotti T, D'Erme AM. Vitiligo as a systemic disease. *Clin Dermatol* 2014;32(3): 430–434.
19. Spritz RA. Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2012;132:268–73.
20. Spencer JD, Gibbons NC, Rokos H, Peters EM, Wood JM, Schallreuter KU. Oxidative stress via hydrogen peroxide affects proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 2007;127(2):411–20.



Divisione di Guna S.p.a.

21. Seleit I, Bakry OA, Abdou AG, Dawoud NM. Immunohistochemical expression of aberrant Notch-1 signalling in vitiligo: an implication for pathogenesis. *Ann Diagn Pathol* 2014;18:117–24.
22. Moretti S, Fabbri P, Baroni G, Berti S, Bani D, Berti E, et al. Keratinocyte dysfunction in vitiligo epidermis: cytokine microenvironment and correlation to keratinocyte apoptosis. *Histol Histopathol* 2009;24(7):849–57.
23. Pradhan R, De S, Choudhary N, Mukherjee S, Chatterjee G, Ghosh A, et al. Can systemically generated reactive oxygen species help to monitor disease activity in generalized vitiligo?. A pilot study. *Indian J Dermatol* 2014;59(6): 547–551.
24. Deo SS, Bhagat AR, Shah RN. Study of oxidative stress in peripheral blood of Indian vitiligo patients. *Indian Dermatol Online J* 2013;4(4):279–82.
25. Maresca V, Roccella M, Roccella F, Camera E, Del Porto G, Passi S, et al. Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1997;109:310–3.
26. Colucci R, Bo`hm M, Moretti S. Commentary from the editorial board to vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system (Laddha et al.). *Exp Dermatol* 2013;22:397–8.
27. Westerhof W, d'Ischia M. Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. *Pigment Cell Res* 2007;20:345–59.
28. Speeckaert R, Speeckaert MM, van Geel N. Why treatments do(n't) work in vitiligo: an autoinflammatory perspective. *Autoimmun Rev* 2015;14(4): 332–340.
29. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVBactivated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;4(1):91–6.
30. Schallreuter KU, Salem MA, Gibbons NC, Martinez A, Slominski R, Lu`demann J, et al. Blunted epidermal L-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, Part 1: Epidermal H₂O₂/ONOO()-mediated stress abrogates tryptophan hydroxylase and dopa decarboxylase activities, leading to low serotonin and melatonin levels. *FASEB J* 2012;26(6):2457–70.
31. Schallreuter KU, Salem MA, Gibbons NC, Maitland DJ, Marsch E, Elwary SM, et al. Blunted epidermal L-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, Part 2: Epidermal H₂O₂/ONOO()-mediated stress in vitiligo hampers indoleamine 2,3-dioxygenase and aryl hydrocarbon receptor-mediated immune response signaling. *FASEB J* 2012;26(6):2471–85.
32. Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K, et al. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2004;122(4):1000–9.
33. Krieger-Brauer HI, Kather H. Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H₂O₂ generation in 3T3 L1-cells. *Biochem J* 1995;307(Pt 2):549–56.
34. Caixia T1, Daming Z, Xiran L. Levels of beta-endorphin in the plasma and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci* 2001;26(1):62–6.
35. Marinaro M, Boyaka PN, Finkelman FD, Kiyono H, Jackson RJ, Jirillo E, et al. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th₂)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *J Exp Med* 1997;185(3):415–27.
36. Cummins JM, Krakowka GS, Thompson CG. Systemic effect of interferons after oral administration in animals and humans. *Am J Vet Res* 2005;66(1):164–76.
37. Brod SA, Khan M. Oral administration of IFN-alpha is superior to subcutaneous administration of IFN-alpha in the suppression of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 1996;9(1):11–20.