

TEZĂ DE DOCTORAT

Studiu investigativ și terapeutic în alopecia areata-REZUMAT

Doctorand **Simona Corina Șenilă**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE IN TEXT	11
INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Alopecia areata	17
1.1. Aspecte clinice.....	17
1.2. Aspecte patogenetice.....	19
1.2.1. Factorii genetici.....	19
1.2.2. Colapsul privilegiului imun al foliculului pilar.....	20
1.2.3. Autoimunitatea și AA.....	20
1.2.3.1. Rolul autoantigenelor.....	20
1.2.3.2. Rolul inflamației peribulbare, citokinelor, chemokinelor și chemotaxiei.....	21
1.2.3.3. Rolul celulelor NK.....	21
1.2.4. Influența mediului în alopecia areata.....	22
1.3. Tratamentul în alopecia areata.....	23
1.3.1. Tratamentul local.....	23
1.3.1.1. Corticoterapia topică.....	23
1.3.1.2. Corticoterapia intralezională.....	24
1.3.1.3. Imunoterapia topică (de contact).....	24
1.3.1.4. Minoxidilul.....	25
1.3.1.5. Antralina (dithranol).....	25
1.3.1.6. Inhibitorii de calcineurină.....	25
1.3.1.7. PUVA-terapia.....	26
1.3.1.7. Laserterapia.....	26
1.3.2. Tratamentul sistemic în alopecia areata.....	26
1.3.2.1. Corticosteroizii sistemici.....	26
1.3.2.1.1. Corticosteroizi administrați oral.....	26
1.3.2.1.2. Corticosteroizii administrați intravenos sub formă de pulsterapie.....	27
1.3.2.2. Ciclosporina.....	29
1.3.2.3. Metotrexatul.....	29
1.3.2.4. Azatioprina.....	30
1.3.2.5. Sulfasalazina.....	30
1.4. Alopecia areata și stresul: ipoteza neuroendocrin-imună.....	31
1.4.1. Efectul mediatorilor de stres asupra foliculului pilar.....	32
1.4.1.1. Rolul substanței P (SP) și a factorului de creștere nervos (NGF).....	32
1.4.1.2. Rolul hormonilor de stres.....	33
1.4.2. Efectul mediatorilor de stres în alopecia areata.....	33
1.5. Privilegiul imun în patogeneza alopeciei areata.....	35
1.5.1. Conceptul privilegiului imun.....	35
1.5.2. Privilegiul imun al foliculului pilar.....	35
1.5.3. Pierderea privilegiului imun în alopecia areata.....	36

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	37
1. Ipoteza de lucru/obiective.....	39
2. Rolul pulsterapiei cu metilprednisolon în formele severe de alopecie areata	41
2.1. Introducere.....	41
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	41
2.3. Material și metodă.....	42
2.4. Rezultate	43
2.5. Discuții	57
2.6. Concluzii.....	60
3. Modificări moleculare în alopecia areata.....	63
3.1. Introducere.....	63
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	68
3.3. Material și metodă.....	68
3.4. Rezultate	72
I. Modificările expresiei genice a factorilor asociați privilegiului imun (IGF-1, IDO1 și red/IK) și a celor implicați în inflamația neurogenă (CRH și NEP) la pacienții cu alopecie areata și biopsii pereche (Grupul A).....	72
II. Modificările expresiei genice a factorilor asociați privilegiului imun (IGF-1, IDO1 și red/IK) și a celor implicați în inflamația neurogenă (CRH și NEP) la pacienții cu alopecie areata și biopsie lezională (Grupul B).....	76
3.5. Discuții	87
3.6. Concluzii	92
4. Concluzii generale	93
5. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....	95
 REFERINȚE.....	 97
 ANEXE	 109

CUVINTE CHEIE: alopecia areata, pulsterapie, corticosteroizi, privilegiu imun, inflamație neurogenă, expresie genică

INTRODUCERE

Alopecia areata este o afecțiune inflamatorie non-cicatricială a foliculului pilar. Alături de alopecia androgenetică și efluviumul telogen, reprezintă una din cele mai întâlnite cauze de cădere a părului la persoanele tinere. Limitată la zone alopecice circumscrise, distribuite la nivelul scalpului sau extinse pe întreaga suprafață a scalpului și corpului, evoluează de obicei cronic, imprevizibil, cu remisiuni și recăderi și asociază un puternic impact psiho-emoțional cu afectarea calității vieții.

Deși este cunoscută încă din antichitate, fiind descrisă de Hippocrate și Celsus atât la oameni cât și la unele animale cu blană iar în ultimele decenii s-au făcut progrese importante în deslușirea proceselor biologice care conduc la apariția leziunilor alopecice, alopecia areata continuă să rămână o afecțiune cu un mecanism etiopatogenetic neclar. Această neclaritate ar putea fi datorată mai multor cauze: la momentul prezentării pacientului cu leziuni clinic evidente, factorul sau factorii declanșatori nu mai pot fi identificați, căderea firelor de păr se produce în câteva zile sau săptămâni iar variabilitatea de evoluție a unei singure leziuni și a bolii în general, este foarte mare.

Un aspect particular în alopecia areata este capacitatea de regenerare a foliculului pilar. Această observație a fost mult mai bine înțeleasă după identificarea și caracterizarea privilegiului imun. Acest statut imunologic, atunci când este păstrat, protejează foliculul pilar în faza anagenă de agresiunea imună indusă de diverși factori trigger și se datorează unui micromediu imunosupresor local. Cascada de evenimente biologice care determină apariția inflamației perifoliculare și implicit apariția leziunilor clinice în alopecia areata, este incomplet elucidată și justifică efectuarea unor studii la nivel molecular care să caracterizeze cât mai acurat rolul și activitatea unor molecule care intervin în menținerea, colapsul și ulterior în restaurarea privilegiului imun. Legătura între alopecia areata și prezența stresului psiho-emoțional este un subiect mult discutat în literatură, cu opinii diferite. În acest context, am considerat oportună și necesară evaluarea moleculară a mediatorilor de stres și căutarea eventualelor corelații cu factori asociați privilegiului imun, care ar putea arăta legătura directă între apariția bolii la pacienți predispuși genetic și prezența stresului.

Abordarea terapeutică în alopecia areata este de multe ori o alegere dificilă, atât pentru medic cât și pentru pacient. În contextul în care nu există deocamdată un tratament etiologic, definitiv, pentru acești pacienți, utilizarea medicației imunosupresoare actual disponibile se însoțește de răspuns terapeutic imprevizibil și inconstant. Din acest motiv, pentru cazurile severe de alopecie areata (forma în plăci multiple rapid progresive, AAT sau AAU), care impun terapie sistemică în încercarea de a opri căderea părului, respectiv obținerea regenerării, aprecierea raportului risc/beneficiu este extrem de importantă. Este necesară efectuarea unui studiu observațional prospectiv care să identifice pacienții cu alopecie areata cu cele mai mari beneficii în ceea ce privește eficiența și siguranța terapiei sistemice. În acest context, am considerat oportun să realizăm un astfel de studiu care să evalueze rolul pulsterapie cu metilprednisolon la pacienți cu forme severe de alopecie areata.

Am dorit ca prin cele două studii efectuate să contribuim la o mai bună înțelegere a proceselor moleculare implicate în această afecțiune, respectiv la o îmbunătățire a criteriilor de selecție pentru terapia sistemică a pacienților cu forme severe de boală.

Studiul 1. Rolul pulsterapieii cu metilprednisolon în formele severe de alopecie areata

Alopecia areata este o afecțiune inflamatorie autoimună a foliculului pilar cu evoluție cronică. În formele severe, extensive, conduce la pierderea părului de pe întregul scalp și corp cu impact psiho-emoțional extrem de important. Întrucât în formele severe regenerarea spontană sau chiar terapeutică rămâne de cele mai multe ori un deziderat ne-am propus să evaluăm rolul pulsterapieii cu metilprednisolon având următoarele obiective: 1. evaluarea eficienței terapeutice a metilprednisolonului administrat sub forma de pulsterapie la pacienți cu forme severe de alopecie areata; 2. evaluarea siguranței pulsterapieii; 3. identificarea unor factori care pot influența rezultatul terapeutic pe termen lung, factori care să se constituie în criterii clinice de eligibilitate pentru pulsterapia cu metilprednisolon în cazul pacienților cu forme severe de alopecie areata.

Material și metodă

În studiul prospectiv necontrolat efectuat între anii 2008 și 2012 în Clinica Dermatologie Cluj-Napoca au participat 32 de pacienți cu alopecie areata severă. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca. Criteriile de includere ale pacienților în studiu au fost următoarele: a) prezența unei forme severe de boală: alopecie areata în plăci activă care afectează mai mult de 40% din suprafața scalpului (AAP), alopecie totală (AAT) sau alopecie universală (AAU); b) absența contraindicațiilor pentru tratamentul sistemic cu corticosteroizi. Anamnestic, pacienții au avut o evoluție clinică nefavorabilă cu extensia leziunilor inițiale sau apariția altora noi sub tratamentele locale anterior efectuate: corticoizi topici sau intralezional, imunoterapie locală cu diphenylciclopropenona, minoxidil sau antralină. Pentru fiecare pacient inclus în studiu s-au efectuat anamneza și examenul clinic complet, urmat de electrocardiogramă și evaluarea bio-umorală cu scopul de a depista eventuale modificări care ar fi contraindicat tratamentul sistemic cu corticosteroizi (infecții, tulburări metabolice sau cardiace) sau evidențierea unor afecțiuni autoimune asociate.

Protocolul terapeutic a constat în administrarea intravenoasă a 500 mg metilprednisolon pe zi, 3 zile consecutiv pe lună, 3 luni consecutiv. Pentru pacienții sub 18 ani s-au administrat 6 mg/kgc/zi. Pe durata perfuziei endovenoase, pacienții au fost supravegheați pentru eventuale reacții adverse și monitorizați prin măsurarea pulsului și a tensiunii arteriale. Ulterior, pe toată durata celor 12 luni de urmărire, pacienții au beneficiat de contact telefonic cu medicul curant pentru a putea raporta eventuale reacții adverse tardive sau modificări în starea clinică ce nu au fost prezente și implicit consemnate cu ocazia vizitelor de evaluare.

Răspunsul la tratament a fost evaluat inițial lunar cu ocazia fiecărei administrări, (fiind consemnate prezența regenerării pilare precum și oprirea extinderii leziunilor existente și apariția de leziuni noi), ulterior la interval de 3, 6 și 12

luni de la terminarea tratamentului. Pentru forma în plăci am evaluat regenerarea pilară cu fire de păr terminal în zonele inițial alopecice de la nivelul scalpului, iar pentru formele totale sau universale apariția firelor de păr terminal pe scalp, respectiv a genelor, sprâncenelor și de pe suprafața corpului. Pentru o documentare mai riguroasă s-au efectuat fotografiile în aceleași condiții tehnice. Regenerarea pilară cu fire de păr terminal a fost evaluată astfel: 100% regenerare completă, între 50-99% regenerare semnificativă cosmetic acceptabilă și între 1-49% regenerare minimă. A fost considerată recidivă pierderea a 25% din părul inițial regenerat și a fost consemnată la evaluarea de 6 și 12 luni. S-a evaluat nivelul regenerării pilare în funcție de următoarele variabile clinice: genul și vârsta pacienților, vârsta la debutul bolii, forma clinică de boală, tratamentul efectuat la primul episod de boală, debutul bolii în zona occipitală, afecțiuni asociate, durata puseului actual (3-6 luni, 7-12 luni, peste 12 luni), durata bolii (sub 1 an și peste 1 an).

Rezultate

Din cei 32 de pacienți incluși în studiu, 12 (37,50%) au fost de sex masculin și 20 (62,50%) de sex feminin. Pacienții au avut vârste cuprinse între 4 și 59 ani cu o medie a vârstei egală cu 26,16 ani. Vârsta medie de debut a bolii a fost de 21,81 ani. Durata medie de boală a fost de 4,34 ani iar durata medie a ultimului puseu a fost de 12 luni. Din cei 32 de pacienți incluși în studiu, 22 (68,75%) au prezentat forma de alopecie areata în plăci multiple (AAP), 2 pacienți (6,25%) forma totală (AAT) și 8 pacienți (25%) forma universală (AAU). În urma investigațiilor paraclinice efectuate am identificat 4 pacienți (12,50%) cu tiroidită Hashimoto și hipotiroidism, 2 pacienți (6,25%) cu tiroidită Hashimoto, 1 pacient (3,13%) cu lupus eritematos cronic și 1 pacient (3,13%) cu hipotiroidism și hipogonadism. La finalul celor 3 luni de tratament am urmărit și evaluat două aspecte clinice importante pentru pacient și medic: oprirea extinderii leziunilor existente (oprirea căderii părului) și apariția de leziuni noi pe parcursul celor 3 luni de tratament. Din totalul de 32 pacienți, s-a observat oprirea căderii părului la 18 pacienți (56,25%). Pe parcursul celor trei luni de tratament, doar 8 pacienți (25%) au prezentat leziuni alopecice noi din cei 32 pacienți incluși în studiu. Comparând apariția de leziuni noi cu oprirea căderii părului s-a observat că la pacienții la care nu au apărut leziuni noi la terminarea tratamentului, oprirea căderii părului a fost prezentă în proporție mai mare (75%). Diferența între grupuri a fost semnificativă statistic ($p=0,0003$). La finalul celor 12 luni de urmărire clinică am observat următoarele: la 26 (81,25%) din cei 32 de pacienți incluși în studiu am observat un răspuns clinic. Astfel, 4 pacienți (12,50%) au prezentat regenerare completă, 6 pacienți (18,75%) au prezentat regenerare semnificativă și 10 pacienți au prezentat regenerare minimă (31,25%). Un număr de 6 pacienți (18,75%) nu au avut nici un răspuns clinic. Din cei 26 de pacienți care au prezentat inițial regenerare pilară în diverse proporții, la 6 (18,75%) afecțiunea a recidivat.

Pacienții tratați la primul puseu au avut un răspuns terapeutic mai bun decât pacienții cu istoric anterior de boală. Diferența între cele două grupuri a fost statistic semnificativă ($p<0,05$). Comparând răspunsul la tratament între pacienții cu forme clinice diferite de boală am observat că pacienții cu alopecie areata în plăci (AAP) au avut un răspuns mai bun la tratament decât cei cu alopecie totală (AAT) sau alopecie

universală (AAU), diferență semnificativă statistic ($p < 0,05$). Prezența leziunilor alopecice occipitale la debutul bolii a influențat rezultatul terapeutic la vizita de 3 luni cu diferență semnificativă statistic ($p = 0,04$), pacienții din acest grup având o regenerare mai redusă decât ceilalți pacienți. Alți parametrii clinico-evolutivi nu au influențat semnificativ statistic răspunsul terapeutic.

Concluzii

Prin rezultatele obținute, studiul de față subliniază importanța intervenției terapeutice sistemice în cazul pacienților cu forme severe de alopecie areata.

1. Pulsterapia cu metilprednisolon trebuie utilizată la pacienții cu AA în plăci multiple care se extind rapid, cu scopul de a limita progresia bolii. Studiul actual arată o asociere pozitivă semnificativă statistic între rezultatul terapeutic și forma în plăci rapid extensive.

2. Efectuarea pulsterapiei la primul puseu se asociază pozitiv semnificativ statistic cu rezultate terapeutice superioare. Cu cât durata puseului, respectiv durata bolii se prelungesc, șansele de regenerare se reduc.

3. Pentru pacienții care dezvoltă rapid forme de tipul AAT sau AAU, pulsterapia este o alternativă terapeutică ce trebuie discutată cu pacientul întrucât rezultatul terapeutic este de multe ori nesatisfăcător pentru acesta.

4. Cu toate că datele noastre arată că la sfârșitul tratamentului extinderea leziunilor existente este oprită și apariția de leziuni noi este limitată, acest lucru nu conferă o garanție pentru un rezultat terapeutic acceptabil cosmetic în viitor, după cum am arătat la grupul cu debut al bolii sub 18 ani.

5. Deși studiul nostru nu a raportat decât reacții adverse minime, tranzitorii și care nu au necesitat întreruperea medicației, pledăm pentru o evaluare riguroasă a raportului risc/beneficiu mai ales la pacienți tineri, cu debutul bolii în copilărie sau la pacienți cu AAT sau AAU cu evoluție lungă, la care rezultatele terapeutice sunt nesatisfăcătoare.

6. În urma analizei multivariate a răspunsului clinic, în studiul de față au fost identificate 3 criterii clinice de eligibilitate pentru pulsterapia cu metilprednisolon la pacienții cu alopecie areata. Astfel, forma clinică în plăci multiple rapid extensivă, efectuarea tratamentului la primul puseu respectiv absența afectării occipitale s-au asociat pozitiv semnificativ statistic cu nivelul regenerării pilare.

7. Rezultatele studiului nostru, concordante cu datele publicate până în prezent în ceea ce privește selecția pacienților cu alopecie areata pentru pulsterapie, pot constitui un cadru clinic de orientare pentru alegerea modalităților terapeutice optime pentru pacientul cu forme severe de alopecie areata.

Studiul 2. Modificări moleculare în alopecia areata

Privilegiul imun al firului de păr este recunoscut ca un mecanism care protejează acest miniorgan de efectele dăunătoare ale imunității innăscute sau dobândite. Dintre multiplele ipoteze patogenetice formulate până în prezent, una sugerează că AA este consecința pierderii privilegiului imun. Pacienții cu o predispoziție genetică specifică sunt susceptibili de a dezvolta boala cel mai probabil

prin scăderea activității mediului imunosupresor care menține privilegiul imun al foliculului pilar nealterat. În acest proces intervin citokine care reduc expresia antigenelor complexului major de histocompatibilitate de tip I (IGF-1) și II (red/IK) precum și molecule cu rol imunosupresiv local induse de prezența IFN- γ (IDO1). Rolul stresului fizic sau psiho-emoțional în patogeneza AA este discutat în ultimii ani în literatură, odată cu demonstrarea faptului că substanța P eliberată din terminațiile nervoase perifoliculare în condiții de stres poate determina colapsul privilegiului imun și apariția inflamației neurogene perifoliculare.

Având în vedere mecanismul patogenetic complex din alopecia areata, studiul de față își propune să evalueze următorii factori asociați cu menținerea sau restaurarea privilegiului imun al firului de păr (IDO1, IGF-1, red/IK și α -MSH) respectiv factori implicați în inflamația neurogenă care se activează în condiții de stres fizic sau psiho-emoțional (CRH, NGF, Substanța P, NEP).

Material și metodă

Probe biologice. Pentru a evalua nivelul expresiei genice s-au prelevat biopsii cutanate de la nivelul scalpului la pacienți cu alopecie areata și martori sănătoși. Studiul a fost aprobat de către Comisia de Etică a Spitalului Clinic Judetean de Urgență Cluj și s-a desfășurat în cadrul Clinicii Dermatologie Cluj-Napoca în colaborare cu Departamentul de genomică funcțională, proteomică și patologie experimentală din cadrul Institutului Oncologic Cluj-Napoca. Atât pacienții cât și martorii sănătoși au semnat consimțământul informat. După recoltare, probele au fost rapid înghețate și conservate în azot lichid la -80°C . Au fost incluși în studiu 39 pacienți cu alopecie areata (formă ușoară-sub 10% scalp afectat și formă severă-peste 40% scalp afectat) și 11 martori sănătoși ca lot de referință sau control. Cei 39 de pacienți au fost împărțiți în două grupuri:

1. Grupul A format din 7 pacienți care au acceptat biopsia pereche, astfel că pe lângă biopsia efectuată din marginea activă a plăcii alopecice (zona lezională) s-a efectuat o a doua biopsie la 2 cm de marginea activă acolo unde testul de epilare la tracțiune ușoară a fost negativ (zona perilezională);

2. Grupul B format din 32 pacienți cu biopsie din zona lezională.

Extracția și purificarea ARN-ului total. Pentru extracția ARN-ului s-a utilizat metoda clasică descrisă de Chomczynski și colab. și kitul de extracție Tri Reagent[®] (Sigma – Aldrich). ARN-ul extras a fost purificat cu kitul RNeasy (Qiagen) și evaluat cantitativ și calitativ cu spectrofotometrul NanoDrop ND-1000 și bioanalizorul Agilent 2100. S-au utilizat numai probele de ARN cu RIN (RNA integrity number) mai mare de 6,5. Obținerea de ADN complementar (ADNc) s-a realizat cu ajutorul kitului FirstStrand cDNA (Roche) folosindu-se 200 ng din ARN-ul total. ADN-ul complementar astfel sintetizat, s-a utilizat ca matrită în reacția de PCR cantitativă.

Reacția de PCR cantitativă în timp real (qRT-PCR; quantitative real time PCR)

În analiza noastră am utilizat tehnologia Roche (LightCycler 480) cu primeri și sonde fluorescente UPL (Universal Probe Library) obținute în urma studiilor *in silico*. ADN-ul complementar obținut din revers-transcripția a 200 ng mRNA, a fost amplificat în plăci cu 96 de godeuri folosindu-se kitul Lightcycler Taqman Master de la firma Roche, după care s-a inițiat reacția PCR. Pentru fiecare genă analizată s-a efectuat tehnica în

triplicat. Valorile Cp mai mari de 35 cicluri sunt considerate a fi datorate unor amplificări nespecifice (rezultate fals pozitive). Pentru genele NGF, SP și α -MSH valorile punctului de inflexiune la marea majoritate a probelor a fost mai mare de 35, motiv pentru care ele au fost excluse din analiza ulterioară. Nivelul de expresie genică, *fold change (FC)*, a fost calculat prin metoda ddct, fiecare probă fiind normalizată la gena housekeeping 18S și raportată la valoarea medie a lotului de control (martor). Genele pentru care au fost îndeplinite simultan condițiile $FR > \pm 1.3$ ($FC > 1.3$) și $p < 0.05$, au fost considerate diferit exprimate între grupurile studiate.

Rezultate/Concluzii

În grupul A (biopsii pereche):

1. Nivelul expresiei genei IDO1 este crescut semnificativ statistic în zonele lezionale comparativ cu zonele perilezionale precum și în cazul pacienților cu durata puseului mai mică de 6 luni.
2. Nivelele expresiei pentru celelalte gene studiate (IGF-1, red/IK, CRH și NEP) sunt mai mari în zonele lezionale comparativ cu zonele perilezionale, dar fără a atinge pragul semnificației statistice.
3. Nivelul expresiei genei NEP în zona perilezională este crescut semnificativ statistic la pacienții cu durata puseului mai mică de 6 luni.
4. Nivelele expresiei tuturor celor 5 gene studiate nu se corelează semnificativ cu severitatea bolii.

În grupul B:

5. Nivelul expresiei genei red/IK este scăzut semnificativ statistic în zona lezională comparativ cu țesutul martor.
6. Nivelul expresiei genei CRH este crescut semnificativ statistic în zona lezională comparativ cu țesutul martor.
7. Nivelul expresiei genei IDO1 este crescut în zonele lezionale comparativ cu țesutul martor nesemnificativ statistic.
8. Nivelul expresiei genelor IGF-1 și a NEP este scăzut în zonele lezionale comparativ cu țesutul martor nesemnificativ statistic.
9. Nivele expresiei celor 5 gene studiate nu se corelează semnificativ cu caracteristicile clinico-evolutive urmărite (severitatea și durata bolii, răspunsul la tratament și prezența stresului declarat).

Studiul modificărilor moleculare, prin evaluarea nivelului expresiei genice a factorilor asociați privilegiului imun și a celor implicați în inflamația neurogenă la pacienți cu alopecie areata, a caracterizat statusul de colaps sau restaurare a privilegiului imun, respectiv participarea și corelarea cu starea de stres susținută de prezența inflamației neurogene. Cercetarea interrelației între privilegiul imun și inflamația neurogenă realizată pe cele două grupuri de pacienți este prima de acest fel în România și printre puținele publicate pe această temă la nivel mondial. Prin rezultatele obținute, susține interesul îndreptat către identificarea unor modalități de restaurare a privilegiului imun pierdut, respectiv de a contracara efectele inflamației neurogene declanșate de stres, contribuind astfel la dezvoltarea în viitor a unei terapii mai țintite și mai eficiente în alopecia areata.

PhD Thesis

An Investigative and Therapeutic Study of Alopecia Areata

Abstract

PhD Candidate: **Simona Corina Șenilă**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Alopecia areata	17
1.1. Clinical aspect	17
1.2. Pathogenetic aspects	19
1.2.1. Genetic factors	19
1.2.2. The collapse of the immune privilege of the hair follicle	20
1.2.3. Self-immunity and AA	20
1.2.3.1. The role of self-antigens	20
1.2.3.2. The role of peribulbar inflammation, cytokines, chemokines and chemotaxis	21
1.2.3.3. The role of NK cells	21
1.2.4. The influence of the environment in alopecia areata	22
1.3. Treatment in alopecia areata	23
1.3.1. Local treatment	23
1.3.1.1. Topical corticosteroid therapy	23
1.3.1.2. Intralesional corticosteroid therapy	24
1.3.1.3. Topical (contact) immunotherapy	24
1.3.1.4. Minoxidil	25
1.3.1.5. Anthralin (dithranol)	25
1.3.1.6. Calcineurine inhibitors	25
1.3.1.7. PUVA therapy	26
1.3.1.7. Laser therapy	26
1.3.2. Systemic treatment in alopecia areata	26
1.3.2.1. Systemic corticosteroids	26
1.3.2.1.1. Corticosteroids with oral administration	26
1.3.2.1.2. Intravenous pulse corticosteroid therapy	27
1.3.2.2. Cyclosporine	29
1.3.2.3. Methotrexate	29
1.3.2.4. Azathioprine	30
1.3.2.5. Sulfasalazine	30
1.4. Alopecia areata and stress: the neuroendocrine –immune hypothesis	31
1.4.1. The effect of stress mediators on the hair follicle	32
1.4.1.1. The role of substance P (SP) and nerve growth factor (NGF)	32
1.4.1.2. The role of stress hormones	33
1.4.2. The effect of stress mediators in alopecia areata	33
1.5. The immune privilege in the pathogenesis of alopecia areata	35
1.5.1. The concept of immune privilege	35

1.5.2. The immune privilege of the hair follicle	35
1.5.3. The loss of immune privilege in alopecia areata	36
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. Work hypothesis/objectives	39
2. The role of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone in the severe forms of AA	41
2.1. Introduction	41
2.2. Work hypothesis/objectives	41
2.3. Material and method	42
2.4. Results	43
2.5. Discussions	57
2.6. Conclusions	60
3. Molecular modifications in alopecia areata	63
3.1. Introduction	63
3.2. Work hypothesis/objectives	68
3.3. Material and method	68
3.4. Results	72
I. Gene expression modifications for factors associated with the immune privilege (IGF-1, IDO1 and red/IK) and those involved in the neurogenic inflammation (CRH and NEP) in patients with alopecia areata and pair biopsies (Group A)	72
II. Gene expression modifications for factors associated with the immune privilege (IGF-1, IDO1 and red/IK) and those involved in the neurogenic inflammation (CRH and NEP) in patients with alopecia areata and lesional biopsy (Group B)	72
3.5. Discussions	87
3.6. Conclusions	
4. General conclusions	93
5. Originality and innovation	95
REFERENCES	97
ANNEXES	109
Keywords: alopecia areata, pulstherapy, corticosteroids, immune privilege, neurogenic inflammation, gene expression	

INTRODUCTION

Alopecia areata (AA) or spot baldness is a non-scary, inflammatory disease of the hair follicle. It is among the most widely-met causes of hair loss in young patients, along with androgenetic alopecia and telogen effluvium. Limited to circumscribed alopecic areas on the scalp or extended over the entire surface of the scalp and body, it usually has a chronic, unpredictable evolution, with remissions and relapses and a significant psychological and emotional impact on the quality of life.

In spite of the fact that this disorder has been known ever since ancient times, when it was described by Hippocrates and Celsus in both humans and furry animals and that great progress has been made in understanding the biological processes behind the onset of these lesions, the etiopathogenetic mechanism behind AA is still unclear. This is because of several potential causes: on consult, for example, the factor(s) that caused the visible lesions can no longer be identified, or the fact that hair loss takes place within a couple of days or weeks and the speed with which a single lesion or the disease itself develops varies a lot.

A particularity of this disease is the ability of the hair follicle to regenerate and this can be more easily understood once the immune privilege has been identified and characterized. Once kept, this immune status protects the hair follicle in the anagenous phase of the immune aggression induced by various triggers and is due to the presence of a local immunosuppressive environment. The cascade of biological events that lead to the onset of the perifollicular inflammation and implicit clinical lesions in AA is not fully understood and, hence, calls for further studies to be carried out at molecular level, studies that would more accurately characterize the role and activity of certain molecules that seem to be involved in supporting, collapsing and then restoring the immune privilege. On the other hand, there are a lot of controversial debates over the relationship between the psychological and emotional stress and the presence of AA. Within this context, further molecular assessment of stress mediators as well as research on the possible correlation with the immune privilege-associated factors is greatly required in order to possibly identify the connection between the onset of the disease in patients with a genetic predisposition and the presence of stress.

The best therapeutic approach is a difficult choice for both doctor and patient in most of the cases. Taking into account that, so far, no definite etiological treatment has been established, using immunosuppressive medication exclusively leads to unpredictable and inconstant therapeutic responses. Because of this, in the case of severe forms of AA (rapidly progressive multiple plaques, AT or AU) which need to be associated with systemic therapy to stop hair loss and trigger its regeneration, it is extremely important to accurately assess the risks and benefits ratio. A prospective observational study that would identify patients who would most greatly benefit from the efficiency and safety of systemic therapy is required. These were the reasons behind our decision to design a study that would assess the role of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone in patients with severe forms of AA.

The purpose of the two studies is to deepen the understanding of the molecular processes involved in this disorder as well as to improve the criteria used when deciding upon applying systemic therapy in patients with severe forms of this disease.

Study 1. The role of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone in the severe forms of AA

AA is an autoimmune inflammatory disorder of the hair follicle with a chronic evolution. In its severe, extensive forms, it leads to total hair loss on the scalp and body, with a significant psychological and emotional impact on the patient. Due to the fact that spontaneous or even therapeutic hair regeneration is the main goal in the treatment of severe forms of AA, we have assessed the role of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone and we have set the following objectives in our study: 1. assess the therapeutic efficiency of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone in patients with severe forms of AA; 2. assess the degree of safety of the procedure; 3. identify possible factors that might influence the long-term therapeutic result and that might be used as clinical eligibility criteria in the choice of pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone administration in patients with severe forms of AA.

Material and method

The uncontrolled prospective study carried out within the Clinic of Dermatology in Cluj Napoca between 2008 and 2012 included 32 patients with severe AA. The study has been approved by the Ethics Board within the County Emergency Clinical Hospital Cluj-Napoca. The following were the eligibility criteria for including a patient in the study: a) the presence of a severe form of the disease: active alopecia in plaques affecting more than 40% of the scalp (alopecia areata), alopecia totalis (AT) or alopecia universalis (AU); b) the absence of any contraindications against the administration of systemic corticosteroid treatment. On anamnesis, the patients proved to have been affected by an unfavourable clinical evolution of the disease, initial lesions having extended or new lesions having appeared under prior local treatment: intralesional or topical corticoids, local immunotherapy with diphenylcyclopropenone, minoxidil or antraline. Each patient included in the study was subjected to full anamnesis and clinical examination, followed by electrocardiogram and biohumoral evaluation in order to identify possible modifications that might prevent the administration of the systemic corticosteroid treatment (infections, cardiac or metabolic disorders) or to find any associated autoimmune diseases.

The therapeutic protocol involved the intravenous administration of 500 mg of methylprednisolone per day for 3 consecutive days and 3 consecutive months, respectively. Patients under 18 were given 6 mg/kgc/day. While on endovenous perfusion, patients were checked for possible adverse reactions, and their pulse and tension monitored. Further on, during the next 12 months of monitoring, patients were instructed to directly inform their supervising doctor of any late adverse reactions or any changes in their clinical state that were not present and implicitly recorded during evaluation visits.

The response to the treatment was initially recorded every month, when treatment was administered (including details such as the presence of hair regeneration or the fact that existing lesions did not extend or no new ones appeared). Later on, information was recorded every 3, 6 and 12 months after the end of the treatment. For the alopecia areata (the form in plaques), we assessed the degree of terminal hair regeneration on initially bald areas of the scalp, whereas for the total and universal forms of alopecia, the regeneration of terminal hair on the scalp, as well as eyebrows, eyelashes and body. Pictures were taken in the same technical conditions for a thorough documentation. Terminal hair regeneration was evaluated as follows: 100% meant full regeneration, between 50-99% cosmetically acceptable significant regeneration and between 1-49% minimum regeneration. Relapse was defined as 25% loss of initially regenerated hair and was recorded when evaluation was performed at 6 and 12 months. The degree of hair regeneration was evaluated according to the following clinical variables: the patient's gender and age, age on the onset of the disease, the clinical form of the disease, the treatment applied on the first outbreak of the disease, the onset of the disease in the occipital region, associated disorders, the length of the current outbreak of the disease (3-6 months, 7-12 months, over 12 months) as well as the duration of the disease (under and over 1 year).

Results

Out of the 32 patients included in the study, 12 (37.50%) were male and 20 (62.50%) female. They were aged between 4 and 59, with an average age of 26.16. The average age at the onset of the disease was 21.81. The average length of the disease was 4.34 years and the average duration of the last outbreak was of 12 months. Out of the 32 patients included in the study, 22 (68.75%) presented with alopecia in multiple plaques (alopecia areata), 2 patients (6.25%) were diagnosed with the total form of the disease (AT) and 8 patients (25%) had alopecia universalis (AU). Paraclinical investigations revealed that 4 patients (12.50%) were diagnosed with Hashimoto thyroiditis and hypothyroidism and 2 patients (6.25%) with Hashimoto thyroiditis, 1 patient (3.13%) had chronic lupus eritematos and 1 patient (3.13%) hypothyroidism and hypogonadism. At the end of the 3-month treatment, the following two important aspects were assessed: whether existing lesions extended (stop of the hair loss) and whether new lesions appeared meanwhile. Out of the 32 patients, 18 (56.25%) reported a stop in hair loss. Over the 3 months of treatment, only 8 out of the 32 enlisted patients (25%) presented new alopecic lesions. On comparing the presence of new lesions with the stop in hair loss, it could be observed that patients who did not report the presence of new lesions at the end of the treatment also benefited from a much more significant stop in hair loss (75%). The difference between the two groups was statistically significant ($p=0.0003$). The following were reported at the end of the 12 months of clinical observation: 26 (81.25%) out of the 32 enlisted patients had a clinical response. Thus, in 4 patients (12.50%) regeneration was complete, in 6 (18.75%) of them regeneration was significant and in 10, regeneration was only minimum (31.25%). Six (18.75%) of the total number of enlisted patients presented no clinical response. Out of the 26 patients who presented hair regeneration in various

degrees, 6 (18.75%) suffered relapses afterwards.

Patients treated on their first outbreak of the disease reported a much better response than the ones who had a history of the disease. The difference between the two groups was statistically significant ($p < 0.05$). On comparing the different responses to treatment among the different clinical forms of the disease, patients with alopecia in plaques (alopecia areata) reported a better response than the ones with alopecia totalis (AT) or alopecia universalis (AU) and the difference between these groups was also statistically significant ($p < 0.05$). The presence of alopecia in the occipital region at the onset of the disease influenced the therapeutic result at the 3-month check, patients in this group reporting a more reduced regeneration than the others, a difference also statistically significant ($p = 0.04$). The other clinical and evolution parameters did not have a statistically significant influence on the therapeutic response.

Conclusions

The results of this study underline the importance of systemic therapeutic intervention in the case of the patients diagnosed with severe forms of AA.

1. Pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone has to be applied in the case of patients with alopecia taking the form of multiple plaques that extend rapidly in order to limit the progression of the disease. The present study has proved a statistically significant positive correlation between the therapeutic result and this form of AA.

2. A statistically significant positive correlation between applying pulse therapy on the first outbreak of the disease and good therapeutic results was reported. The longer the outbreak, and the disease, the fewer the chances for regeneration.

3. In the case of the patients that rapidly develop AT or AU, pulse therapy should be regarded as an alternative which should be discussed with the patient because the therapeutic result is more than often unsatisfactory.

4. Even though our data show that at the end of the treatment existing lesions did not extend and the presence of new lesions was limited, this cannot be seen as a guarantee for a cosmetically acceptable result in the future, as proved by the response of the group of patients under 18.

5. In spite of the fact that our study only reported minimal and transitory adverse reactions that did not require an interruption of medication, we greatly support a thorough examination of the risks-benefits ratio, particularly in the case of young patients with an onset of the disease in childhood or in the case of patients diagnosed with AT or AU with long evolution and poor therapeutic response.

6. Following the multivariate analysis of clinical response, the present study has identified 3 eligibility criteria for pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone in the case of patients with AA: the clinical form of rapidly extensive alopecia with multiple plaques, treatment initiation on first outbreak of the disease as well as no involvement of the occipital region. A statistically significant positive correlation was reported between these three parameters and good hair regeneration.

7. The results of our study, confirming already published data regarding the selection of patients with AA to undergo pulse therapy, can constitute clinical guidance in the process of choosing the best treatment for patients with severe forms of AA.

Study 2. Molecular changes in AA

The immune privilege of the hair follicle is known to protect this microorganism against the negative effects of innate or acquired immunity. Among the various hypotheses regarding the pathogenesis of this disease, there is one that claims that AA is triggered by the loss of this immune privilege. Patients with a specific genetic predisposition are likely to develop the disease more than probably due to a decrease in the activity of the immunosuppressive environment that maintains this immune privilege unaltered. This process involves the participation of cytokines that reduce the expression of the antigens of the major complex of histocompatibility type I (IGF-1) and II (red/IK) as well as IFN- γ (IDO1)-induced molecules with an immunosuppressive role. Recently, the available literature has also taken into discussion the role of the physical or psychological and emotional stress by demonstrating the fact that the release of substance P by the perifollicular nerve endings in conditions of stress may trigger the collapse of the immune privilege and perifollicular neurogenic inflammation.

Taking into account the complex pathogenesis in AA, this study has analysed the factors involved in maintaining and restoring the immune privilege of the hair follicle (IDO1, IGF-1, red/IK and α -MSH), as well as factors known to play a role in the neurogenic inflammation that activates in conditions of physical or psychological and emotional stress (CRH, NGF, Substance P, NEP).

Material and method

Biological samples

In order to assess the level of gene expression, skin biopsies from the scalp of both patients with AA and healthy ones were sampled. The study was approved by the Ethics Board within the County Emergency Clinical Hospital Cluj-Napoca and was carried out within the Clinic of Dermatology Cluj-Napoca in collaboration with the Department of Functional Genomics, Proteomics and Experimental Pathology within the Oncological Institute Cluj-Napoca. Both patients and control signed a written agreement. Once collected, samples were frozen and stored in liquid nitrogen at -80°C . The study included 39 patients with AA (light form - under 10% scalp contamination and severe form - over 40% scalp contamination) as well as 11 healthy controls. The 39 patients were distributed into two groups, as follows:

1. Group A included 7 patients that agreed upon pair sampling which involved the collection of a biopsy not only from the active margin of the alopecic region (lesion area) but also from a second region, 2 cm away from the active margin, where the epilation test was negative on light traction (perilesional area);

2. Group B included 32 patients with biopsies sampled from the lesion area.

Total RNA extraction and purification. For RNA extraction, we used the classical method described by Chomczynski et al. and the Tri Reagent[®] (Sigma -Aldrich) extraction kit. Extracted RNA was purified with the RNeasy (Qiagen) kit and submitted

to qualitative and quantitative assessment by NanoDrop ND-1000 spectrometer Agilent 2100 bioanalyzer. Only RNA samples with RIN (RNA integrity number) higher than 6.5 were used. FirstStrand cDNA (Roche) kit was used to obtain complementary DNA (cDNA) based on 200 ng from the total RNA. Synthesized cDNA was used as the template for the qRT-PCR reaction.

Quantitative real-time PCR reaction (qRT-PCR)

The analysis was performed with the help of the Roche (LightCycler 480) technology with UPL (Universal Probe Library) primers and fluorescent probes originating from *in silico* studies. Complementary DNA obtained by reverse transcription of 200 ng mRNA was amplified in a 96-well plate format with the help of the Lightcycler Taqman Master kit from Roche. The PCR reaction then followed. Each gene expression analysis was performed in triplicates. Cp values greater than 35 cycles were regarded as due to non-specific amplifications (false positive results). As NGF, SP and α -MSH genes were associated with a Cp value greater than 35, they were excluded from the study. The level of change in gene expression - *fold change (FC)* - was calculated through the ddct method, each sample being normalized at the level of the housekeeping gene 18S and compared against the average value of the control batch.

Genes that simultaneously respected all of the following conditions: $FR \geq \pm 1.3$ ($FC > 1.3$) and $p < 0.05$, were considered differentially expressed between the two groups.

Results/Conclusions

Group A (pair biopsies):

1. The level of IDO1 gene expression was statistically significantly up-regulated in the lesion areas as compared to the perilesional ones or to the patients who experienced an outbreak of less than 6 months.
2. The expression levels of the other genes (IGF-1, red/IK, CRH și NEP) were up-regulated in the lesion areas as compared to perilesional ones, but without reaching a threshold of statistical significance.
3. The level of NEP gene expression in the perilesional area was statistically significantly up-regulated in patients with an outbreak of less than 6 months.
4. The level of expressions of all 5 studied genes did not significantly correlate with the severity of the disease.

Group B:

5. The level of red/IK gene expression was statistically significantly down-regulated in the lesion area as compared to the control tissue.
6. The level of CRH gene expression was statistically significantly up-regulated in the lesion area as compared to the control tissue.
7. The level of IDO1 gene expression was up-regulated in the lesion area as compared to the control tissue, but without statistical significance.
8. The levels of IGF-1 and NEP gene expressions were down-regulated in the lesion area as compared to the control tissue, but without statistical significance.
9. The expression levels of the 5 studied genes did not significantly correlate with the monitored clinical and evolutive characteristics (the severity and

duration of the disease, response to treatment and the presence of acknowledged stress).

This second study on molecular modifications has managed to characterize the collapse or recovery status of the immune privilege as well as the involvement and correlation of stress sustained by the presence of neurogenic inflammation by assessing the expression levels of genes associated with the immune privilege as well as of those other factors involved in the neurogenic inflammation in patients with AA. This is the first study in Romania that researches the interrelationship between the immune privilege and the neurogenic inflammation in the two groups of patients as well as among the very few published ones on this topic at global level. Its results support the importance of redirecting treatment efforts towards methods of restoring the lost immune privilege and reducing the effects of stress-induced neurogenic inflammation with the purpose of developing more targeted and efficient cures for AA.