



ARTIGO ORIGINAL

Níveis circulantes de beta-defensina humana-1 e polimorfismo gênico em pacientes egípcios com vitiligo não segmentar ☆,☆☆

Azza Gaber Antar Farag ^{id a,*}, Mohamed Abd AlMoneam Shoeib ^{id a},
 Azza Zagloul Iabeeb ^{id b}, Asmaa Shaaban Sleem ^{id b},
 Hagar Mahmoud AbdElkader Khallaf ^{id c}, Amany Salah Khalifa ^{id d},
 Mustafa Elsayed Elshaib ^{id e}, Nada Farag Elnaidany ^{id f}
 e Hayam Mohamed Aboelnasr Hanout ^{id a}

^a Departamento de Dermatologia, Andrologia e ISTs, Faculdade de Medicina, Menoufia University, Egito

^b Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina, Menoufia University, Egito

^c Departamento de Dermatologia, Tala Central Hospital, Ministry of Health, Al-Menoufia, Egito

^d Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Medicina, Menoufia University, Egito

^e Acadêmico de Medicina, Faculdade de Medicina, Menoufia University, Egito

^f Departamento de Farmácia Clínica, Faculdade de Farmácia, MSA University, Egito

Recebido em 15 de dezembro de 2021; aceito em 16 de abril de 2022

PALAVRAS-CHAVE

Genes;
 Polimorfismo
 genético;
 Vitiligo

Resumo

Fundamentos: O vitiligo é doença adquirida caracterizada por despigmentação da pele, que tem fundo genético e autoimune. A beta-defensina-1 humana (HBD-1) e seu polimorfismo gênico foram associados a alguns distúrbios autoimunes.

Objetivo: Elucidar o possível papel da HBD-1 na patogênese do vitiligo não segmentar (VNS) por meio da avaliação dos níveis séricos da HBD-1 e seu polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em pacientes com VNS, além de correlacionar os resultados com a extensão do vitiligo nesses pacientes.

Métodos: Um estudo de caso-controle com inclusão de 50 pacientes com VNS e 50 controles. O escore *Vitiligo Area Scoring Index* (VASI) foi utilizado para avaliar a gravidade da doença e investigações laboratoriais foram realizadas para avaliar os níveis séricos de HBD-1 utilizando ELISA e o SNP da defensina-beta1 (DEFB1) por análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP).

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2022.04.002>

☆ Como citar este artigo: Farag AGA, Shoeib MAA, Iabeeb AZ, Sleem AS, Khallaf HMA, Khalifa AS, et al. Human beta-defensin 1 circulating level and gene polymorphism in non-segmental vitiligo Egyptian patients. An Bras Dermatol. 2023;98:181–8.

☆☆ Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia, Andrologia e ISTs e Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina, Menoufia University, Egito.

* Autor para correspondência.

E-mail: azzagaber92@yahoo.com (A.G.A. Farag).

Resultados: Níveis séricos de HBD-1 significativamente mais baixos foram observados nos casos de VNS do que nos controles ($p < 0,001$). Houve predominância significativa do genótipo GG DEF1 e do alelo G nos pacientes com VNS em relação aos controles ($p < 0,001$). Os níveis séricos dos genótipos HBD-1 e DEF1 não foram associados ou correlacionados de maneira significativa com nenhum dos parâmetros pessoais e clínicos dos pacientes com vitiligo.

Limitações do estudo: O pequeno tamanho da amostra.

Conclusões: O polimorfismo do gene DEF1 (genótipo GG e alelo G) pode modular o risco de vitiligo e contribuir para o desenvolvimento de vitiligo em populações egípcias. A diminuição dos níveis circulantes de HBD-1 pode ter papel ativo na etiopatogenia do vitiligo, que pode ser mediada por seus possíveis efeitos anti-inflamatórios.

© 2022 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O vitiligo é doença adquirida da pigmentação da pele. Sua principal característica é a perda de melanócitos da epiderme e/ou a perda de sua função. O vitiligo é queixa bastante comum, com prevalência mundial de 0,2%–1,8%.¹ Sua etiologia exata permanece imprecisa; entretanto, supõe-se que autoimunidade desempenhe papel fundamental em sua patogênese.²

Beta-defensinas humanas (HBDs) são pequenos peptídeos catiônicos expressos em tecidos epiteliais em todo o corpo.³ Onze HBDs já foram identificadas.⁴ A primeira HBD identificada foi a beta-defensina humana (HBD-1), reconhecida em 1995.⁵ As HBDs ativam as respostas imunes inatas, tendo efeito antimicrobiano (peptídeos antimicrobianos) contra infecções. Além disso, as defensinas têm sido associadas ao desenvolvimento, à modulação imunológica e à fertilidade, bem como à cicatrização de feridas.⁶

Em relação às suas funções reguladoras imunológicas, as defensinas englobam propriedades pró e anti-inflamatórias.⁷ Os efeitos pró-inflamatórios ocorrem por meio da ligação com o receptor da defensina. Com base em sua natureza catiônica, as beta-defensinas interagem com uma diversidade de receptores que surgem da ligação eletrostática.⁸ A função contraditória das beta-defensinas (como anti-inflamatórias) foi demonstrada por meio de sua capacidade de atenuar uma resposta pró-inflamatória.⁹

O mecanismo pelo qual as beta-defensinas podem neutralizar a reação pró-inflamatória não está bem identificado, porém alguns mecanismos foram considerados. A ligação das defensinas (com carga positiva) a ligantes de carga negativa, como os lipopolissacarídeos (LPS), é mecanismo que possivelmente interfere na ligação com o ligante. Ainda, as defensinas podem atuar como antagonistas dos receptores utilizados por provocações pró-inflamatórias. Além disso, as beta-defensinas podem induzir a expressão de alguns mediadores anti-inflamatórios. Além disso, as defensinas (p. ex., LL-37) podem romper as membranas celulares, induzindo efeitos imunossupressores.¹⁰

A HBD-1 é um peptídeo de 3928,6 kDa.⁵ É expressa principalmente no epitélio e tem papel antimicrobiano contra vírus e bactérias gram-negativas e positivas.¹¹ Além dessa função antimicrobiana ativa, a HBD-1 tem efeitos imunomoduladores, pois é regulada positivamente em diferentes

condições inflamatórias.¹² A HBD-1 é programada pelo gene DEF1,¹³ que foi mapeado no cromossomo 8p22.¹⁴

Tendo em vista a autoimunidade, os polimorfismos dos genes HBD-1 e DEF1 foram estudados em algumas doenças sistêmicas e dermatológicas com graus variáveis de associação.^{15–18} Entretanto, a associação entre esse polimorfismo gênico e o vitiligo não foi suficientemente estudada em diferentes populações.¹⁹

Portanto, o objetivo do presente estudo foi elucidar o possível papel da HBD-1 na patogênese do VNS por meio da avaliação dos níveis séricos de HBD-1 e seu polimorfismo gênico em pacientes egípcios portadores de VNS, além de correlacionar os resultados com os aspectos clínicos do vitiligo nesses pacientes.

Pacientes e métodos

O presente trabalho é um estudo de caso-controle e incluiu 50 pacientes com VNS atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina, Menoufia University, durante o período de dezembro de 2019 a outubro de 2020. O diagnóstico definitivo de vitiligo foi estabelecido com base na apresentação clínica típica da doença por dois dermatologistas especialistas. O grupo controle incluiu 50 pessoas aparentemente saudáveis, pareadas por gênero e idade, sem histórico familiar de vitiligo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Direitos Humanos em Pesquisa da Faculdade de Medicina, Menoufia University, e estava de acordo com a Declaração de Helsinque de 1975 (revisada em 2000). O estudo tem registro de aprovação do comitê de ética (1202/2/4/20120).

Cada participante recebeu uma explicação completa sobre a natureza e o objetivo do estudo. Um termo de consentimento por escrito foi obtido de cada participante ou de seus pais (< 18 anos) antes do início do estudo.

Foram incluídos pacientes com VNS de ambos os sexos. Indivíduos com qualquer uma das seguintes doenças foram excluídos: 1) doenças sistêmicas (p. ex., diabetes *mellitus*, cirrose, infecção e insuficiência renal); 2) doenças autoimunes (sistêmicas ou cutâneas; p. ex., artrite reumatoide e psoríase).

Os casos estudados foram submetidos a anamnese e exame clínico. Foi realizado exame dermatológico para

identificar o tipo de VNS e sua distribuição. O escore VASI foi utilizado para determinar a gravidade do vitiligo.²⁰

Foram obtidos 5 mL de sangue venoso de cada participante estudado (pacientes e controles). Desses 5 mL, 2 mL foram deixados para coagular e depois centrifugados para separar o soro. Os soros separados foram armazenados em recipiente de plástico estéril a -20°C até o momento da análise dos níveis séricos de HBD-1. A segunda parte (3 mL) foi armazenada a -20°C em tubos contendo ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) para posterior análise do polimorfismo do gene da beta-defensina por análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP).

Ensaio ELISA para os níveis séricos de beta-defensina-1

Os níveis séricos de beta-defensina-1 foram medidos por kits ELISA (NeoBioscience Technology Co., Ltd, Shenzhen, República Popular da China) de acordo com as instruções do fabricante.

Genotipagem para o polimorfismo do gene DEFB1-20G/A (rs11362)

A extração do DNA foi feita em uma amostra de sangue utilizando o Mini Kit Gene JET® Whole Blood Genomic DNA Purification (THERMO SCIENTIFIC, EU/Lituânia), seguindo as instruções do fabricante. O SNP para o gene DEFB1 -20G/A (rs11362) foi realizado por PCR-RFLP. As sequências dos primers foram: F: CTT GAC TGT GGC ACC TCC CTT CAG (*sense*) e R: -CAG CCC TGG GGA TGG GAA ACT C- (*antisense*). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 30 uL contendo 60 ng de DNA, 3 µL 10× PCR Gold Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 uM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 0,4 mM de cada primer e 1 U de Ampli Taq Gold polimerase. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por 60 segundos, temperatura de hibridização de 66°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Após a PCR, os produtos foram digeridos com uma enzima de restrição específica, ScrFI (para G-20A) (Jingmei Biotech, Xangai). A genotipagem foi realizada às cegas. O produto de PCR de 268 pb foi digerido por ScrFI durante uma noite a 37°C.²¹

Análise estatística

Os dados foram avaliados com os programas Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 23 e Epicalc 2000. As estatísticas foram divididas em duas partes: a) estatísticas descritivas: ex. média (\bar{X}), mediana, desvio padrão (DP), intervalo, números (N) e porcentagens (%); e b) estatística analítica utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2), teste *t* de Student (*t*), teste de Mann-Whitney (*U*) e teste de Kruskal-Wallis. O valor de *p* foi considerado significativo se $\leq 0,05$.

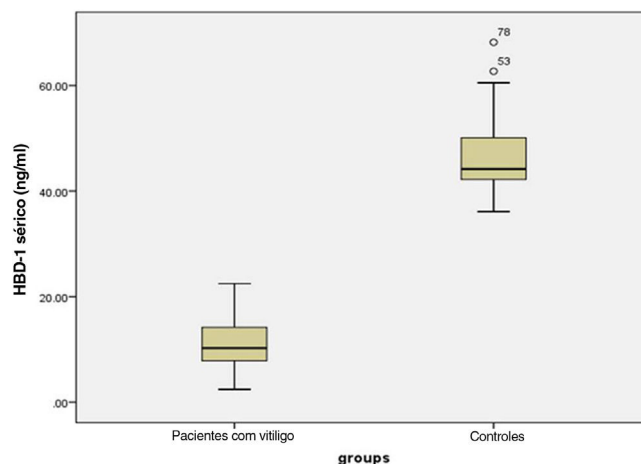


Figura 1 Níveis séricos de HBD-1 em pacientes com vitiligo e controles.

Resultados

Dos 50 pacientes com VNS incluídos, 23 (46%) eram do sexo feminino e 27 (54%) do sexo masculino, com idade variando de 7 a 60 anos. Não houve diferenças significantes entre os pacientes com vitiligo e os controles em relação à idade ($p=0,335$) e gênero ($p=0,070$) (tabela 1).

Desses pacientes com VNS, seis casos tinham história familiar positiva para vitiligo (6/50,12%). A duração da doença variou de três a 120 meses. O escore VASI calculado variou de 0,1 a 10. Em relação ao tipo de vitiligo, 18 (36%) pacientes apresentavam vitiligo acrofacial, dez (20%) pacientes tinham vitiligo generalizado e 22 (44%) pacientes tinham vitiligo em placa única focal. Somente quatro casos (8%) apresentavam leucotríquia e quatro casos (8%) apresentavam acometimento de mucosa (tabela 1).

Níveis séricos de HBD-1

Os níveis séricos de HBD-1 investigados foram significativamente mais baixos nos pacientes com vitiligo ($11,14 \pm 4,72$ ng/mL) do que nos controles ($46,53 \pm 6,77$ ng/mL; $p < 0,001$) – figura 1.

Relação entre os níveis séricos de HBD-1 e os parâmetros estudados de pacientes com vitiligo

Os níveis séricos de HBD-1 não foram associados ou correlacionados significativamente com nenhum dos dados pessoais ou clínicos dos pacientes com vitiligo ($p > 0,05$ para todos; dados não apresentados).

Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A aplicação do EHW para os genótipos de DEFB-1 revelou que tanto os casos quanto o grupo controle apresentaram diferenças não significantes entre os valores observados e esperados ($p=0,290$ e $p=0,432$ respectivamente) – tabela 2.

Tabela 1 Dados pessoais e clínicos dos pacientes com vitiligo e controles estudados

Características pessoais	Pacientes com vitiligo (n = 50)		Controles (n = 50)		Teste de significância	p-valor
<i>Idade (anos)</i>					U = 0,97	0,335
Média ± DP	30,08 ± 14,46		32,30 ± 7,27			
Mediana	30		33			
Variação	7-60		18-46			
	n	%	n	%	χ^2	p-valor
<i>Sexo</i>					3,27	0,070
Masculino	27	54,0	18	36,0		
Feminino	23	46,0	32	64,0		
<i>História familiar de vitiligo</i>						
Positiva	6	12,0				
Negativa	44	88,0	-		-	-
<i>Duração da doença/meses</i>						
Média ± DP	17,28 ± 17,78		-		-	-
Mediana	12					
Variação	3-120					
<i>Score VASI</i>						
Média ± DP	3,72 ± 2,38		-		-	-
Mediana	3,50					
Variação	0,1-10					
<i>Tipos de vitiligo</i>						
Acrofacial	18	36,0	-		-	-
Generalizado	10	20,0				
Focal	22	44,0				
<i>Acometimento capilar</i>						
Não	46	92,0	-		-	-
Sim	4	8,0				
<i>Acometimento da membrana mucosa</i>						
Não	46	92,0	-		-	-
Sim	4	8,0	-		-	-

U, teste U de Mann-Whitney; χ^2 , teste do qui-quadrado; n, número; VASI, *Vitiligo Area Severity Index*.

Tabela 2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg para genótipos DEFB-1 de pacientes com vitiligo e grupo controle

Genótipos de DEFB-1	Pacientes (n = 50)		Controles (n = 50)	
	Observados	Esperados	Observados	Esperados
GG	37	37,8	0	0,5
AG	13	11,3	10	9
AA	0	0,8	40	40,5
p-valor	0,290		0,432	

EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; n, número; DEFB1, gene da defensina humana-1.

Distribuição de genótipos e alelos de DEFB-1

O estudo do polimorfismo de nucleotídeo único de DEFB1 (fig. 2) mostrou que houve predomínio significativo do genótipo GG em pacientes com vitiligo em 37 (74%) e predomínio do genótipo AA nos controles ($p < 0,001$). Além disso, a presença do alelo G foi demonstrada de maneira significativa em 87 casos estudados (87%) em relação aos 10 controles

(10%), aumentando o risco de vitiligo em 60 vezes ($p < 0,001$; OR = 60,23) – tabela 3.

Relação entre os níveis séricos de HBD-1 e seus genótipos

O nível sérico de HBD-1 mostrou associação não significativa com os genótipos de DEFB-1 em pacientes com vitiligo ($p = 0,611$) e no grupo controle ($p = 0,716$) – tabela 4.

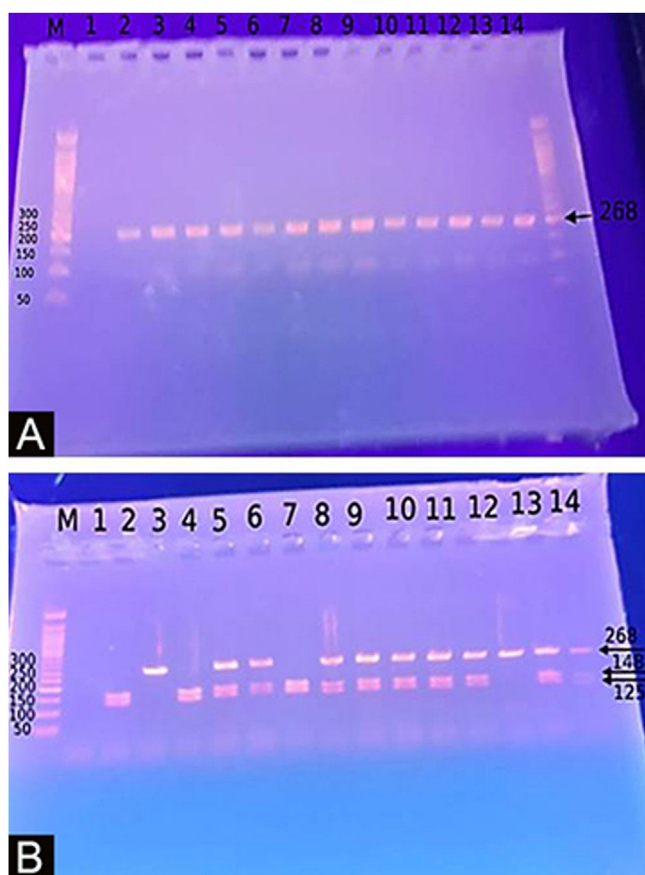


Figura 2 (A) Imagens de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR: 268 pb. (B) Imagens de eletroforese em gel de agarose para SNPs de DEFB1 G20A, genótipo AA: 268 pb, genótipo GG: 143 pb, 125 pb, genótipo AG.

Relação entre genótipos de DEFB-1 e parâmetros pessoais e clínicos estudados de pacientes com vitiligo

Os genótipos DEFB-1 mostraram associação não significativa com os dados pessoais e clínicos estudados de pacientes com vitiligo ($p > 0,05$ para todos; dados não mostrados).

Discussão

A reação Th17 é descrita pela elicitação de AMPs por meio da sinalização de IL-17A, IL-22 e IL-17F, resultando em inflamação localizada. Os AMPs que incluem HBD-1, são capazes de exercer quimioatração de células dendríticas imaturas, células T e neutrófilos diretamente via sinalização de CCR6 e indiretamente por meio da indução de HBD-3.²² Na existência de sinais de ameaça (como estresse oxidativo e níveis extraordinários de IL-6, IL-8, bem como proteína de choque térmico 70), essa quimioatração pode promover a apresentação de autoantígenos, resultando em despigmentação.^{23,24}

Portanto, era esperada regulação positiva da concentração de HBD-1 circulante em pacientes com vitiligo em comparação com seus pares. No entanto, no presente estudo, foram observados níveis séricos de HBD-1 significativamente mais baixos em casos de vitiligo em comparação aos controles.

Confirmando esse resultado inesperado, Ochoa-Ramírez et al.²⁵ investigaram 171 pacientes mexicanos com VNS. Eles notaram que a HBD-1 tinha concentrações estimadas mais baixas em pacientes com VNS do que nos controles. Além disso, os autores descobriram que os casos com vitiligo ativo tinham concentrações de HBD-1 mais baixas do que aqueles com doença estável, propondo que os níveis baixos de HBD-1 circulante estejam ligados à atividade do vitiligo. Além disso, no diabetes tipo 1 (DM1), doença mediada por CD8+ CTLs, os níveis circulantes de HBD-1 foram relatados como significativamente mais baixos do que no grupo controle.¹⁶⁻¹⁸

Em relação ao DM1, um possível esclarecimento para esse resultado é que a ativação extrema do subgrupo de células T citotóxicas CD8+, característica do DM1, afeta negativamente a HBD-1.²⁶ Além disso, a sinalização da insulina é importante para a expressão ideal de HBD-1 por meio do aumento das concentrações intracelulares da glicose e da mediação da expressão gênica.²⁷

No entanto, no vitiligo, é sugerido que a subpopulação de células CTL CD8+ dérmicas possa ser responsável pela produção local e regulação positiva local de HBD-1 que participa do processo inflamatório e despigmentação localizada da pele, sem qualquer efeito sistêmico nos níveis de HBD-1. Além disso, é sugerido que a HBD-1 possa ser transferida da corrente sanguínea para a pele com vitiligo induzindo a despigmentação, e que essa transferência tenha resultado em seus níveis séricos mais baixos.

Tabela 3 Distribuição percentual de genótipos e alelos de DEFB-1 em pacientes com vitiligo e grupo controle

Genótipos de DEFB-1	Pacientes (n = 50) n (%)	Controles (n = 50) n (%)	χ^2	p-valor	OR (IC95%)
GG	37 (74,0)	0	77,39	< 0,001 ^a	-
AG	13 (26,0)	10 (20,0)			-
AA	0	40 (80,0)			
Alelos	(n = 100)	(n = 100)	118,69	< 0,001 ^a	60,23 (25,10-144,56)
G	87 (87,0)	10 (10,0)			
A	13 (13,0)	90 (90,0)			

DEFB-1, defensina humana-1; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; χ^2 , teste do qui-quadrado; n, número.

^aSignificante.

Tabela 4 Nível sérico de HBD-1 em relação aos genótipos de beta-defensina humana-1 em pacientes com vitiligo e grupo controle

Genótipos de DEFB-1	Níveis séricos de HBD-1 (ng/mL)	
	Pacientes (n = 50) Média ± DP	Controles (n = 50) Média ± DP
GG	10,82 ± 4,47	-
AG	12,08 ± 5,44	45,23 ± 5,88
AA	-	46,85 ± 7,00
Teste de Mann-Whitney	0,51	0,36
p-valor	0,611	0,716

HBD-1, beta-defensina humana-1; n, número; DEFB-1, gene da defensina humana-1.

Confirmando a presente hipótese sobre os efeitos inflamatórios locais da HBD-1, Polesello et al.¹⁸ e Ozlu et al.¹⁹ demonstraram aumento de HBD-1 na saliva e em biópsias de pele em pacientes com líquen plano oral e psoríase, respectivamente. Portanto, estudos para avaliar simultaneamente os níveis sistêmicos e teciduais de HBD-1 são recomendados.

Outra explicação para os baixos níveis de HBD-1 demonstrados atualmente em casos de vitiligo pode ser o fato de que a HBD tem função anti-inflamatória sistêmica.¹⁰ Recentemente, foi levantada a hipótese de que a HBD-2 poderia suprimir as secreções, mediadas por células dendríticas, de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-12 e TNF- α na doença inflamatória intestinal (DII),²⁸ bem como diminuir IL-6 e TNF- α em tecidos pulmonares.²⁹ Além disso, a HBD-3 reduz a secreção de IL-6 e IL-8, mostrando potencial promissor como terapia adjuvante para o tratamento de periodontite inflamatória.⁹

Assim, é possível que no vitiligo, a HBD-1 poderia atuar como peptídeo anti-inflamatório, e os baixos níveis séricos de HBD-1 demonstrados em pacientes com vitiligo podem ser traduzidos em atividade anti-inflamatória reprimida. Portanto, mais estudos sobre a HBD-1 são necessários para verificar essa hipótese.

No presente estudo, foi observado que os níveis séricos de HBD-1 não foram afetados por nenhuma característica pessoal ou clínica avaliada nos pacientes com vitiligo. Esse resultado está de acordo com os de Ochoa-Ramírez et al.,²⁵ que observaram associação não significativa entre os níveis séricos de HBD-1 e as características clínicas do vitiligo.

O gene DEFB1 (localizado no cromossomo 8p22) consiste em dois éxons. O primeiro codifica a pró-sequência e o sinal, ricos em leucina. O segundo éxon, no entanto, codifica o peptídeo maduro.⁷ Os SNPs desse gene podem ocorrer em diferentes locais das 50 regiões não codificadoras do primeiro éxon,²⁶ incluindo -52G > A (rs1799946), -44C > G (rs1800972) e -20G > A (rs11362).¹⁸

O presente trabalho analisou o polimorfismo dos genótipos -20G/A (rs11362) da DEFB1. Foi observada predominância significativa do genótipo GG DEFB1 (-20G/A) em pacientes com vitiligo em comparação com os controles, bem como do alelo G, o que aumentou a possibilidade de ocorrência de vitiligo em cerca de 60 vezes. Entretanto, nos controles foi demonstrado que o genótipo DEFB1 (-20G/A) AA e o alelo A eram significativamente frequentes e considerados de valor protetivo.

Em consonância com esse resultado, Ochoa-Ramírez et al.²⁵ observaram que houve predominância do genótipo GG na posição 20 em pacientes com vitiligo em relação aos controles. Além disso, Salem et al.³⁰ estudaram 50 pacientes egípcios com VNS e demonstraram que o genótipo AA do gene DEFB1 (-20G/A) e o alelo A tinham frequências significativamente mais baixas em pacientes com vitiligo e exerciam um efeito protetor contra o desenvolvimento da doença.

Além disso, na dermatite atópica (uma doença inflamatória mediada por células T), de Oca et al.³¹ descobriram que o genótipo -20 GG representa fator de risco genético para o desenvolvimento de dermatite atópica. Por outro lado, na DII (doença imuno-inflamatória), Zanin et al.³² relataram que os pacientes com DII apresentavam alelo G mais frequentemente do que os controles. Entretanto, no lúpus eritematoso sistêmico (LES), que é uma doença autoimune, Sandrin et al.³³ relataram que o genótipo AA e seu alelo A apresentaram frequências menos significantes no grupo de pacientes em relação ao grupo controle, mostrando efeitos protetores.

Certos polimorfismos do gene da DEFB1 podem afetar a atividade de transcrição da DEFB1 e conseqüentemente a expressão da proteína HBD-1. De fato, polimorfismos na região 50 não traduzida do gene da DEFB1 alteram o sítio de ligação do fator de transcrição putativo para a subunidade p105 do fator nuclear-KB, resultando na expressão da proteína HBD1.¹⁸

No presente estudo, os níveis séricos de HBD-1 não foram significativamente afetados pelo SNP do gene da DEFB1, tanto em pacientes com vitiligo quanto no grupo controle. Em apoio a esse resultado, Ochoa-Ramírez et al.²⁵ observaram associação não significativa entre as concentrações séricas de HBD-1 e os genótipos de DEFB1.

Entretanto, na DII, Zanin et al.³³ relataram que a localização da doença de Crohn colônica estava ligada à expressão deficiente de HBD-1, pois o alelo (c.-20G/A) A parece estar relacionado a níveis reduzidos de expressão local de HBD-1. Os autores concluíram que o polimorfismo do gene da DEFB1 pode causar menor expressão de HBD-1 em células epiteliais do cólon. O mecanismo patogênico diferente do vitiligo e da doença de Crohn, bem como o tamanho da amostra diferente entre aquele estudo (n = 145) e o presente estudo (n = 50) podem explicar a diferença.

No presente estudo foi observado que os genótipos de DEFB1 não tiveram efeitos significantes em nenhuma das

características pessoais estudadas ou dados clínicos dos pacientes com vitiligo estudados (idade, sexo, duração da doença e escore VASI). Confirmando esse estudo, Ochoa-Ramírez et al.²⁵ observaram associação não significativa entre os genótipos de DEFB1 e os dados clínicos estudados de casos de VNS.

Entretanto, o estudo de Salem et al.³⁰ estava parcialmente de acordo com esses resultados. Eles demonstraram diferença não significativa na distribuição dos genótipos de DEFB1 (–20G/A) em relação à história e achados clínicos diferentes, exceto para o escore VASI médio. Eles descobriram que os portadores do genótipo AA estavam associados a escores VASI significativamente mais baixos. Essa diferença pode ser decorrente do pequeno tamanho da amostra em cada estudo (n = 50 pacientes com VNS) e/ou diferentes critérios de seleção dos casos investigados, pois eles estudaram apenas pacientes com VNS ativo, enquanto o presente estudo avaliou pacientes com VNS independentemente da atividade da doença.

As limitações do presente estudo foram a) o pequeno número de casos investigados, b) sua estrutura (estudo de caso controle) e c) avaliação de apenas um único marcador inflamatório em vez de múltiplos marcadores.

Conclusões

Parece que o polimorfismo do gene da DEFB1 em –20 pode modular o risco de desenvolvimento de vitiligo, pois o genótipo GG DEFB1 (–20G/A) e o alelo G contribuem para o desenvolvimento de vitiligo em populações egípcias. A diminuição dos níveis circulantes de HBD-1 pode ter papel ativo na etiopatogenia do vitiligo, que pode ser mediada por seus possíveis efeitos anti-inflamatórios.

Suporte financeiro

Nenhum.

Contribuição dos autores

Todos os autores devem ter feito contribuições substanciais para todos os itens a seguir.

Azza Gaber Antar Farag: Revisão crítica da literatura; concepção e planejamento do estudo; aprovação da versão final do manuscrito.

Mohamed Abd Al Moneam Shoaib: Concepção e planejamento do estudo; aprovação da versão final do manuscrito.

Azza Zagloul labeeb: Obtenção, análise e interpretação dos dados; aprovação da versão final do manuscrito.

Asmaa Shaaban Sleem: Interpretação dos dados; aprovação da versão final do manuscrito.

Hagar Mahmoud AbdElkader Khallaf: Obtenção de dados; aprovação da versão final do manuscrito.

Amany Salah Khalaf: Análise e interpretação dos dados; aprovação da versão final do manuscrito.

Mustafa Elsayed Elshaib: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito.

Nada Farag Elnaidany: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito.

Hayam Mohamed Aboelnasr Hanout: Planejamento do estudo; aprovação da versão final do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Agradecimentos

Todos os autores agradecem às equipes administrativas e técnicas do Ambulatório de Dermatologia e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Menoufia University, que gentilmente ajudaram ao longo deste estudo.

Referências

1. Abdel-Malek ZA, Jordan C, Ho T, Upadhyay PR, Fleischer A, Hamzavi I. The enigma and challenges of vitiligo pathophysiology and treatment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020;33:778–87.
2. Das D, Akhtar S, Kurra S, Gupta S, Sharma A. Emerging role of immune cell network in autoimmune skin disorders: an update on pemphigus, vitiligo, and psoriasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;45:35–44.
3. Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2011;20:228–35.
4. Jarczak J, Kościuczuk EM, Lisowski P, Strzałkowska N, Józwiak A, Horbańczuk J, et al. Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum Immunol.* 2013;74:1069–79.
5. Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 1995;368:331–5.
6. Machado LR, Ottolini B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Front Immunol.* 2015;18:6–115.
7. Semple F, Dorin JR. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun.* 2012;4:337–48.
8. Seo EJ, Weibel S, Wehkamp J, Oelschlaeger TA. Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins. *Int J Med Microbiol.* 2012;302:276–87.
9. Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One.* 2014;9:e106766.
10. Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, Na C, Granstein RD, McInturf JE, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J Immunol Res.* 2007;178:1829–34.
11. Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1: A restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:800–4.
12. Fruitwala S, El-Naccache DW, Chang TL. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;88:163–72.
13. Raschig J, Mailänder-Sánchez D, Berscheid A, Berger J, Strömstedt AA, Courth LF, et al. Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006261.
14. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a β -defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet.* 2003;73:591–600.

15. Kreuter A, Jaouhar M, Skrygan M, Tigges C, Stücker M, Altmeyer P, et al. Expression of antimicrobial peptides in different subtypes of cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65:125–33.
16. Brauner H, Lüthje P, Grünler J, Ekberg NR, Dallner G, Brismar K, et al. Markers of innate immune activity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the effect of the anti-oxidant coenzyme Q10 on inflammatory activity. *Clin Exp Immunol*. 2014;177:478–82.
17. Huang XX, Gao CY, Zhao QJ, Li CL. Antimicrobial characterization of site-directed mutagenesis of porcine beta defensin 2. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118170.
18. Polesello V, Zupin L, Di Lenarda R, Biasotto M, Pozzato G, Ottaviani G, et al. DEFB1 polymorphisms and salivary hBD-1 concentration in oral lichen planus patients and healthy subjects. *Arch Oral Biol*. 2017;73:161–5.
19. Ozlu E, Karadag AS, Ozkanti S, Oguztuzun S, Akbulak O, Uzun-cakmak TK, et al. The investigation of antimicrobial peptides expression and its related interaction with methotrexate treatment in patients with psoriasis vulgaris. *Cutan Ocul Toxicol*. 2017;36:321–6.
20. Hamzavi I, Jain H, McLean D, Shapiro J, Zeng H, Lui H. Parametric modeling of narrowband UV-B phototherapy for vitiligo using a novel quantitative tool: the Vitiligo Area Scoring Index. *Arch Dermatol*. 2004;140:677–83.
21. Dörk T, Stuhmann M. Polymorphisms of the human β -defensin-1 gene. *Mol Cell Probes*. 1998;12:171–3.
22. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203:2271–9.
23. Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, De la Rosa G, Oppenheim JJ. Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des*. 2007;13:3131–9.
24. Manga P, Elbuluk N, Orlov SJ. Recent advances in understanding vitiligo. *F1000 Research*. 2016;5:29–34.
25. Ochoa-Ramírez LA, Becerra-Loaiza DS, Díaz-Camacho SP, Muñoz-Estrada VF, Ríos-Burgueño ER, Prado-Montes de Oca E, et al. Association of human beta-defensin 1 gene polymorphisms with nonsegmental vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 2019;44:277–82.
26. Yang L, Wei Y, Sun Y, Shi W, Yang J, Zhu L, et al. Interferon- γ inhibits melanogenesis and induces apoptosis in melanocytes: a pivotal role of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in vitiligo. *Acta Derm Venereol*. 2015;95:664–70.
27. Barnea M, Madar Z, Froy O. Glucose and insulin are needed for optimal defensin expression in human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367:452–6.
28. Koeninger L, Armbruster NS, Brinch KS, Kjaerulf S, Andersen B, Langnau C, et al. Human β -defensin 2 mediated immune modulation as treatment for experimental colitis. *Front. Immunol*. 2020;11:93.
29. Shen Z, Zhou Y, Qu L, Lei H. ATP serves an anti-inflammatory role by enhancing β -defensin-2 response in acute pneumonia of rat. *Biomed Rep*. 2017;6:649–53.
30. Salem RM, Abdelrahman AMN, Abd El-Kareem HM, Seif M. DEFB1 gene polymorphisms modify vitiligo extent and response to NB-UVB phototherapy. *Dermatol Ther*. 2021;34:1492–9.
31. de Oca EMP, García-Vargas A, Lozano-Inocencio R, Gallegos-Arreola MP, Sandoval-Ramírez L, Dávalos-Rodríguez NO, et al. Association of β -defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142:211–8.
32. Zanin V, Segat L, Bianco AM, Padovan L. DEFB1 gene 5' untranslated region (UTR) polymorphisms in inflammatory bowel diseases. *Clinics*. 2012;67:395–8.
33. Sandrin-Garcia P, Brandão LA, Guimarães RL, Pancoto JA, Donadi EA, Lima-Filho JD, et al. Functional single-nucleotide polymorphisms in the DEFB1 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians. *Lupus*. 2012;21:625–31.