UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

TAMIRIS AMANDA JULIO

Mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais BP180/BP230 e isoformas neuronais na associação do penfigoide bolhoso com a demência

Ribeirão Preto
2020

TAMIRIS AMANDA JULIO

Mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais BP180/BP230 e isoformas neuronais na associação do penfigoide bolhoso com a demência

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de concentração: Clínica Médica - Opção: Investigação Biomédica. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Julio, Tamiris Amanda

Mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais BP180/BP230 e isoformas neuronais na associação do penfigoide bolhoso com a demência. Ribeirão Preto, 2020.

109 f.: il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

1. BP180. 2. BP230. 3. Penfigoide bolhoso. 4. Demência. 5. Mimetismo molecular. 6. Autoimunidade.

JULIO, T. A. Mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais BP180/BP230 e isoformas neuronais na associação do penfigoide bolhoso com a demência. 2020. 109 f. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos pacientes com doenças autoimunes, especialmente com dermatoses autoimunes. Receber o diagnóstico de uma doença na qual o seu próprio sistema imune é o maior inimigo, e que ainda não está completamente elucidada pela ciência, não é uma missão nada fácil. Toda a minha admiração, respeito e dedicação científica a todos estes pacientes, que são grandes guerreiros.

AGRADECIMENTOS

Ciência é a harmonia entre curiosidade, veracidade e colaboração. E, para que este projeto se concretizasse, muitas pessoas colaboraram. Algumas contribuíram cientificamente, com ideias, discussões e auxílio nos experimentos. Outras, na forma de apoio, amor e amizade. A todos, eu sou imensamente grata por estarem comigo nesta etapa tão importante da minha jornada acadêmica.

Agradeço...

A Deus por ser luz e esperança nos momentos difíceis, e por sempre me guiar para o caminho certo a ser percorrido.

Aos meus queridos pais, Maria e Aparecido, pela paciência neste período e por compreenderem que a distância que nos separa é insignificante frente ao amor que nos une. Obrigada por sempre zelarem pelo meu estudo e por todos os esforços que fizeram para a realização dos meus sonhos.

Ao meu amado avô Antônio, que foi o grande responsável pela minha alfabetização. O seu amor e paciência, ao me ensinar a ler e escrever as primeiras palavras, foram fundamentais para a minha formação pessoal e profissional.

Ao meu noivo Matheus, pela nossa forte união que me incentiva a prosseguir com os meus sonhos e anseios profissionais. Obrigada por ser fortaleza e calma nos momentos desafiadores.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Roselino, pela competência com que me orientou, transmitindo-me seus valiosos conhecimentos científicos, por acreditar no meu potencial e pelas inúmeras oportunidades.

Ao Prof. Dr. Julio César Moriguti, que gentilmente abriu as portas para a pesquisa no Ambulatório de Demências (GEDEM), e por todas as valiosas contribuições e sugestões.

Ao Prof. Dr. André Messias, por permitir a coleta das amostras dos indivíduos controles no Ambulatório de Cataratas.

A Natália de Paula e ao Leonardo La Serra, por terem me introduzido ao universo do cultivo celular. Obrigada pela paciência e por todo o conhecimento que vocês me forneceram, pois foram fundamentais para a execução do projeto.

A Aline Turatti, pelo valioso auxílio nos experimentos de imunofluorescência, pelo conhecimento compartilhado, e também pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Lamberti P. da Silva, por permitir que parte dos experimentos tenham sido realizados em seu Laboratório de Tráfego de Proteínas e Interação Vírus-célula, e por muito ter contribuído para com a padronização do *immunoblot*. Ao Lucas Alves Tavares, que incansavelmente colaborou com os experimentos de *immunoblot* e com a discussão dos resultados.

A Flavia Tremeschin e a Sandra Rodrigues por todo apoio técnico, por estarem sempre dispostas no auxílio de minhas dúvidas e por todo o carinho e acolhimento que tiveram comigo no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos queridos colegas do Grupo de Pesquisa em Dermatoses Autoimunes Marcela Brandão, Sebastián Vernal Carranza, Ederson Valei, Denise Borba, Roberto Bueno Filho e Maria Brochado, por contribuírem com seus conhecimentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação Bruna Cristina Bertol, Paulin Sonon, Ibrahim Sadissou e Juliana Doblás Massaro, por dividirem o Laboratório de Biologia Molecular comigo, pelos conhecimentos compartilhados e pela excelente convivência. Em especial, a minha irmã de coração, que a pós-graduação me presenteou, Bruna Fenerich, pelo companheirismo e por dividir as alegrias e aflições desta etapa.

A Cristina Coelho, secretária da Divisão de Dermatologia do HC-FMRP-USP, por ser tão atenciosa e sempre disposta em ajudar.

Ao Emerson Quirino de Oliveira, secretário do Curso de Pós-graduação - Área Clínica Médica - FMRP-USP por toda a atenção no decorrer da pós-graduação.

Ao extraordinário corpo docente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e a todos os envolvidos na parte administrativa que tornaram possível a realização deste trabalho e contribuíram para minha formação profissional.

Aproveito o ensejo para agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2016/09011-3, pela concessão da bolsa regular de doutorado que possibilitou a execução deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001.

*“Com o poder da sua mente, sua determinação, seu instinto, e a
experiência também, você pode voar muito alto”*

Ayrton Senna

JULIO, T.A. Mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais BP180/BP230 e isoformas neuronais na associação do penfigoide bolhoso com a demência. 2020. 109f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Autoanticorpos direcionados contra as proteínas hemidesmosomais BP180 e/ou BP230, expressas na zona da membrana basal do tegumento, causam penfigoide bolhoso (PB). A associação do PB com a demência tem sido cada vez mais relatada em idosos. Tendo conhecimento de (i) a presença de anticorpos anti-BP180 e anti-BP230 em soros de pacientes com PB e demência, (ii) a identificação de anti-BP180 e anti-BP230 no líquido cefalorraquidiano de dois pacientes com a associação de PB e doenças neurológicas e (iii) raros relatos da expressão controversa das isoformas BP180 e BP230 no sistema nervoso central (SNC), avaliou-se a expressão das proteínas de 180-kDa e de 230-kDa em experimentos *in vitro* com queratinócitos hiper expressos em proteínas hemidesmosomais (DJM-1) e astrócitos (TM-31) humanos. Ensaio de imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti-BP180 confirmaram a expressão da proteína 180-kDa na membrana plasmática dos queratinócitos e no citoplasma dos astrócitos. Ensaio de *immunoblot* mostraram que amostras de soro de 26,3% de pacientes com PB, 28,6% de pacientes com demência e 7,1% dos controles idosos reconheceram as proteínas de 180-kDa e/ou 230-kDa em ambos os queratinócitos e astrócitos, confirmando o mimetismo molecular entre proteínas da pele e do SNC. Assim, propõe-se um mecanismo patogênico para a associação demência-PB. Neurodegeneração e neuroinflamação – aqui representados pela demência - poderiam expor as isoformas neurais de 180-kDa e 230-kDa, que passam a ser reconhecidas como proteínas *non-self* com consequente produção de autoanticorpos. Esses anticorpos seriam dirigidos à pele, e apresentariam reação cruzada com as isoformas cutâneas BP180 e BP230, desencadeando o início do PB após o diagnóstico de demência.

Palavras-chave: Autoimunidade. BP180. BP230. Demência. Mimetismo molecular. Penfigoide bolhoso.

JULIO, T.A. Molecular mimicry between BP180/BP230 hemidesmosomal proteins and neural isoforms in the association of bullous pemphigoid with dementia. 2020. 109f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Autoantibodies against the hemidesmosomal proteins BP180 and/or BP230 cause bullous pemphigoid (BP). BP association with dementia in the elderly has been increasingly reported. Given (i) the presence of serum anti-BP180 and anti-BP230 in BP and dementia patients, (ii) anti-BP180 and anti-BP230 identification in the liquor of two BP patients with neurologic diseases, and (iii) rare reports on controversial BP180 and BP230 isoforms expression in the central nervous system (CNS), we evaluate neural and skin BP180 and BP230 molecular mimicry in in vitro assays with human keratinocytes (DJM-1) and astrocytes (TM-31). Immunofluorescence confirmed the 180-kDa expression in keratinocyte plasma membrane and astrocyte cytoplasm. Serum samples from 26.3% BP and 28.6% dementia patients and 7.1% elderly controls recognized the 180-kDa and/or 230-kDa proteins in both keratinocytes and astrocytes by immunoblot experiments, confirming molecular mimicry between skin and CNS proteins. Thus, a pathogenic mechanism for the association dementia-BP is proposed. Neurodegeneration and neuroinflammation - represented by dementia - may trigger autoantibody production against the neural 180-kDa and 230-kDa isoforms, recognized as non-self-proteins in the CNS. The consequent cross-reactivity of these isoforms with skin BP180 and BP230 proteins could trigger BP onset following dementia diagnosis.

Keywords: Autoimmunity. BP180. BP230. Bullous pemphigoid. Dementia. Molecular mimicry.

- Figura 1 - Representação estrutural do hemidesmossomo e suas moléculas de adesão, com destaque para BP230 e BP180, os principais alvos dos autoanticorpos no PB, Legenda: BMZ: zona da membrana basal; Col: colágeno; KIF: filamento intermediário de queratina; Lam332: laminina 332. (Imagem: HAMMERS & STANLEY, 2020).....38
- Figura 2 - Vias fisiopatológicas do penfigoide bolhoso resumidas nesta revisão. Legenda: GzmB: granzima B; EC: ectodomínio; MC: mastócito; NE: elastase de neutrófilos. (Imagem: HAMMERS & STANLEY, 2020).....41
- Figura 3 - Critérios para detecção de mimetismo molecular esquematizados a partir da relação do surgimento da síndrome de guillain-barré (GBS) com exposição ao agente infeccioso *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*).....46
- Figura 4 - Imagem das células DJM-1 obtidas por microscópio de luz no momentos do recebimento da linhagem.....55
- Figura 5 - Imagem das células TM-31 obtidas por microscópio de luz ao recebimento da linhagem (BCRJ - 13ª passagem).....56
- Figura 6 - Anticorpo monoclonal anti-BP180 reconhece a proteína 180-kDa nos queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31). Quantidades equivalentes de lisados celular de queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31) foram submetidas ao *immunoblot*, utilizando anticorpo comercial anti-BP180. (A) Anticorpo anti-BP180 reconhece 120- e 180-kDa em lisado celular de queratinócitos. (B) A proteína 180-kDa no lisado celular de astrócitos foi reconhecida pelo anticorpo anti-BP180.....62
- Figura 7 - Imunofluorescência evidencia a expressão da proteína BP180 nas células de queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31). As células foram incubadas com o anticorpo comercial anti-BP180 e marcadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa-594 (canal vermelho). A fluorescência vermelha nas células indica a expressão da proteína BP180. Os núcleos foram corados pelo DAPI (cor azul). (A) Queratinócitos exibem fluorescência na membrana celular e levemente dispersas no citoplasma (A1) 63x (A2)

Ampliação = 2.0x (B) Astrócitos mostram fluorescência intracitoplasmática (B1) 63x (B2)
Ampliação = 2.0x.....63

Figura 8 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB exclusivo. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ) e 230-kDa (*)......64

Figura 9 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB associado a demência. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞)......66

Figura 10 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB associado a outras doenças neurológicas. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞)......67

Figura 11 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ) e 230-kDa (*)......68

Figura 12 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞)......70

Figura 13 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo controle com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).....71

Figura 14 - *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo controle com anti-BP180/BP230 negativo. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).....72

Figura 15 - Amostras de soro dos grupos PB, demência e alguns controles reconheceram as proteínas 180-kDa e 230-kDa nos queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31) humanos. Quantidades equivalentes de lisados celular de queratinócitos e astrócitos foram submetidas ao *immunoblot*, utilizando-se anticorpo comercial anti-BP180 e amostras de soro de pacientes com PB (subgrupos: PB exclusivo, PB associado a demência e PB com outras DN's), pacientes com demência e controles idosos. (A) Lisado de queratinócitos: Expressão da proteína de 180-kDa reconhecida pelo anti-BP180 (C) e proteínas 180-kDa e / ou 230-kDa foram reconhecidas por 5 de 7 PB exclusivos, 6 de 7 demência-BP, 5 de 5 PB associado a outras DN's, 6 de 14 demências e 7 de 14 controles ($p = 0,2470$). (B) Lisado de astrócitos: expressão da proteína de 180-kDa reconhecida pelo anti-BP180 comercial (C) e das proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa reconhecidas por 2 das 7 PB exclusivo, 4 das 7 demência-PB, 4 de 5 PB associado a outras DN's, 5 de 14 demências e 2 de 14 controles ($p = 0,0726$). Resultados de ELISA anti-BP180 / anti-BP230: +; -: valores acima e abaixo do valor de corte (9 U / mL). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ); 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).....75

Tabela 1 - Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência e controles.....	52
Tabela 2 - Distribuição dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos subgrupos penfigoide bolhoso (PB) exclusivo, PB associado a demência (Demência-PB), PB associados a outras doenças neurológicas (DNs), demência e controles.	54
Tabela 3 - Especificações dos anticorpos utilizados.....	59
Tabela 4 - Dados laboratoriais dos pacientes penfigoide bolhoso (PB) exclusivo.	65
Tabela 5 - Dados laboratoriais dos pacientes com penfigoide bolhoso (PB) associado a demência.....	66
Tabela 6 - Dados laboratoriais dos pacientes com penfigoide bolhoso (PB) associado a outras doenças neurológicas.....	68
Tabela 7 - Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180 / anti-BP230.....	69
Tabela 8 - Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo demência com anti-BP180/anti-BP230 negativo.....	70
Tabela 9 - Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo controle com presença de anti-BP180/anti-BP230.....	72
Tabela 10 - Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo controle com anti-BP180/anti-BP230 negativo.....	73
Tabela 11 - Frequência do número de amostras de soro dos subgrupos penfigoide bolhoso (PB) exclusivo, associação de demência-PB e PB com outras DNs), pacientes com demência e	

controles idosos) que reagiram positivamente com proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa em queratinócitos humanos (DJM-1) e astrócitos (TM-1) no <i>immunoblot</i>	75

AVC	Acidente Vascular Cerebral
Anti-BP180	Anticorpo contra o antígeno BP180 do Penfigoide Bolhoso
Anti-BP230	Anticorpo contra o antígeno BP230 do Penfigoide Bolhoso
APC	Célula Apresentadora de Antígeno, do inglês <i>Antigen-Presenting Cell</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BP	<i>Bullous Pemphigoid</i>
BPAG1	Antígeno 230 do Penfigoide Bolhoso
BPAG2	Antígeno 180 do Penfigoide Bolhoso
BP180	Antígeno 180 do Penfigoide Bolhoso
BP230	Antígeno 230 do Penfigoide Bolhoso
BSA	Albumina do Soro Bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CDR	Escala de Avaliação Clínica da Demência
DAPI	Corante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBAL	Dermatose Bolhosa por IgA Linear
DEM	Demência
DJM-1	Linhagem celular referente aos queratinócitos humanos
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's MEM
DN	Doença Neurológica
DNs	Doenças Neurológicas
DSM5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HLA	Antígeno leucocitário humano, do inglês: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HCRP-FMRP-USP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

---

HRP	Enzima <i>Horseradish Peroxidase</i>
IB	<i>Immunoblot</i>
IF	Imunofluorescência realizada com células
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kDa	Quilodaltons (medida de peso para proteínas)
MEM	Meio Essencial Mínimo para cultivo celular
MEEM	Mini Exame do Estado Mental
NA	Não aplicável ao grupo/ Não avaliado
NC16A	Epítopo da proteína BP180
PB	Penfigoide Bolhoso
PBS	Tampão Bicarbonato-Fosfato pH=7,0 do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
SNC	Sistema Nervoso Central
SD	(<i>Standard derivation</i>) desvio-padrão
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSS	Técnica de <i>Salt Split Skin</i>
TA	Temperatura Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	Células T auxiliares
TM-31	Linhagem celular referente aos astrócitos humanos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T regulatórias
ZMB	Zona da Membrana Basal

μl	Microlitro
mL	Mililitro
μg	Micrograma
M	Molar
mM	Milimolar
v/v	Percentual volume/volume
mA	Miliampère
g	Força gravitacional
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CO_2	Gás carbônico
pH	Potencial hidrogeniônico
kDa	Quilodalton
UR	Unidade relativa
%	Porcentagem
p	Valor p
χ^2	Qui-quadrado
∞	Infinito, utilizado para indicar o reconhecimento da proteína 120-kDa
Δ	Triângulo, utilizado para indicar o reconhecimento da proteína 180-kDa
*	Asterisco, utilizado para indicar o reconhecimento da proteína 230-kDa
*	Asterisco, utilizado para indicar diferença significativa entre os grupos
δ :	Delta, utilizado para indicar diferença significativa entre os grupos

---

1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1 – PENFIGOIDE BOLHOSO	35
2.1.1 – Aspectos clínicos.....	35
2.1.2 – Epidemiologia.....	36
2.1.3 – Etiopatogênese.....	36
2.2 – PENFIGOIDE BOLHOSO E DOENÇAS NEUROLÓGICAS	42
2.3 – DOENÇAS NEUROLÓGICAS E ASTRÓCITOS	44
2.4 - MIMETISMO MOLECULAR E AUTOIMUNIDADE	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 - OBJETIVO GERAL	48
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 - ASPECTOS ÉTICOS.....	50
4.2 – POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	50
4.2.1 – Caracterização da população estudada	50
4.2.2 Composição da casuística para processamento das análises.....	52
4.3 – LINHAGENS CELULARES	55
4.4 – IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL	57
4.5 - OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DOS LISADOS CELULARES DJM-1 E TM-31.....	58
4.6 - SDS-PAGE E ELETROTRANSFERÊNCIA.....	58
4.7 - IMUNODETECÇÃO EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE	58
4.9 – ANTICORPOS	59
4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5. RESULTADOS	61
5.1 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HEMIDESMOSSOMAS NAS LINHAGENS DJM-1 E TM-31..	62

5.2 – AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM PB, DEMÊNCIA E ALGUNS CONTROLES TÊM COMO ALVO AS PROTEÍNAS DE 180-KDA E 230-KDA NOS QUERATINÓCITOS E ASTRÓCITOS	64
5.2.1 GRUPO DE PACIENTES COM PENFIGOIDE BOLHOSO	64
5.2.1.1 Subgrupo PB exclusivo	64
5.2.1.2 Subgrupo PB com demência	65
5.2.1.3 Subgrupo PB com associação clínica de outras doenças neurológicas	67
5.2.2 GRUPO DE PACIENTES COM DEMÊNCIA.....	68
5.2.2.1 Subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230	68
5.2.2.2 Subgrupo demência com anti-BP180 e / ou anti-BP230 negativo	69
5.2.2 GRUPO CONTROLE	71
5.2.2.1 Subgrupo controle com positividade para ELISA anti-BP180/ anti-BP230	71
5.2.2.1 Subgrupo controle com anti-BP180/ anti-BP230 negativo	72
5.2.2 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO <i>IMMUNOBLOT</i> ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO..	73
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO.....	85
8. REFERÊNCIAS.....	87
9. ANEXOS.....	102
ANEXO A - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA HUMANO.....	103
ANEXO B – MODELO DA FICHA DO MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM) UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO MENTAL DOS PACIENTES DO GRUPO DEMÊNCIA E CONTROLE	107
10. APÊNDICES	109
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	110

1. INTRODUÇÃO

O penfigoide bolhoso (PB) é uma dermatose autoimune que apresenta maior incidência nos idosos, principalmente nos pacientes com mais de 70 anos (DANIEL; MURRELL, 2019; HAMMERS; STANLEY, 2020; VAN BEEK; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2018). A patogênese do PB ainda não está completamente elucidada, entretanto, parece estar relacionada à desregulação do sistema imunológico do hospedeiro no processo de envelhecimento (GENOVESE et al., 2019; MILLER, 1996). Os pacientes com PB produzem autoanticorpos da classe IgG dirigidos contra duas proteínas hemidesmosomais - de 230-kDa (antígeno-1, também conhecido por BPAG1, BP230 ou distonina) e 180-kDa (antígeno-2, também conhecido por BPAG2, BP180 ou colágeno tipo XVII). Mais recentemente, descreveu-se a produção de anticorpos da classe IgE contra essas proteínas hemidesmosomais (HAMMERS; STANLEY, 2020). A deposição de autoanticorpos IgG e IgE na zona da membrana basal (ZMB), juntamente com a participação de eosinófilos e mastócitos, resulta em bolhas subepidérmicas, clinicamente por bolhas tensas generalizadas, podendo afetar as membranas mucosas em 30% dos casos (BERNARD; ANTONICELLI, 2017; HAMMERS; STANLEY, 2016).

Em idosos, alta prevalência da associação PB e doenças neurológicas (DNs) vem sendo descrita (JULIO et al., 2018; KALIŃSKA-BIENIAS et al., 2019; KHOSRAVANI et al., 2017; KWAN et al., 2015; LAI; YEW; LAMBERT, 2016; LANGAN; GROVES; WEST, 2011; PAPAKONSTANTINO et al., 2019). Autoanticorpos IgG contra a proteína BP180 foram detectados em pacientes com demência (FOUREUR et al., 2006; JULIO et al., 2018; MESSINGHAM et al., 2015; VERNAL et al., 2018), degeneração lobar frontotemporal (KATISKO et al., 2018), doença de Alzheimer (KOKKONEN et al., 2017; TUUSA et al., 2019), Parkinson (MESSINGHAM et al., 2015; RECKE et al., 2016) e esclerose múltipla (RECKE et al., 2016; TUUSA et al., 2019).

A patogênese da associação do PB com DNs é reforçada pelo fato de que a pele e o tecido cerebral compartilham ancestralidade embrionária ectodérmica. Assim, há proteínas comuns expressas em ambos os tecidos (NEAU et al., 2014). A expressão das isoformas neurais das proteínas BP180 e BP230 no sistema nervoso central (SNC) configura possível mimetismo molecular com as isoformas BP180 e BP230 expressas na pele (CLAUDEPIERRE et al., 2005; SEPPÄNEN et al., 2006, 2007), entretanto a expressão do BP180 no hipocampo não foi reportada por BARRICK et al., 2016. Ainda, relatos apontam existir um vínculo patogênico envolvendo autoanticorpos anti-BP na associação PB-DN (CHEN et al., 2011; FOUREUR et

al., 2006; KOKKONEN et al., 2017; LI et al., 2009). Reforçando esse possível vínculo patogênico entre isoformas expressas no SNC e pele, anticorpos anti-BP 180/230-kDa foram evidenciados no líquido cefalorraquidiano de dois pacientes com a associação de PB e doenças neurológicas (MEUDEEC et al., 2019).

Recentemente, relatamos a correlação entre os dados clínicos e laboratoriais (ELISA IgG anti-BP180 e anti-BP230) de 50 pacientes com PB, comparados a 50 pacientes com demência e 50 controles idosos (JULIO et al., 2018). Anticorpos séricos contra BP180 foram demonstrados em 74%, 10% e 14% dos grupos de PB, demência e controles, respectivamente. Ainda, a imunofluorescência indireta associada à técnica de *Salt Split Skin* (IFI-SSS) evidenciou que dois pacientes com demência apresentaram autoanticorpos da classe IgG contra BP180 no ELISA, aliados à fluorescência de IgG na ZMB, sugerindo subdiagnóstico de PB. As análises, utilizando mineração de dados, evidenciaram que pacientes com PB e pacientes com demência compartilham os mesmos preditores biológicos, justificando a associação entre demência e PB. Esses achados nos levaram a explorar o papel das proteínas BP180 e/ou BP230 via mimetismo molecular utilizando experimentos *in vitro* com linhagens de queratinócitos e astrócitos. O objetivo principal visou demonstrar a expressão das isoformas BP180/230 nos queratinócitos e astrócitos, empregando imunofluorescência e *immunoblotting*, com anticorpo comercial anti-BP180 e soros de pacientes com PB, demência e controles.

As linhagens celulares foram constituídas por queratinócitos (células DJM-1) altamente enriquecidas em proteínas hemidesmosomais (HIRAKO et al., 2014) e em astrócitos (células TM-31) (KURIMOTO et al., 2001) - consideradas as células imunes residentes do SNC e envolvidas no processo de patogênese da neurodegeneração (CAI; WAN; LIU, 2017; GAO et al., 2002; OKSANEN et al., 2019).

Os resultados confirmam a expressão da proteína 180-kDa nas duas linhagens, empregando-se anticorpo monoclonal. Ainda, amostras de soro de pacientes com PB e demência reconheceram as proteínas BP180 e BP230 nos queratinócitos e astrócitos, confirmando o mimetismo molecular entre as isoformas expressas na pele e no SNC. Ao final, propusemos um mecanismo patogênico para a associação do PB com doenças neurológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – PENFIGOIDE BOLHOSO

2.1.1 – Aspectos clínicos

O termo penfigoide (*pemphigodes* do grego = que se assemelha ao pênfigo) compreende uma classe das doenças bolhosas autoimunes incomuns (DBAI). O primeiro relato diferenciando o penfigoide bolhoso (PB) das demais DBAI ocorreu em 1953, por Lever, que atribuiu a presença típica de bolha subepidérmica como característica exclusiva do PB. Na década seguinte, Beutner e Jordan (1964) demonstraram por imunofluorescência direta (IFD) e imunofluorescência indireta (IFI) que pacientes acometidos pelo PB apresentavam autoanticorpos circulantes contra a junção dermoepidérmica.

A forma clássica do PB é caracterizada por lesões urticadas e pruriginosas, e posteriormente pela combinação de bolhas tensas subepidérmicas (HAMMERS; STANLEY, 2020; VAN BEEK; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2018). As bolhas podem ser generalizadas e afetam principalmente as áreas das dobras dos membros, pescoço e abdome, e permanecem por vários dias até se romperem deixando lesões erodidas e crostas. As membranas mucosas também podem ser acometidas, sendo as lesões orais as mais frequentes, em 10 a 20% dos casos, enquanto que as outras mucosas são raramente afetadas (COZZANI et al., 2015; KERSHENOVICH; HODAK; MIMOUNI, 2014; SCHMIDT; DELLA TORRE; BORRADORI, 2012).

Existe uma heterogeneidade na apresentação clínica do PB, assim, as bolhas podem aparecer na pele com aparência normal ou com infiltrado inflamatório. O aspecto inflamatório do PB é dependente de anticorpos que tem como alvo o domínio NC16A da proteína BP180. Entretanto, anticorpos contra outras porções da proteína BP180, exceto o domínio NC16A, contribuem para ausência de inflamação e, conseqüentemente, o paciente não apresenta urticária e eritema (IZUMI et al., 2016). Em alguns casos, observa-se que os pacientes apresentam autoanticorpos direcionados exclusivamente contra a proteína BP230 e, geralmente, apresentam a forma mais leve da doença (ZHENG et al., 2019).

Ao contrário do que observamos nos pênfigos, o sinal de Nikolsky no PB é negativo. A histologia geralmente mostra uma bolha subepidérmica com um infiltrado superficial contendo eosinófilos, linfócitos e neutrófilos. A eosinofilia periférica também é frequentemente observada nos pacientes com PB. A imunofluorescência direta evidencia depósito de IgG e C3

na zona da membrana basal. A imunofluorescência indireta (IFI) associada a técnica de *Salt Split Skin* evidencia a característica típica e específica do PB - presença de depósito linear de IgG no teto da clivagem, sendo esta técnica utilizada para o diagnóstico diferencial do PB com a Epidermólise Bolhosa Adquirida (GAMMON et al., 1984). Na prática clínica o teste sorológico ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 nem sempre é realizado, entretanto, é um biomarcador que evidencia autoanticorpos IgG contra as proteínas BP180 e BP230.

2.1.2 – Epidemiologia

O PB não apresenta predileção racial, afeta mais as mulheres que os homens (DANIEL; MURRELL, 2019) e apresenta um pico de incidência na sétima década de vida (ALPSOY; AKMAN-KARAKAS; UZUN, 2015; BRICK et al., 2014b; PARKER; MACKELFRESH, 2011). Entretanto, o PB pode ocorrer nas demais faixas etárias, sendo raro o acometimento em crianças (MARTINEZ-DE PABLO et al., 2007; MINTZ; MOREL, 2011; OSAWA et al., 2014), e durante a meia idade (ZANELLA et al., 2011).

A incidência e prevalência do PB são dependentes da população estudada (HAMMERS; STANLEY, 2016). Nos Estados Unidos a incidência anual é de 6 a 13 casos novos por milhão de pessoas (BAIGRIE; NOOKALA 2020), enquanto na Europa a incidência varia entre 7 a 43 casos por milhão de habitantes (MARAZZA et al., 2009; SCHMIDT, DELLA TORRE, BORRADORI, 2012). No Brasil ainda não existem dados epidemiológicos de PB, apenas relatos de séries de casos ou descrição de casos clínicos.

Estudos retrospectivos mostram que a incidência do PB vem aumentando nos últimos anos, com taxa de 12 a 43 novos casos por milhão de habitantes (FÖRSTI et al., 2014; KASPERKIEWICZ; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2012; BRICK et al., 2014; LANGAN et al., 2008), fato que pode ser atribuído ao envelhecimento da população, aumento do número de casos de doenças neurológicas e uso de medicamentos desencadeantes.

2.1.3 – Etiopatogênese

Apesar dos mecanismos patogênicos do PB ainda não ter sido completamente elucidados, a literatura evidencia que a maioria dos casos de PB são mediados por autoanticorpos à zona da membrana basal (ZMB) (GENOVESE ET AL., 2019; HAMMERS; STANLEY, 2020). Entretanto, alguns casos de PB podem ser induzidos por medicamentos

sistêmicos, ocorrendo até três meses após o início da medicação. Dentre os fármacos mais relatados destacam-se os diuréticos como furosemida e espironolactona, neurolépticos, gliptinas, anti-inflamatórios não esteroides, amoxicilina, penicilaminas, captopril, inibidores de PD-1 / PD-L1 e inibidor de TNF- α (BASTUJI-GARIN et al., 2011; DANIEL; MURRELL, 2019; LANGAN et al., 2008).

As infecções, principalmente aquelas causadas pelo herpes vírus humano (citomegalovírus, Epstein-Barr e HHV-6), também têm sido mencionadas como possíveis estímulos para o surgimento do PB em alguns pacientes (LO SCHIAVO et al., 2013). Os fatores físicos, como exposição à luz ultravioleta, radioterapia, traumas e queimaduras também podem induzir ou exacerbar o PB (LO SCHIAVO et al., 2013; SCHMIDT; DELLA TORRE; BORRADORI, 2012).

Algumas doenças parecem estar associadas ao PB e talvez ter contribuição na sua patogênese. Em um estudo alemão envolvendo 1.743 pacientes com PB, observou-se a associação com doenças hematológicas, como linfoma e leucemia, em cerca de 7% dos casos, mas não foi observada associação com doenças malignas não hematológicas (SCHULZE et al., 2015). A associação do PB com doenças neurológicas (DNs) tem sido relatada em diversas populações (KHOSRAVANI et al., 2017; N. FOUREUR, V. DESCAMPS, B. LEBRUN-VIGNES, C. PICARD-DAHAN, M. GROSSIN, S. BELAICH, 2012; PAPAKONSTANTINO et al., 2019), sendo a demência antecedendo o surgimento do PB a mais frequentemente relatada (JULIO et al., 2018; KWAN et al., 2015; LANGAN; GROVES; WEST, 2011). A dermatite herpetiforme (DH) também parece estar relacionada com o surgimento do PB. Em um estudo caso-controle retrospectivo conduzido na Finlândia no período de 1997 a 2013 envolvendo 3.397 pacientes com PB e 12.941 controles, foi observado que 41 (1,2%) dos pacientes com PB e 7 (0,1%) dos controles haviam previamente o diagnóstico de DH. Os autores também concluíram que os pacientes com DH apresentam um risco de 22 vezes maior de desenvolver PB, com um tempo médio de 3 anos entre os diagnósticos de DH e PB (VARPULUOMA et al., 2019).

O perfil HLA-DQ também em sido associado à suscetibilidade de desenvolver o PB. Em um estudo japonês foi observada maior frequência do alelo *-DQA1*03: 01* em pacientes com PB (OKAZAKI et al., 2000). O alelo *-DQA1*05: 05* foi associado à suscetibilidade do PB em pacientes iranianos (ESMAILI et al., 2013), brasileiros (CHAGURY et al., 2018), chineses (FANG et al., 2018) e japoneses (TAKATA et al., 2019). O alelo *-DQB1*03: 01* foi associado

ao PB em diversas etnias, incluindo americanos (DELGADO et al., 1996), britânicos (BANFIELD et al., 1998), espanhóis (ZAKKA; RECHE; AHMED, 2011), italianos (VAIRA et al., 2013), japoneses (MINAGAWA et al., 2015), chineses (FANG et al., 2018) e brasileiros (CHAGURY et al., 2018). Provavelmente, o alelo *-DQB1*03:01* leva à perda da autotolerância e desencadeia o PB, uma vez que as células Th1, Th2 e B autorreativas reconhecem diferentes domínios do epítipo da proteína BP180 (ANTIGA et al., 2014; PICKFORD et al., 2015; XU et al., 2001; ZAKKA; RECHE; AHMED, 2011).

O mecanismo da patogênese do PB envolve respostas celular e humoral contra proteínas localizadas na ZMB, mais especificamente nos hemidesmosomos. Estruturalmente, o hemidesmosomo é constituído por uma placa de ligação citosólica, na qual estão ancorados os filamentos intermediários, a plectina e uma das proteínas que é alvo antigênico no PB, a BP230 (Figura 1). A outra porção do hemidesmosomo fica restrita ao meio extracelular, e tem em sua constituição a integrina $\alpha 6\beta 4$ e a proteína BP180 (GENOVESE et al., 2019; HAMMERS; STANLEY, 2020; KERSHENOVICH; HODAK; MIMOUNI, 2014).

Figura 1 - Representação estrutural do hemidesmosomo e suas moléculas de adesão, com destaque para BP230 e BP180, os principais alvos dos autoanticorpos no PB, Legenda: BMZ: zona da membrana basal; Col: colágeno; KIF: filamento intermediário de queratina; Lam332: laminina 332. (Imagem: HAMMERS & STANLEY, 2020).

A proteína BP230 que compõe a placa hemidesmossômica intracelular, apresentam peso molecular referente a 230-kDa, e também pode ser referida como antígeno do BP tipo 1 (BPAG1) ou distonina (Figura 1). O BP230 possui um domínio globular na sua extremidade C-terminal, sendo esse domínio o principal local de ancoragem dos anticorpos anti-BP230, os quais são detectados em cerca de 60 a 70% dos pacientes com PB (KASPERKIEWICZ; ZILLIKENS; SCHMIDT, 2012; SCHMIDT; ZILLIKENS, 2010). Os níveis séricos de anti-BP230 não apresentam correlação coerente com a atividade da doença (CHARNEUX et al., 2011; ROUSSEL et al., 2011).

A proteína BP180, também designada de antígeno do BP tipo 2 (BPAG2) ou colágeno tipo XVII, é uma glicoproteína transmembrana de 180-kDa que tem como região imunodominante extracelular a porção *non-collagenous* 16A (NC16A) (Figura 1), reconhecida pelos anticorpos anti-BP180 (HAMMERS; STANLEY, 2016, 2020; NISHIE, 2014). Os anticorpos anti-BP180 são detectados em cerca de 80 a 90% dos pacientes afetados (ISHIURA et al., 2008; MARIOTTI et al., 2004; SAKUMA-OYAMA et al., 2004), e estão associados à atividade da doença (FENG et al., 2008; HOLTSCHKE et al., 2018; SCHMIDT et al., 2000; TSUJI-ABE et al., 2005). A produção de anticorpos dirigidos contra outros epítomos do BP180, como a extremidade C-terminal, têm sido associados com manifestações clínicas do PB com comprometimento das mucosas (DI ZENZO et al., 2004; HOFMANN et al., 2002).

Em condições normais, os hemidesmossomos em sinergia com os desmossomos e junções de ancoragem promovem a adesão das células epiteliais à lâmina basal. Entretanto, no PB observa-se a perda de tolerância imunológica (HAMMERS; STANLEY, 2020), e autoanticorpos anti-BP180 e / ou anti-BP230 são redirecionados contras as proteínas localizadas nos hemidesmossomos e ocorre o surgimento da bolha subepidérmica, uma das principais características do PB.

Embora a autoimunidade seja a causa do desenvolvimento do PB, os mecanismos envolvidos na perda de autotolerância ainda permanecem inconclusivos. Alguns trabalhos propõe que um desequilíbrio entre as células T regulatórias (Treg) e células T auxiliares (Th) autorreativas poderiam desencadear a autoimunidade em indivíduos com predisposição genética para o PB (HAEBERLE et al., 2018; HERTL; EMING; VELDMAN, 2006; QUAGLINO et al., 2012). Nesta proposta, uma célula apresentadora de antígeno (APC), que expressa MHC classe II, desempenharia papel na apresentação dos autoantígenos BP180 e/ou BP230 para as células T autorreativas levando à ativação de células T, com consequente

liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, também ocorreria regulação positiva de moléculas co-estimuladoras na superfície da APC e ativação de células B autorreativas contra a proteína BP180 (THOMA-USZYNSKI et al., 2006; UJIIE et al., 2019). Outros trabalhos relatam que a perda da autotolerância no PB poderia ser resultante da ligação de receptores de células B e receptores do tipo toll (TLR) a autoantígenos que apresentam um ligante TLR endógeno (GENOVESE et al., 2019; SHLOMCHIK, 2009). Esse mecanismo resultaria na ativação de células B e, conseqüentemente, na secreção de autoanticorpos específicos contra BP180 e BP230.

Recentemente, Hammers e Stanley (2020) em um trabalho de revisão, descreveram o envolvimento dos anticorpos IgG e IgE, complemento, eosinófilos e mastócitos na patofisiologia do PB e discutiram os diferentes mecanismos pelos quais os autoanticorpos promovem o destacamento da junção derme-epiderme com conseqüente formação da bolha subepidérmica.

O mecanismo mais comumente descrito envolve o reconhecimento da proteína BP180 pelo anticorpo da classe IgG, na ZMB. Com isso, o complemento é ativado pela via clássica, promovendo a degranulação de mastócitos e recrutamento de neutrófilos para a ZMB, como mostra a Figura 2. As células Th17, por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17, parecem estar envolvidas no recrutamento de neutrófilos e eosinófilos (PATEL et al., 2017; SCHMIDT et al., 2017), com níveis elevados correlacionados com a recidiva da doença.

Os neutrófilos e eosinófilos, juntamente com a granzima B (RUSSO et al., 2018), também desempenham papel na fisiopatologia, promovendo a clivagem da proteína BP180 por meio da liberação de enzimas proteolíticas que comprometem a adesão das células à ZMB, resultando na separação entre a epiderme e a derme na pele e / ou na separação do epitélio com o sub-epitélio nas membranas mucosas, ocasionando a formação de bolhas subepidérmicas cutâneas e / ou mucosas.

A maioria dos pacientes com PB apresentam anticorpos que se ligam ao epítopo NC16A do BP180, entretanto, um estudo evidenciou que 14 de 121 pacientes com PB apresentam anticorpos direcionados contra a porção média do BP180 extracelular e não ao epítopo NC16A (IZUMI et al., 2016). Um dado interessante que foi constatado pelos autores, é que a maioria dos pacientes faziam uso do inibidor da dipeptidil peptidase-IV (DPP-4) para diabetes.

Um outro mecanismo sugere que o anticorpo anti-BP180 IgG, sob algumas circunstâncias, é capaz de induzir a formação da bolha subepidérmica sem ativação do

complemento (SASAOKA et al., 2018). O anti-BP180 IgG internaliza a proteína BP180, provavelmente por macropinocitose, e com isso os queratinócitos secretam IL-6 e IL-8 que promovem a ativação e recrutamento dos neutrófilos para a ZMB, comprometendo a adesão celular.

O último mecanismo proposto envolve a imunoglobulina da classe IgE, pois sabe-se que mais de 70% dos pacientes com PB apresentam níveis séricos elevados de IgE (HURSKAINEN et al., 2015; YANCEY, 2015). A IgE se dirige contra ambos os epítomos do BP180 NC16A e *non* NC16A (FAIRLEY; CHANG; GIUDICE, 2005), e também contra a proteína BP230 (GHOHESTANI et al., 1998). Neste mecanismo, o complemento não é ativado, assim, a IgE anti-BP180 ou anti-BP230 internaliza a proteína (BP180 ou BP230) e promove a degranulação dos mastócitos (DIMSON et al., 2003) que recrutam os neutrófilos para a ZMB, resultando na formação da bolha subepidérmica.

Figura 2 - Vias fisiopatológicas do penfigoide bolhoso resumidas nesta revisão. Legenda: GzmB: granzima B; EC: ectodomínio; MC: mastócito; NE: elastase de neutrófilos. (Imagem: HAMMERS & STANLEY, 2020).

2.2 – PENFIGOIDE BOLHOSO E DOENÇAS NEUROLÓGICAS

A primeira observação da associação de PB com DN decorreu de um estudo retrospectivo, conduzido na França por CHOSIDOW et al. (2000), em amostragem de 168 pacientes com esclerose lateral amiotrófica e, dentre essa amostragem, três pacientes tinham diagnóstico confirmado de PB. Sugeriram possível inter-relação entre os antígenos do PB com neurofilamentos.

Nas últimas duas décadas, a prevalência da associação de doenças neurológicas (DNs) com o PB vem aumentando e tem sido relatada em diversas populações. A demência precedendo o surgimento do PB tem sido a mais frequentemente descrita (KALIŃSKA-BIENIAS et al., 2019; KHOSRAVANI et al., 2017; KWAN et al., 2015; LANGAN; GROVES; WEST, 2011; MESSINGHAM et al., 2019; PAPAKONSTANTINO et al., 2019). No Brasil, há um trabalho mostrando que 9 de 25 pacientes com PB apresentaram associação com DN, sendo a demência e o AVC os mais prevalentes (TARAZONA et al., 2015). Mais recentemente, o nosso grupo de estudo também relatou prevalência de 26% de DN em 50 pacientes com PB atendidos no serviço de Dermatologia do HC-FMRP-USP, dentre eles 16% tiveram o diagnóstico de demência, 6% de AVC e 4% foram diagnosticados com epilepsia (JULIO et al., 2018).

Diversos trabalhos sugerem que a associação entre PB e DN ocorra porque os antígenos envolvidos na patogênese do PB também são expressos no sistema nervoso central. A análise da origem embrionária nos mostra que tanto o tecido epitelial quanto o tecido neural tiveram suas origens do folheto ectodérmico. Além disso, quando a linhagem embrionária é proveniente de um mesmo precursor há a possibilidade de isoformas moleculares apresentarem funções análogas em ambos os tecidos (NEAU et al., 2014).

CLAUDEPIERRE et al., em 2005, em experimentos animais, confirmaram a expressão das proteínas hemidesmosomais - o colágeno XVII (BP180) e o BPAG1 (BP230) - nos neurônios do SNC e nos fotorreceptores de sinapse na retina de bovinos. Com esses resultados, subentende-se que, além das proteínas hemidesmosomais constituírem moléculas fundamentais na adesão da epiderme com a derme, elas certamente atuam na regulação de processos sinápticos.

A literatura já elucidou que o antígeno BP230 (BPAG1) apresenta isoformas alternadas, incluindo a epitelial (BPAG1e), muscular (BPAG1b) e a neural (BPAG1a) (BOUAMEUR; FAVRE; BORRADORI, 2014; KÜNZLI et al., 2016). Embora há relatos de que diversas

algumas áreas do cérebro humano – córtex, hipocampo e neurônios do corpo amigdalóide – expressem o antígeno BP180 (SEPPÄNEN, 2013; SEPPÄNEN et al., 2006, 2007), recentemente, um estudo utilizando amostras *post-mortem* de hipocampo humano de 19 indivíduos com diagnóstico confirmado de DN, porém sem histórico de PB, não conseguiu detectá-lo (BARRICK et al., 2016).

A alta prevalência das DNs entre os pacientes com PB somada ao fato das DNs antecederem o surgimento do PB podem ser explicada pela reatividade cruzada entre as isoformas BP180 e BP230 expressas na pele e no cérebro, como demonstram os estudos citados anteriormente. Messingham et al. (2015) mostraram que 1/3 dos pacientes com Doença de Parkinson apresentavam níveis séricos elevados de autoanticorpos contra o colágeno XVII (BP180), os quais se ligam aos neurônios tirosina hidroxilase positivos. Um estudo recente apontou um resultado surpreendente, 53,6% dos pacientes diagnosticados com esclerose múltipla apresentavam autoanticorpos reativos à porção correspondente a 180-kDa em *immunoblots* realizados com a proteína BP180 humano recombinante como substrato (TUUSA et al., 2019).

O fenômeno da reatividade cruzada para elucidar a associação do PB com DNs levanta especulações de como seria possível os autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 transitarem entre cérebro e pele, e ainda, gerar resposta imune contra os autoantígenos presentes em ambos os tecidos. O trabalho de MEUDEEC et al., (2019) contribuiu para o esclarecimento dessas indagações, pois apresentam evidências da presença de autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 no líquido cefalorraquidiano de pacientes que apresentam a associação clínica de PB e DN. Os autores propõem a hipótese de uma autoimunidade primária anti-neural no PB, com um envolvimento secundário da pele.

Por último, demais estudos tem contribuído para documentar associação existente entre PB e DNs. KOKKONEN et al. (2017) mostraram que níveis séricos elevados de autoanticorpos anti-BP180, em pacientes com doença de Alzheimer, estão associados com o declínio cognitivo dos pacientes e, consequentemente, com a severidade da demência. Além disso, alguns estudos epidemiológicos mostram que as DNs ocorrem quatro vezes mais frequentemente em pacientes com PB quando comparados com outras dermatoses bolhosas autoimunes (LAI; YEW; LAMBERT, 2016).

2.3 – DOENÇAS NEUROLÓGICAS E ASTRÓCITOS

Além dos neurônios, o Sistema Nervoso Central (SNC) também é constituído por células gliais, que são consideradas células auxiliares, pois apresentam papel importante no suporte e ações a fim de garantir o funcionamento adequado do mesmo.

Os astrócitos, além de ser o tipo celular mais numeroso do cérebro (FROST; LI, 2017; RICCI et al., 2009), eles desempenham funções fisiológicas e estruturais do SNC. São responsáveis por manter a integridade da barreira hematoencefálica; fazem contato com a superfície de neurônios adjacentes; controlam a homeostasia extracelular; atuam na plasticidade e remodelamento sináptico; encapsulam os vasos sanguíneos por meio de seus prolongamentos (DINIZ et al., 2018; NAGELE et al., 2004). Além disso, na sua superfície são encontrados diferentes receptores, o que os tornam uma célula com característica dinâmica, pois são aptos a responder a diversos compostos neuroativos, desde os neurotransmissores, neuropeptídeos até mesmo a citocinas, fatores de crescimento e toxinas (LIBERTO et al., 2004).

Os astrócitos, juntamente com a micróglia, são considerados um eficiente sistema imune inato do SNC, sendo as principais células envolvidas na neuroinflamação e morte dos neurônios dopaminérgicos. Portanto, a desregulação ou ativação excessiva das células da glia podem resultar em processos neurodegenerativos (GAO et al., 2002; LIU; HONG, 2003).

Na vasta maioria dos processos de neurodegeneração e neuroinflamação são encontradas alterações no estado funcional dos astrócitos. Nos últimos anos, alguns estudos tem demonstrado que os astrócitos apresentam alterações na expressão de proteínas, sob condições patológicas, como na Doença de Alzheimer (FROST; LI, 2017; NAGELE et al., 2004; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2016). Dentre as proteínas, estão as de adesão celular, citoesqueleto, proteases, inibidores de proteases, fatores de crescimento e citocinas (VAN ELDIK, 2001). Além disso, o número de astrócitos reativos também aparecem elevados na Doença de Alzheimer, o que leva a um aumento da atividade inflamatória local, pois ocorre o aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ e espécies reativas de oxigênio (AGULHON et al., 2012; ALAM et al., 2016; MURAI; PASQUALE, 2011; TZENG; HSIAO; MAK, 2005).

2.4 - MIMETISMO MOLECULAR E AUTOIMUNIDADE

O termo "mimetismo molecular" foi utilizado pela primeira vez por Damian, em 1964, para relatar a existência de antígenos semelhantes expressos tanto por patógenos quanto por seus hospedeiros humanos. Em 1966, ZABRISKIE e FREIMER descobriram que a membrana celular dos *Streptococcus* do Grupo A compartilha estruturas semelhantes com o tecido cardíaco de mamíferos. Essa descoberta elucidou o mecanismo de reatividade cruzada proposto por KAPLAN e SUCHY, em 1964, para explicar o quadro de febre reumática em um paciente com antecedente de infecção estreptocócica.

Posteriormente, baseado em evidências epidemiológicas e experimentais, foi possível elucidar o papel das doenças infecciosas na autoimunidade por mimetismo molecular e reatividade cruzada (BENVENGA; GUARNERI, 2016; CUNNINGHAM, 2019; CUSICK; LIBBEY; FUJINAMI, 2012; PAHARI et al., 2017; ROJAS et al., 2018). Portanto, o mimetismo molecular consiste na reação cruzada entre dois antígenos, nos quais a sequência molecular evidencia trechos curtos de homologia. Assim, a resposta imunológica contra um determinado antígeno externo pode resultar em reações contra um antígeno próprio (ABBAS et al., 2011). Há um vasto número de trabalhos que elenca a diversidade de antígenos externos que são capaz de desencadear resposta imune em linfócitos específicos, desde vírus e bactérias (CHIURI et al., 2013; COPPIETERS; WIBERG; VON HERRATH, 2012; GETTS et al., 2013; MACHADO et al., 2017; ZHENG et al., 2018), e outros como os peptídeos presentes nos alimentos da dieta (CHIA et al., 2017; VOJDANI, 2011; VOJDANI; GUSHGARI; VOJDANI, 2020), adjuvantes (PELLEGRINO; CLEMENTI; RADICE, 2015; WATAD et al., 2018, 2019), vacinas (AHMED et al., 2015; KATZAV et al., 2013; PARTINEN et al., 2014) e os produtos químicos que apresentam interferentes endócrinos, tais como ftalatos, bisfenol-A, bifenil policlorado, pesticidas (organoclorados e organofosforados), aditivos cosméticos, entre outros (ALHOMAIDAN et al., 2019; BENVENGA et al., 2020; MERRHEIM et al., 2020; PREDIERI et al., 2020; WAKABAYASHI et al., 2008).

Na figura 3 estão esquematizados os quatro critérios principais que são utilizados para caracterizar o mimetismo molecular: A) Detecção de homologia entre o antígeno externo (microrganismos ou agente ambiental) e o antígeno do hospedeiro, o qual pode estar expresso em células, tecidos, glândulas; B) Detecção de autoanticorpos ou células T autorreativas que apresentam reação cruzada com ambos os antígenos externo e próprio; C) Relação

epidemiológica entre o surgimento da doença autoimune e exposição ambiental ou ao agente infeccioso; D) Reprodutibilidade da autoimunidade em modelo animal após sensibilização com antígenos específicos, após contato com o agente infeccioso ou exposição ambiental (ROJAS et al., 2018).

Figura 3 – Critérios para detecção de mimetismo molecular esquematizados a partir da relação do surgimento da síndrome de guillain-barré (GBS) com exposição ao agente infeccioso *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*). **A.** Evidência de homologia entre epítopos da membrana do agente com a estrutura GM1 localizada nos nervos periféricos do hospedeiro. **B.** As células T autorreativas ou os autoanticorpos devem ser capazes de induzir resposta cruzada contra o epítipo GM1 do hospedeiro e contra o epítipo GM1-like LOS do agente infeccioso. **C.** Relação epidemiológica entre a exposição ao agente ambiental e o surgimento da doença autoimune. Neste gráfico, o OR para o desenvolvimento de GBS é 58,7 com um intervalo de confiança de 95% de 36,9 a 105,2. **D.** Reprodutibilidade da autoimunidade em um modelo animal. Camundongos inoculados com *C. jejuni* ou transferência de células T e B autorreativas induzem o desenvolvimento de fraqueza flácida de membros semelhantes a GBS e confirmam mimetismo molecular. Imagem disponível em ROJAS et al., 2018.

3.1 - OBJETIVO GERAL

Tem-se por objetivo geral investigar o mimetismo molecular entre as proteínas hemidesmosomais da pele humana e as proteínas expressas em linhagens de astrócitos na relação PB e demência.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Demonstrar se as linhagens de queratinócitos (DJM-1) e de astrócitos (TM-31) humanos expressam as proteínas hemidesmosomais BP180 e BP230;
- ii. Avaliar se autoanticorpos contra BP180 e / ou BP230, presentes nos soros de pacientes com PB, demência e controles idosos reconhecem proteínas expressas nos queratinócitos e astrócitos humanos;
- iii. Comparar o reconhecimento das proteínas de 180-kDa e 230-kDa nos queratinócitos e astrócitos pelas amostras de soro dos pacientes dos grupos PB, demência e controles.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo é continuidade do trabalho de Mestrado da aluna “MARCADORES SOROLÓGICOS *BULLOUS PEMPHIGOID* 180/230 E FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) NA RELAÇÃO PENFIGOIDE BOLHOSO E DEMÊNCIA”, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCRP-FMRP-USP), número do CAAE 57749716.5.0000.5440, em 26 de junho de 2017 (ANEXO A). Sendo assim, as amostras de sangue dos pacientes já haviam sido coletadas pela aluna durante o desenvolvimento do seu projeto de Mestrado, e estocadas no Banco de amostras do Laboratório de Dermatologia HC-FMRP-USP (aprovado pelo CEP local #051174/2015). Foram coletadas apenas amostras de sangue por punção venosa dos participantes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (vide APÊNDICE A) pós-informação. Foram excluídos do estudo aqueles que não aceitaram assinar o TCLE.

4.2 – POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.2.1 – Caracterização da população estudada

Pacientes com PB foram atendidos no ambulatório de dermatoses bolhosas autoimunes do HC-FMRP-USP, no período de 1993 a 2017, tiveram os achados clínicos confirmados por exames histopatológico e imunofluorescência direta (IFD) na biopsia da lesão, e por imunofluorescência indireta (IFI), confirmando depósito de IgG no teto da clivagem pela técnica de *Salt Split Skin* (SSS).

Para compor o grupo demência, foram incluídos os pacientes em seguimento no ambulatório de demências, os quais preencheram os critérios estabelecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM5) (EROGLU S., TOPRAK S., URGAN O, MD, OZGE E. ONUR, MD, ARZU DENIZBASI, MD, HALDUN AKOGLU, MD, CIGDEM OZPOLAT, MD, EBRU AKOGLU, 2012) e, portanto, diagnosticados com demência pelos profissionais da clínica de geriatria do HC-FMRP-USP – coordenada pelo Prof. Dr. Julio Moriguti, assim como a avaliação do mini exame do estado mental (MEEM) (ANEXO B) e a escala de avaliação clínica da demência (CDR), ferramentas de diagnóstico descritas por

MORRIS, 1993 (ANEXO C). Os tipos de demência que constituem o grupo demência são: demência devido à doença de Alzheimer e demência mista (Alzheimer e AVC).

No grupo controle, foram incluídos indivíduos com idade superior a 60 anos sem evidência de doença neurológica, os quais foram recrutados no ambulatório de catarata da Oftalmologia do HC-FMRP-USP, sob coordenação do Prof. André Messias. Como critério de inclusão foi avaliado o estado mental, empregando-se o MEEM. Ainda no grupo controle, foram excluídos da casuística os indivíduos portadores de outras doenças autoimunes, que faziam uso de medicamentos imunossupressores e corticoides, e indivíduos transplantados.

No projeto de Mestrado da aluna a casuística foi composta por: 50 pacientes com PB, 50 pacientes com demência e 50 controles, constituindo um estudo comparativo entre os 3 grupos. As características demográficas estão apresentadas na Tabela 1. Considerou-se a data da coleta da amostra de sangue para definição: da idade dos pacientes e controles; tempo de doença (grupo PB); e estar em tratamento ou não (grupo PB). Não houve predomínio do gênero nos grupos estudados ($p = 0,779$). Em relação à idade, o grupo demência mostrou maior idade em relação aos grupos PB e controles ($p < 0,001$).

A Tabela 1 também mostra o resultado do teste ELISA para os autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 nos grupos de estudo (resultados disponíveis em JULIO et al., 2018). Como já esperado, pacientes com PB apresentaram maior porcentagem de positividade do ELISA para anti-BP180 (74%) e anti-BP230 (40%) quando comparados com os demais grupos. Chama a atenção que 14% dos controles apresentaram anticorpos anti-BP180 e, no grupo demência, 10% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, ambos em igual porcentagem (10%).

Ainda, a Tabela 1 mostra a frequência de positividade da IFI-SSS, chamando a atenção a positividade nos pacientes do grupo demência. Dos 7 pacientes do grupo controle que tiveram positividade no ELISA, todas as IFI apresentaram resultado negativo, enquanto que dos 10 pacientes do grupo demência que apresentaram positividade no ELISA, observou-se o depósito de IgG no teto da clivagem em 2 amostras de soro, guardando semelhança ao PB.

Tabela 1- Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos penfigoide bolhoso (PB), demência e controles

		PB N = 50 N (%)	Demência N = 50 N (%)	Controles N = 50 N (%)	Valor de P
Gênero	Masculino	19 (38)	19 (38)	22 (44)	$X_2 = 0,5$ $p = 0,7788$
	Feminino	31 (62)	31 (62)	28 (56)	
Idade (anos)	Mediana	75*	82,5* _δ	74 _δ	ANOVA $p < 0,0001^{*δ}$
	Min./Max.	43/92	60/92	51/93	
ELISA anti-BP180	Positivo	37 (74)	5 (10)	7 (14)	$X_2 = 58,436$ $p < 0,00001^{*}$
	Negativo	13 (27)	45 (90)	43 (86)	
ELISA anti-BP230	Positivo	20 (40)	5 (10)	1 (2)	$X_2 = 28,0087$ $p < 0,00001^{*}$
	Negativo	30 (60)	45 (90)	49 (98)	
IFI-SSS	Positivo	39 (78)	2	0	NA
	Negativo	11 (22)	NA	NA	

Legenda: BP: *Bullous Pemphigoid*; Min./Max.: Mínima/Máxima; IFI-SSS: Imunofluorescência indireta associada à técnica de *Salt Split Skin*. Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis.

4.2.2 Composição da casuística para processamento das análises

Para o atual projeto de Doutorado, optou-se por desenvolver um estudo demonstrativo com a seleção de alguns pacientes do grupo populacional estudado durante o projeto de Mestrado.

Grupo de pacientes com PB: As amostras de soros de pacientes com PB foram selecionadas segundo a associação ou não com DN. Foram selecionados todos os pacientes que apresentaram associação clínica do PB com a demência totalizando 7 amostras; todos os pacientes que apresentaram PB associado a outras DN que não demência totalizando 5 amostras, sendo 2 pacientes com epilepsia e 3 com acidente vascular cerebral (AVC). Pacientes com PB exclusivo foram selecionados pareando idade e sexo com os demais subgrupos de PB.

Grupo de pacientes com demência: As amostras foram selecionadas segundo a positividade nos títulos de ELISA anti-BP180 e anti-BP230: 7 amostras de pacientes com anti-BP180 e anti-BP230 positivos; e 7 amostras de pacientes com anti-BP180 e anti-BP230 negativos.

Grupo de Controles idosos: As amostras foram selecionadas segundo a positividade nos títulos de ELISA anti-BP180 e anti-BP230: 7 amostras de pacientes com anti-BP180 e anti-BP230 positivos; e 7 amostras de pacientes com anti-BP180 e anti-BP230 negativos.

As características demográficas dos pacientes selecionados para este estudo demonstrativo estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos subgrupos penfigoide bolhoso (PB) exclusivo, PB associado a demência (Demência-PB), PB

		Penfigoide Bolhoso (PB)			Demência	Controles	Valor de <i>P</i>
		PB exclusivo	Demência-PB	PB com outras DNs			
		N = 7 N (%)	N = 7 N (%)	N = 5 N (%)	N = 14 N (%)	N = 14 N (%)	
Gênero	Masculino	4 (57,1)	2 (28,6)	2 (40)	6 (42,9)	7 (50)	$X_2 = 1,3982$ $p = 0,8445$
	Feminino	3 (42,9)	5 (71,4)	3 (60)	8 (57,1)	7 (50)	
Idade (anos)	Média	71,57	78,71	85	82,71*	73,21*	ANOVA $p = 0,0088^*$
	SD	12,46	5,53	4,85	4,43	11,38	
ELISA anti-BP180	Positivo	4 (57,1)	6 (85,7)	3 (60)	3 (21,4)	7 (50)	$X_2 = 8,4683$ $p = 0,0759$
	Negativo	3 (42,9)	1 (14,3)	2 (40)	11 (78,6)	7 (50)	
ELISA anti-BP230	Positivo	2 (28,6)	5 (71,4)	2 (40)	4 (28,6)	1 (7,1)	$X_2 = 9,5003$ $p = 0,0497^*$
	Negativo	5 (71,4)	2 (28,6)	3 (60)	10 (71,4)	13 (92,9)	
IFI-SSS	Positivo	6 (85,7)	7 (100)	4 (80)	2	0	NA
	Negativo	1 (14,3)	0	1 (20)	NA	NA	

Legenda: *Estatisticamente significativo; SD: Standard derivation (Desvio-Padrão); IFI-SSS: imunofluorescência indireta associada à técnica de *Salt Split Skin*; NA: Não aplicável ao grupo. No ensaio ELISA, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos.

4.3 – LINHAGENS CELULARES

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizadas duas linhagens celulares adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). DJM-1 (cat.0375) é uma linhagem celular epitelial proveniente de cisto triquilemal maligno, rica em proteínas hemidesmosomais. Abaixo encontram-se as especificações fornecidas pelo BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro – Fiocruz) e a imagem de microscopia das células (Figura 4).

BCRJ code:	0375
Cell Line:	DJM-1
Species:	<i>Homo sapiens</i>
	Vulgar Name: Human
Tissue:	Skin
Morphology:	Epithelial
Disease:	Malignant trichilemmal cyst
Growth Properties:	Adherent
Sex:	FEMALE
Age Ethnicity:	87 years; Japanese
Biosafety:	1
Additional info:	Malignant trichilemmal cyst cells. Strongly laminin positive on cell surface. Serum-free culturable.

Figura 4. Imagem das células DJM-1 obtidas por microscópio de luz no momentos do recebimento da linhagem.

TM-31 (cat.0379) é uma linhagem de células da glia (astrócitos), proveniente de astrocitoma desenvolvido em um paciente com neurofibromatose Tipo I. Abaixo encontram-se as especificações fornecidas pelo BCRJ e a imagem de microscopia da célula ao recebimento (Figura 5).

BCRJ code:	0379
Cell Line:	TM-31
Species:	<i>Homo sapiens</i>
	Vulgar Name: Human
Tissue:	Brain
Morphology:	Fibroblast-like
Disease:	Astrocytoma
Growth Properties:	Adherent
Sex:	FEMALE
Age Ethnicity:	42 years; Japanese
Derivation:	Human cell line derived from astrocytoma developed in a patient with NF-1 (neurofibromatosis type 1)
Biosafety:	1

Figura 5. Imagem das células TM-31 obtidas por microscópio de luz ao recebimento da linhagem (BCRJ - 13ª passagem).

Resumidamente, células DJM-1 foram crescidas em meio MEM (Minimum Essential Medium) (cat.M4655, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) e as células TM-31 em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) da Gibco (ThermoFisher NY, EUA). Os meios de cultura foram suplementados com: 10% v/v de soro fetal bovino (cat.F2561, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA), 100 U/mL penicilina e 100 g/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA). As células foram cultivadas até confluência em garrafas de cultivo celular a 37 °C e 5% de CO₂. Ao atingirem 90% de confluência, elas foram removidas dos frascos de cultivo utilizando-se Tripsina-EDTA (cat.T4174, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) por 5 minutos a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após centrifugação a 100 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura para posterior quantificação e padronização do número de células.

4.4 – IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

As células DJM-1 e TM-31 foram cultivadas por 48 horas em lamínulas de vidro (concentração de células por poço: 2x10⁵ células para DJM-1; e 1,5x10⁵ células para TM-31) a 37 °C e 5% de CO₂. Após a confluência e adesão das células nas lamínulas, elas foram fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton em solução de bloqueio [albumina do soro bovino (BSA) 1% em PBS] (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a temperatura ambiente, e bloqueadas com 1% de BSA em PBS por 45 minutos em temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpos primários (anti-Colágeno XVII e anti-BPAG1) diluídos em solução de bloqueio, durante 30 minutos à 37 °C. Em seguida, foram incubadas com seus respectivos secundários conjugados com Alexa, todos diluídos em solução de bloqueio, durante 30 minutos a temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glasse, Bielefeld, Alemanha) com o meio Fluoromount (Electron Microscopy Sciences). As células foram visualizadas por meio de microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC), pertencente ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.5 - OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DOS LISADOS CELULARES DJM-1 E TM-31

Para a realização do *immunoblot*, as células foram lisadas por 20 min no gelo utilizando tampão de lise [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100] suplementado com coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA) e centrifugadas por 20 min/20.000g/4°C. O sobrenadante pós-nuclear foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada e equalizada com o reagente DC Protein Assay (cat.500-0116, BioRad, Califórnia, EUA) pela medida da absorbância a 720 nm em espectrofotômetro Evolution 60S (Thermo Scientific), obtendo a concentração de 5,8 ug/uL de DJM-1 e 2,1 ug/uL de TM-31. Às amostras foram adicionados iguais volumes de tampão de amostras [4% SDS, 160 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glicerol, 100 mM DTT e 0.005% de azul de bromofenol] em ebulição.

4.6 - SDS-PAGE E ELETROTRANSFERÊNCIA

Proteínas dos extratos celulares totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% com corrente constante de aproximadamente 120 volts. O gel contendo os perfis proteicos foi equilibrado em tampão para transferência (25 mM Tris e 190 mM Glicina em Metanol 10%). O suporte para transferência foi colocado dentro de uma cuba de transferência, de modo que a membrana de nitrocelulose (BioRad, Califórnia, EUA) ficasse voltada para o polo positivo. A eletrotransferência foi realizada a 360 mA por 1 hora e 15 minutos. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1 % em ácido acético 5%).

4.7 - IMUNODETECÇÃO EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE

As membranas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,1% (PBS-T) e incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA em PBS-T) por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (intervalos de 5 minutos entre lavagens), incubadas com anticorpos primários (anti-Colágeno XVII e anti-BPAG1) na diluição 1:1000 e com os soros de pacientes (19 PB, 14 demência e 14 controles) na diluição 1:200 *overnight* e lavadas novamente com PBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com

anticorpo secundário adequado conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) por 1 hora sob agitação e lavadas com PBS-T. Após a incubação, as membranas foram lavadas 5 vezes com PBS-T. Para detecção das proteínas utilizou-se solução de ECL (enhanced chemiluminescence) [solução 1: 1 M Tris-HCl (pH 8,5), 250 mM luminol, 90 mM ácido p-coumárico; e solução 2: 30% H₂O₂, 1 M Tris-HCl (pH 8,5)] com subsequente exposição das membranas e captação do sinal por ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad).

4.9 – ANTICORPOS

Os anticorpos utilizados para as técnicas de *immunoblot* e imunofluorescência estão descritos na Tabela 3, assim como seus respectivos fabricantes.

Tabela 3 – Especificações dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Fabricante, número de catálogo e especificações	Diluição do anticorpo
anti-Collagen XVII [EPR18614]	Abcam (cat. AB184996), Monoclonal antibody Host: rabbit	IB = 1:1000 IF = 1:1000
Anti-BPAG1	Santa Cruz (SC293499) Monoclonal antibody Host: mouse	IB = 1:1000* IF = 1:1000*
Mouse IgG HRP linked whole AB	Abcam (cat. ab112458) Secondary antibody Host: chicken	IB = 1:15000
Rabbit IgG HRP linked whole AB	GE Healthcare (cat. NA934) Secondary antibody Host: donkey	IB = 1:15000
Human IgG HRP linked whole AB	GE Healthcare (cat. NA933) Secondary antibody Host: sheep	IB = 1:20000
F(ab') ₂ Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	Invitrogen (cat. A-11072) Polyclonal Secondary antibody Host: goat	IF = 1:1000
F(ab') ₂ Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Invitrogen (cat. A-21237) Polyclonal Secondary antibody Host: goat	IF = 1:1000

Legenda: IB = *Immunoblot*; IF = Imunofluorescência; *diversas diluições foram utilizadas a fim de testar o anticorpo, uma vez que o mesmo não funcionou.

4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no software Graphpad Prism 8.0 para Mac Os X (La Jolla Califórnia EUA), adotando-se nível de significância de 5% com valor de $p \leq 0,05$. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA para verificar se houveram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos de estudo, e a correção de Bonferroni foi usada para a comparação múltipla.

Para a análise interpretativa do cruzamento entre os resultados qualitativos obtidos no *immunoblot* nos grupos PB, demência e controles, os dados foram pelo teste do qui-quadrado (χ^2). O teste exato de Fisher foi usado quando os dados eram escassos. O teste de McNemar foi usado para comparar dados pareados.

5.1 – EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS HEMIDESMOSSOMAIS NAS LINHAGENS DJM-1 E TM-31

Na técnica de *immunoblot*, o anticorpo monoclonal ao colágeno XVII humano (BP180) reconheceu a proteína de 180-kDa nas células DJM-1 (Fig. 6A), que são queratinócitos enriquecidos com proteínas hemidesmosomais. Além disso, uma proteína de peso molecular correspondente a 120-kDa também foi reconhecida. O principal resultado foi o reconhecimento de uma proteína com peso molecular correspondente a 180-kDa nos astrócitos pelo anticorpo anti-BP180 (Fig. 6B), o que pode indicar uma possível expressão da isoforma neural da proteína BP180 nos astrócitos.

Figura 6. Anticorpo monoclonal anti-BP180 reconhece a proteína 180-kDa nos queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31). Quantidades equivalentes de lisados celular de queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31) foram submetidas ao *immunoblot*, utilizando anticorpo comercial anti-BP180. (A) Anticorpo anti-BP180 reconhece 120- e 180-kDa em lisado celular de queratinócitos. (B) A proteína 180-kDa no lisado celular de astrócitos foi reconhecida pelo anticorpo anti-BP180.

A expressão da proteína BP180 tanto nos queratinócitos quanto nos astrócitos, foi confirmada pela técnica de imunofluorescência usando o anticorpo comercial anti-BP180. A análise de microscopia confocal revelou que a proteína BP180 está amplamente distribuída na região da membrana celular dos queratinócitos (DJM-1), evidenciada pela forte marcação do

Alexa-594 (Fig. 7 A1-A2). No entanto, também podemos observar uma discreta fluorescência dispersa no citoplasma da DJM-1. Nos astrócitos, a localização da proteína BP180 é mostrada como mais dispersa na região intracitoplasmática (Fig. 7 B1-B2). Embora a expressão da proteína BP180 nos astrócitos se comporte de forma diferente dos queratinócitos, os resultados do *immunoblot* corroboram a expressão da BP180 em ambas as linhagens celular.

Figura 7. Imunofluorescência evidencia a expressão da proteína BP180 nas células de queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31). As células foram incubadas com o anticorpo comercial anti-BP180 e marcadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa-594 (canal vermelho). A fluorescência vermelha nas células indica a expressão da proteína BP180. Os núcleos foram corados pelo DAPI (cor azul). **(A)** Queratinócitos exibem fluorescência na membrana celular e levemente dispersas no citoplasma (A1) 63x (A2) Ampliação = 2.0x **(B)** Astrócitos mostram fluorescência intracitoplasmática (B1) 63x (B2) Ampliação = 2.0x.

Para o anticorpo comercial anti-BP230 (anti-BPAG1), os resultados foram negativos tanto no *immunoblot* quanto na imunofluorescência. Realizamos diversos ajustes nos protocolos a fim de excluir qualquer *troubleshooting*, porém, constatamos que o anticorpo não estava funcionando e decidimos continuar os estudos sem a utilização do mesmo.

5.2 – AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM PB, DEMÊNCIA E ALGUNS CONTROLES TÊM COMO ALVO AS PROTEÍNAS DE 180-KDA E 230-KDA NOS QUERATINÓCITOS E ASTRÓCITOS

5.2.1 GRUPO DE PACIENTES COM PENFIGOIDE BOLHOSO

5.2.1.1 Subgrupo PB exclusivo

No subgrupo de pacientes com PB exclusivo, o *immunoblot* evidenciou que 4 (57,1%) de 7 pacientes reconheceram a proteína 180-kDa nos queratinócitos, enquanto que 2 (28,6%) de 7 reconheceram a proteína 230-kDa (Fig. 8A). Como os pacientes deste subgrupo não apresentam manifestação clínica de nenhum tipo de doenças neurológicas (DNs), esperava-se que os soros não apresentassem autoanticorpos contra proteínas nos astrócitos (TM-31). Entretanto, 2 (28,6%) de 7 pacientes reagiram contra a proteína 180-kDa e 1 (14,3%) contra a proteína 230-kDa nos astrócitos (Fig. 8B).

Figura 8. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB exclusivo. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ) e 230-kDa (*).

Na tabela 4, a interpretação da reação dos anticorpos dos pacientes contra as proteínas

180- e 230-kDa evidenciada pelo *immunoblot* está apresentada juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 4- Dados laboratoriais dos pacientes penfigoide bolhoso (PB) exclusivo.

Amostra	ELISA		<i>Immunoblot</i>			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
1	49,9	3,4	+	-	-	-
2	98,9	6,5	+	-	-	-
3	137,9	128,9	-	+	+	+
4	4,6	2,3	+	-	-	-
5	0,9	0,7	-	-	-	-
6	5,3	2,9	+	+	+	-
7	159,2	72,0	-	-	-	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.1.2 Subgrupo PB com demência

Seis (85,7%) de 7 soros dos pacientes de PB com associação clínica com demência reconheceram a proteína de 180-kDa no lisado de queratinócitos (DJM-1), enquanto que nenhum dos soros dos pacientes reconheceram a proteína correspondente ao 230-kDa nesta mesma linhagem celular (Fig. 9A). Nos astrócitos, apenas 1 (14,3%) paciente reagiu contra a proteína 180-kDa e 3 (42,9%) reconheceram a proteína de 230-kDa (Fig. 9B).

Figura 9. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB associado a demência. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

A interpretação dos resultados obtidos no *immunoblot* está apresentada na tabela 5, juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 5- Dados laboratoriais dos pacientes com penfigoide bolhoso (PB) associado a demência.

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
8	85,4	4,8	+	-	-	-
9	151,6	146,9	+	-	-	+
10	20,8	14,8	+	-	-	+
11	79,9	14,8	+	-	-	-
12	169,2	23,3	+	-	-	+
13	141,3	8,6	+	-	-	-
14	4,4	68,1	-	-	+	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.1.3 Subgrupo PB com associação clínica de outras doenças neurológicas

Quatro (80%) de 5 soros reconheceram a proteína de 180-kDa nos queratinócitos e 3 (60%) a proteína de 230-kDa (Fig. 10A). Já nos astrócitos, apenas o soro de 1 (20%) reconheceu a proteína de 180-kDa, enquanto que 4 (80%) de 5 pacientes reconheceram a proteína de 230-kDa (Fig. 10B).

Figura 10. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo PB associado a outras doenças neurológicas. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

A interpretação dos resultados obtidos no *immunoblot* está apresentada na tabela 6, juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 6- Dados laboratoriais dos pacientes com penfigoide bolhoso (PB) associado a outras doenças neurológicas.

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
15	193,1	16,5	+	-	-	-

(continua)

(continuação)

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
16	191,7	7,3	+	+	-	+
17	5,3	1,7	+	-	-	+
18	107,3	4,5	+	+	+	-
19	4,6	27,5	-	+	-	+

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.2 GRUPO DE PACIENTES COM DEMÊNCIA

5.2.2.1 Subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230

Entre os pacientes do grupo demência que tiveram ELISA positivo para BP180 e / ou BP230, o soro de apenas 1 (16,7%) dos 6 pacientes reconheceu a proteína de 180-kDa nos queratinócitos, e o mesmo ocorreu para a proteína de 230-kDa que teve apenas 1 paciente reagindo contra (Fig. 11A). Nos astrócitos, nenhum soro dos pacientes reconheceu a proteína de 180-kDa, e apenas 1 (16,7%) soro reconheceu a proteína de 230-kDa (Fig. 11B).

Figura 11. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ) e 230-kDa (*).

Na tabela 7, a interpretação da reação dos anticorpos dos pacientes contra as proteínas 180- e 230-kDa evidenciada pelo *immunoblot* está apresentada juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 7- Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180 / anti-BP230

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
20	1,2	16,3	-	-	-	-
21	4,8	10,6	-	+	-	+
22	0,8	10,1	-	-	-	-
23	3,3	15,7	-	-	-	-
24	38,7	2,7	-	-	-	-
25	13,0	1,7	+	-	-	-
26	12,2	4,4	-	-	-	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.2.2 Subgrupo demência com anti-BP180 e / ou anti-BP230 negativo

Três (42,9%) de 7 soros de pacientes com demência, porém, com resultados negativos no ELISA para anti-BP180 e / ou anti-BP230, reconheceram a proteína de 180-kDa nos queratinócitos e apenas 1 (14,3%) reconheceu a proteína de 230-kDa (Fig. 12A). O mesmo foi observado nos astrócitos, 3 (20%) reconheceram a proteína de 180-kDa e 1 (14,3%) reconheceu a proteína de 230-kDa (Fig. 12B).

Figura 12. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo demência com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

Na tabela 8, a interpretação da reação dos anticorpos dos pacientes contra as proteínas 180- e 230-kDa evidenciada pelo *immunoblot* está apresentada juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 8- Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo demência com anti-BP180/anti-BP230 negativo

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
27	0,6	0,3	+	-	+	-
28	0,6	1,8	-	-	+	-
29	4,2	0,6	+	-	-	-
30	1,6	0,7	-	-	-	+
31	0,8	0,3	+	+	+	-
32	2,1	4,2	-	-	-	-
33	4,2	0,8	-	-	-	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.2 GRUPO CONTROLE

5.2.2.1 Subgrupo controle com positividade para ELISA anti-BP180/ anti-BP230

Três (42,9%) de 7 soros dos indivíduos do grupo controle que, previamente, apresentaram resultados negativos no ELISA para anti-BP180 e / ou anti-BP230, reconheceram a proteína de 180-kDa nos queratinócitos, enquanto que 5 (71,4%) reconheceram a proteína de 230-kDa (Fig. 13A). Nos astrócitos, nenhum soro reconheceu a proteína de 180-kDa e 2 (28,9%) reconheceram a proteína de 230-kDa (Fig. 13B).

Figura 13. *Immunoblot* com amostras de soro de pacientes do subgrupo controle com presença de anti-BP180/BP230. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

Na tabela 9, a interpretação da reação dos anticorpos dos pacientes contra as proteínas 180- e 230-kDa evidenciada pelo *immunoblot* está apresentada juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 9- Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo controle com presença de anti-BP180/anti-BP230

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
34	10,4	4,2	-	+	-	-
35	17,4	4,6	-	+	-	-
36	1,0	10,3	-	+	-	-
37	18,9	5,0	+	-	-	+
38	5,3	45,8	+	+	-	+
39	16,9	11,2	-	-	-	-
40	7,0	15,0	+	+	-	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.2.1 Subgrupo controle com anti-BP180/ anti-BP230 negativo

Nos queratinócitos, nenhum soro dos indivíduos do grupo controle reconheceu a proteína de 180-kDa, e apenas 1 (14,3%) dos 7 controles reconheceu a proteínas de 230-kDa (Fig. 14A). Tanto a proteína de 180-kDa quanto a 230-kDa não foram reconhecidas por nenhum soro dos indivíduos controles nos astrócitos (Fig. 14B).

Figura 14. Immunoblot com amostras de soro de pacientes do subgrupo controle com anti-BP180/BP230 negativo. Quantidades equivalentes dos lisados celular total da DJM-1 e TM-31 foram submetidas ao SDS-PAGE e a

eletrotransferência, utilizando como controle anticorpo comercial anti-BP180 (C). Frações dos pesos moleculares estão indicadas à esquerda (kDa). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ), 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

Na tabela 10, a interpretação da reação dos anticorpos dos pacientes contra as proteínas 180- e 230-kDa evidenciada pelo *immunoblot* está apresentada juntamente com os respectivos valores da sorologia de ELISA para anti-BP180 e anti-BP230 (JULIO et al, 2018) para cada paciente do subgrupo.

Tabela 10- Dados laboratoriais dos pacientes do subgrupo controle com anti-BP180/anti-BP230 negativo

Amostra	ELISA		Immunoblot			
	anti-BP180 (U/mL)	anti-BP230 (U/mL)	DJM-1		TM-31	
			180-kDa	230-kDa	180-kDa	230-kDa
41	4,5	7,2	-	-	-	-
42	3,1	6,8	-	-	-	-
43	0,6	0,5	-	-	-	-
44	1,3	2,0	-	-	-	-
45	0,5	3,8	+	-	-	-
46	0,7	0,7	-	-	-	-
47	0,7	0,6	-	-	-	-

Legenda: Para os anticorpos anti-BP180 e anti-BP230, valores acima ou igual a 9 UR/mL foram considerados positivos e valores abaixo de 9 UR/mL, negativos ou anticorpos não detectáveis. (+) soros que reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31; (-) soros que não reconheceram proteínas 180- e / ou 230-kDa no lisado celular de DJM-1 e TM-31.

5.2.2 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO *IMMUNOBLLOT* ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO

A fim de estabelecer uma comparação no reconhecimento das proteínas de 180-kDa e 230-kDa nos queratinócitos e astrócitos pelas amostras de soro dos pacientes dos grupos PB, demência e controles, todas as imagens obtidas no *immunoblot* estão compiladas na Figura 15.

Considerando os queratinócitos (Fig. 3a), amostras de soro de 5 (71,4%) de 7 PB exclusivos, 6 (85,7%) de 7 demência-PB, 5 (100%) de 5 PB com outras DN's, 6 (42,9%) de 14 demências e 7 (50,0%) dos 14 controles idosos reconheceram as proteínas 180-kDa e / ou 230-kDa (Fig. 15a), sem diferenças estatísticas entre os grupos (teste do qui-quadrado, $p = 0,2470$)

(tabela 11). Considerando os astrócitos, 2 (28,6%) dos 7 PB exclusivos, 4 (57,1%) dos 7 demência-PB, 4 (80%) de 5 PB com outras DN's, 5 (35,7%) dos 14 pacientes com demência e 2 (14,3%) dos 14 controles reconheceram as bandas 180-kDa e / ou 230-kDa nos lisados (Fig. 15b), sem diferenças significativas (Teste do qui-quadrado, $p = 0,0726$) (tabela 11).

Não houve diferença estatística no reconhecimento das proteínas 180-kDa e 230-kDa quando o subgrupo demência com ELISA positivo foi comparado com o subgrupo demência com ELISA negativo para anti-BP180 / anti-BP230 considerando ambas as linhagens de queratinócitos e de astrócitos (Teste do qui-quadrado, $p = 0,5921$ e $p = 0,2657$, respectivamente). O mesmo ocorre na comparação entre os subgrupos controle com ELISA positivo e controle negativo (Teste do qui-quadrado, $p = 0,1026$ e $p = 1,000$, respectivamente) (resultados não apresentados). Assim, foi tomada a decisão de não subdividir os grupos demência e controle para as análises estatísticas. Entretanto, o grupo PB permanece subdividido segundo a associação clínica com doenças neurológicas.

Os números de amostras de soro que reagiram positivamente com proteínas 180-kDa e / ou 230-kDa nos queratinócitos humanos foram comparados entre os subgrupos PB, PB com demência e PB associado a outras DN's. Não encontramos diferença estatística entre esses 3 subgrupos considerando ambas as linhagens de queratinócitos e de astrócitos (teste do qui-quadrado, $p = 0,4046$ e $p = 0,2034$, respectivamente).

Figura 15. Amostras de soro dos grupos PB, demência e alguns controles reconheceram as proteínas 180-kDa e 230-kDa nos queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31) humanos. Quantidades equivalentes de lisados celular de queratinócitos e astrócitos foram submetidas ao *immunoblot*, utilizando-se anticorpo comercial anti-BP180 e amostras de soro de pacientes com PB (subgrupos: PB exclusivo, PB associado a demência e PB com outras DNs), pacientes com demência e controles idosos. **(A)** Lisado de queratinócitos: Expressão da proteína de 180-kDa reconhecida pelo anti-BP180 (C) e proteínas 180-kDa e / ou 230-kDa foram reconhecidas por 5 de 7 PB exclusivos, 6 de 7 demência-BP, 5 de 5 PB associado a outras DNs, 6 de 14 demências e 7 de 14 controles ($p = 0,2470$). **(B)** Lisado de astrócitos: expressão da proteína de 180-kDa reconhecida pelo anti-BP180 comercial (C) e das proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa reconhecidas por 2 das 7 PB exclusivo, 4 das 7 demência-PB, 4 de 5 PB associado a outras DNs, 5 de 14 demências e 2 de 14 controles ($p = 0,0726$). Resultados de ELISA anti-BP180 / anti-BP230: +; -: valores acima e abaixo do valor de corte (9 U / mL). Legenda: amostras de soro que reagiram com 180-kDa (Δ); 230-kDa (*) e 120-kDa (∞).

Tabela 11. Frequência do número de amostras de soro dos subgrupos penfigoide bolhoso (PB exclusivo, associação de demência-PB e PB com outras DNs), pacientes com demência e controles idosos) que reagiram positivamente com proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa em queratinócitos humanos (DJM-1) e astrócitos (TM-1) no *immunoblot*.

			PENFIGOIDE BOLHOSO					Valor de <i>p</i>
			PB exclusivo	Demência-PB	PB com outras DNs*	DEMÊNCIA	CONTROLES	
			N = 7	N = 7	N = 5	N = 14	N = 14	
			N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Queratinócitos (DJM-1)	180-kDa	Positivo	4 (57,1)	6 (85,7)	4 (80)	4 (28,6)	4 (28,6)	NA
		Negativo	3 (42,9)	1 (14,3)	1 (20)	10 (71,4)	10 (71,4)	
	230-kDa	Positivo	2 (28,6)	0	3 (60)	3 (21,4)	5 (35,7)	NA
		Negativo	5 (71,4)	7 (100)	2 (40)	11 (78,6)	9 (64,3)	
	180-kDa e/ou 230-kDa	Positivo	5 (71,4)	6 (85,7)	5 (100)	6 (42,9)	7 (50)	0,2470
		Negativo	2 (28,6)	1 (14,3)	0	8 (57,1)	7 (50)	
Astrócitos (TM-31)	180-kDa	Positivo	2 (28,6)	1 (14,3)	1 (20)	3 (21,4)	0	NA
		Negativo	5 (71,4)	6 (85,7)	4 (80)	11 (78,6)	14 (100)	
	230-kDa	Positivo	1 (14,3)	3 (42,9)	4 (80)	2 (14,3)	2 (14,3)	NA
		Negativo	6 (85,7)	4 (57,1)	1 (20)	12 (85,7)	12 (85,7)	
	180-kDa e/ou 230-kDa	Positivo	2 (28,6)	4 (57,1)	4 (80)	5 (35,7)	2 (14,3)	0,0726
		Negativo	5 (71,4)	3 (42,9)	1 (20)	9 (64,3)	12 (85,7)	

Legenda. Positivo: amostras de soro que reconhecem proteínas de 180- e / ou 230-kDa; Negativo: amostras de soro que não reconhecem proteínas de 180- e / ou 230-kDa; NA: não aplicável.

* Doenças Neurológicas (ND): 3 pacientes com PB associado a AVC, 2 pacientes com PB e epilepsia.

As proteínas de 180-kDa e 230-kDa em ambos os queratinócitos e astrócitos foram reconhecidas por 5 (26,3%) (blots numerados 3, 6, 16, 18 e 19) de 19 soros do grupo PB e 4 (28,6%) (blots 21, 27, 30 e 31) de 14 pacientes com demência e por 1 (7,1%) (blot 38) de 14 controles (teste do qui-quadrado, $p = 0,3008$), sugerindo uma similaridade antigênica entre as isoformas correspondentes nas linhagens celulares (Fig. 15).

Comparando as frequências de reconhecimento da proteína de 180-kDa por amostras de soro em queratinócitos e astrócitos entre os grupos de estudo, não foi observada diferença estatística para PB exclusivo, demência-PB, PB com outras DNs, demência e controles (teste de McNemar, $p = 0,6171$, $p = 0,1306$, $p = 0,2482$, $p = 1,0000$ e $p = 0,1336$, respectivamente) (dados não mostrados). O mesmo foi feito para comparar o reconhecimento da proteína de 230-kDa nos queratinócitos e astrócitos por grupo, e não foi observada diferença estatística para cada um (teste de McNemar, $p = 1,0000$, $p = 0,2482$, $p = 1,0000$, $p = 1,0000$ e $p = 0,3711$, respectivamente) (dados não mostrados). A concordância da frequência do soro dos pacientes com PB e demência que reconheceu as proteínas de 180-kDa e 230-kDa em ambas as linhas celulares aponta a similaridade antigênica de 180-kDa e 230-kDa entre a pele e o cérebro.

Estudos epidemiológicos demonstraram que doenças neurológicas e neurodegenerativas são comuns em pacientes com PB (KHOSRAVANI et al., 2017; PAPAKONSTANTINOU et al., 2019) e a presença de DN aumenta o risco de desenvolver PB (FÖRSTI et al., 2017; LAI; YEW; LAMBERT, 2016). Alguns estudos sorológicos demonstraram que subpopulações de pacientes com demência (CHEN et al., 2011; JULIO et al., 2018; MESSINGHAM et al., 2016), doença de Alzheimer (KOKKONEN et al., 2017), doença de Parkinson (MESSINGHAM et al., 2016; RECKE et al., 2016) e esclerose múltipla (RECKE et al., 2016) têm autoanticorpos IgG circulantes contra BP180, porém o link patogênico entre DNs e PB ainda precisa ser elucidado.

Os experimentos de imunofluorescência confirmaram que as células de queratinócitos (DJM-1) e astrócitos (TM-31) humanos expressam uma proteína de 180-kDa reconhecida pelo anticorpo monoclonal comercial anti-BP180 (colágeno XVII).

Nos queratinócitos, a fluorescência da membrana celular foi evidente. A expressão da proteína de 180-kDa em linhagem de queratinócitos humanos, utilizando o anticorpo comercial anti-BP180, já foi descrita (HIRAKO et al., 2014).

Em relação à imunomarcação nos astrócitos, a marcação intracitoplasmática foi evidente, confirmando a expressão de isoforma neural da proteína BP180. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura da expressão da isoforma neural da proteína BP180 em linhagem de astrócitos humanos.

Os astrócitos são fundamentais para a vigilância imune do SNC, aliada à homeostase, manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e regeneração do SNC (AKDEMIR; HUANG; DENEEN, 2020; KHAKH; SOFRONIEW, 2015; VASILE; DOSSI; ROUACH, 2017). Além disso, várias evidências mostraram que os astrócitos executam mais funções do que o esperado, como a regulação da transmissão sináptica por meio dos processos astrocitários perisinápticos (LAVIALLE et al., 2011), fato que associa o envolvimento dos astrócitos nas DNs, incluindo distúrbios neuroinflamatórios e neurodegenerativos - acidente vascular cerebral, epilepsia (FROST; LI, 2017; LIU; HONG, 2003; NAGELE et al., 2004; RICCI et al., 2009; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2016) e, principalmente, doença de Alzheimer (FROST; LI, 2017; NAGELE et al., 2004; RODRÍGUEZ-ARELLANO et al., 2016). A distribuição intracelular da isoforma neural do BP180 nos astrócitos difere da localização observada nos queratinócitos, que se restringe à membrana plasmática. Nos queratinócitos, o BP180 é uma proteína transmembrana do hemidesmosomo que representa um citoligante

essencial entre a epiderme e a derme. A função da isoforma neural BP180 em astrócitos ainda precisa ser avaliada.

A associação do PB com DN's tem sido bastante investigada nos últimos anos. A expressão da proteína BP180 (colágeno XVII) foi relatada em neurônios humanos corticais, hipocámpais e amigdaloides humanos (SEPPÄNEN, 2013; SEPPÄNEN et al., 2006), bem como as isoformas BP180 e BP230 foram co-localizadas com as lamininas nas sinapses no SNC (CLAUDEPIERRE et al., 2005). Por outro lado, Barrick et al. (2016) não relataram expressão de BP180 no hipocampo humano. Seppänen et al. (2006) mostraram a expressão difusa do colágeno XVII (BP180) no soma e axônios dos neurônios na região do hipocampo, sendo que a expressão foi ausente nas células gliais (SEPPÄNEN et al., 2007). Entretanto, no presente trabalho, confirmamos a expressão das isoformas BP180 e BP230 em astrócitos. A amostra de tecido cerebral *post-mortem* e os experimentos *in vitro* utilizados no presente estudo, podem explicar a divergência entre os nossos resultados e os achados por Seppänen e colaboradores (2007).

Ainda, os experimentos de *immunoblot* confirmaram a expressão da proteína de 180-kDa no lisado celular de astrócitos TM-31, reconhecida pelo anticorpo comercial anti-BP180. Este resultado confirma a homologia da isoforma neural BP180 e mimetismo molecular com a proteína BP180 expressa nos hemidesmosomos cutâneo.

Este anticorpo comercial anti-BP180 também reconheceu uma proteína de 120-kDa nos queratinócitos, Tasanen et al. (2004) e Schäcke et al. (1998) relataram duas formas de colágeno XVII - uma proteína de 180-kDa correspondente à porção transmembrana e uma proteína de 120-kDa correspondente ao ectodomínio solúvel. Roh et al. (2000) mostraram que pacientes com PB, penfigoide cicatricial e dermatose bolhosa por IgA linear (DBAL) reconhecem as proteínas de 180 e 120-kDa em queratinócitos humanos, entretanto, apenas os pacientes com DBAL reconhecem especificamente apenas o ectodomínio solúvel de 120-kDa.

A fim de avaliar se as amostras de soro de pacientes dos grupos PB, demência e controles, os quais apresentaram autoanticorpos IgG contra BP180 / BP230 no ELISA, apresentariam reatividade com as proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa expressas no cérebro, realizou-se experimentos de *immunoblot* com proteínas dos extratos celulares totais de queratinócitos e astrócitos humanos.

Entre os subgrupos PB, não houve diferença estatística quando se comparou o reconhecimento das proteínas BP180 e/ou BP230 expressas em queratinócitos e astrócitos humanos. Nestes subgrupos, a produção de autoanticorpos contra BP180 / BP230 pode estar relacionada à doença em si. Não temos amostras de soro desses pacientes antes do surgimento do PB. Este resultado nos chama a atenção para duas situações diferentes: (i) A demência ou outras DN precedem o início do PB. Chen et al. (2011) mostraram que soros de pacientes com PB e PB associado a DN (8 demências, 9 trombose cerebral e 5 hemorragia cerebral) reconhecem a proteína BP230 no tecido neural humano. A inflamação e a neurodegeneração causadas pela DN podem expor os antígenos BP180 e / ou BP230 que, até o momento, estavam anatomicamente ocultos no cérebro e desencadear a produção de autoanticorpos contra eles. Após o dano neurológico, os anticorpos anti-BP produzidos contra as isoformas neuronais poderiam reconhecer as proteínas BP180 / BP230 expressas na pele por reação cruzada, desencadeando o surgimento do PB. (ii) Pacientes com PB exclusivo reconheceram as proteínas de 180 e / ou 230-kDa expressas em astrócitos. Esse resultado confirma que o PB também pode anteceder o surgimento das DN, como já relatado (CORDEL et al., 2007; FÖRSTI et al., 2016; KWAN et al., 2015; TAGHIPOUR et al., 2010). Além disso, esses pacientes podem ter demência subclínica ainda não identificada.

Entre os 7 pacientes com demência que apresentaram positividade anti-BP180 e / ou anti-BP230 no ELISA, dois (28,6%) pacientes, com a numeração 21 e 25 (fig. 11A), reconheceram as proteínas de 230-kDa e 180-kDa, respectivamente, nas células DJM-1. O paciente de número 21, além do reconhecimento da proteína de 230-kDa nos queratinócitos e astrócitos, apresentou depósito de IgG no lado epidérmico da clivagem (JULIO et al., 2018), conforme demonstrou a IFI-SSS, sugerindo um diagnóstico subclínico do PB. Além disso, em 4 (28,6%) dos 14 pacientes, as proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa foram reconhecidas nos queratinócitos e astrócitos. Nossos resultados contribuem com a apresentação usual do PB após o diagnóstico das DN.

Sete (50%) das 14 amostras de soro do grupo controle reconheceram as proteínas de 180-kDa e / ou 230-kDa nos queratinócitos, e dois (14,3%) controles reconheceram proteínas nos queratinócitos e astrócitos. Para investigar um possível diagnóstico subclínico do PB, as amostras de soro foram incubadas com epiderme humana utilizando a técnica de IFI associada à SSS, entretanto, a fluorescência foi negativa (dados não mostrados). Idosos saudáveis podem apresentar anticorpos séricos anti-BP180 e / ou anti-BP230 mesmo sem a manifestação clínica

do PB (DESAI et al., 2008; JULIO et al., 2018; MEIJER et al., 2015; PRÜMANN et al., 2015; VAN BEEK et al., 2014). Uma vez demonstrado que as amostras de soro dos controles reconheceram proteínas em queratinócitos e astrócitos, perguntamos se os anticorpos circulantes anti-180-kDa e / ou 230-kDa presentes no soro dos idosos são patogênicos ou não. Os anticorpos são direcionados contra a pele ou isoformas neuronais do PB? Os idosos podem produzir inicialmente os anticorpos contra proteínas de 180-kDa ou 230-kDa expressas no SNC. A produção primária de anticorpos contra as isoformas neuronais do PB no SNC pode ser indicativo de dano neurodegenerativo primário. Um ensaio ELISA utilizando proteínas específicas das isoformas neuronais do PB pode contribuir para explicar as DNs antecedendo o PB.

Observamos que alguns pacientes dos grupos demência e controle que apresentaram ELISA positivo para anti-BP180 e/ou anti-BP230 não reconheceram as proteínas de 180-kDa e/ou 230-kDa nos experimentos de *immunoblot*, e o inverso também foi observado. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato de que a proteína utilizada para sensibilizar a placa de ELISA, possivelmente, se apresenta na conformação nativa (estrutura secundária ou terciária) (Kits ELISA MESACUP BP180 e BP230, MBL®, Nagoya, Japão). Já no *immunoblot*, a proteína do lisado celular total é desnaturada e, com isso ocorre a quebra das pontes dissulfeto nas proteínas promovendo o desdobramento e desorganização das estruturas secundária e terciária (ALBERTS et al., 2010). Dessa forma, a proteína que está na membrana de nitrocelulose do *immunoblot* passa a apresentar uma estrutura diferente das proteínas utilizadas na sensibilização nas placas de ELISA. Assim, os autoanticorpos de alguns pacientes possivelmente reconheceram determinado epítipo da proteína quando estava na conformação nativa (ELISA), e os mesmos podem não reconhecer o epítipo após a desnaturação da proteína (*immunoblot*).

No presente trabalho, demonstramos que nenhuma amostra de soro do grupo PB exclusivo reconheceu o fragmento de 120-kDa. Por outro lado, os pacientes de número 11 do grupo demência-PB; 18 do grupo PB com outras DN's; 33 do grupo demência e 38 do grupo controle reconheceram o fragmento de 120-kDa nos queratinócitos. O paciente de número 33, pertencente ao grupo demência, reconheceu exclusivamente a proteína de 120-kDa. Embora os pacientes do grupo PB exclusivo não reconheceram a proteína de 120-kDa nos experimentos de *immunoblot*, alguns trabalhos relatam que eles podem apresentar exclusivamente anticorpos anti-BP120 séricos no ELISA (IKAWA et al., 2016; MATSUI et al., 2014; MIYASHITA et

al., 2018; SADIK et al., 2019). Sabendo que na associação de PB com DNs, as DNs geralmente antecedem o diagnóstico do PB e que o grupo PB exclusivo não reconheceu o fragmento de 120-kDa nos queratinócitos, esses resultados apontam que o fragmento de 120-kDa pode ser considerado uma isoforma neural semelhante com a isoforma molecular expressa na pele.

Nossos achados contribuíram com o mecanismo patogênico proposto por Chen et al. (2011) na associação do PB com as DNs. A figura 20 apresenta resume os nossos achados e esquematiza os mecanismos pelos quais as DNs podem ser gatilhos para o surgimento do PB. A neuroinflamação ou neurodegeneração no SNC, decorrentes da demência, doença de Alzheimer, AVC, Parkinson e esclerose múltipla, causam danos aos astrócitos. O dano neural pode levar à exposição das isoformas neuronais intracitoplasmáticas BP180 e BP230. A exposição dessas proteínas, que até o momento estavam anatomicamente ocultas, recrutariam células do sistema imunológico ao SNC e as reconheceriam como proteínas não-próprias. Em consequência desse reconhecimento, ocorreria a produção de autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 ainda no SNC. Os danos causados nos astrócitos decorrentes dos processos de neuroinflamação ou neurodegeneração, também pode resultar na liberação de moléculas de sinalização pró-inflamatórias pelos astrócitos (LEHNARDT, 2010; RODRIGUES et al., 2014). Essa resposta imune pode favorecer um ambiente inflamatório desfavorável no SNC, resultando no aumento da permeabilidade da BHE (ABBOTT, 2000; ALMUTAIRI et al., 2016; LOPES PINHEIRO et al., 2016; SWEENEY; SAGARE; ZLOKOVIC, 2018; WANG et al., 2014). Desta forma, é possível que os autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 ultrapassem a BHE e cheguem até a corrente sanguínea e, conseqüentemente, serão direcionados à proteínas BP180 e BP230 que compõe a estrutura do hemidesmosso na pele. Como as proteínas BP da pele apresentam semelhança molecular com as isoformas BP expressas nos queratinócitos, pode ocorrer reação cruzada e os anticorpos anti-BP se ligar às proteínas BP hemidesmosomais. A reatividade cruzada pode, então, levar a uma resposta imune incorreta aos antígenos da pele contribuindo para o surgimento do PB após o diagnóstico da DN. Nossa hipótese é apoiada por Selmi e Rose (2016), que relataram o rompimento da teoria dogmática de que o SNC é um sítio imunologicamente privilegiado, uma vez que a integridade da BHE é comprometida durante a neuroinflamação. Além disso, Meudec et al. (2019) demonstraram a presença de autoanticorpos anti-BP180 e anti-BP230 circulantes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com associação clínica de PB e DN, confirmando o mecanismo aqui proposto.

Os resultados decorrentes deste trabalho abrem novos experimentos prospectivos nos quais poderá ser utilizado modelo animal para a doença de Alzheimer a fim de confirmar a produção de autoanticorpos contra as isoformas neurais BP180 e BP230 no ambiente neural comprometido pela neurodegeneração e neuroinflamação. Além disso, esses experimentos também irão contribuir para esclarecer o consequente reconhecimento imunológico dos antígenos BP180 e BP230 da pele pelos autoanticorpos neurais, que seriam responsáveis pelo desencadeamento do PB após o diagnóstico de demência.

Figura 20. Mecanismos fisiopatológicos na associação PB-demência. As doenças neurológicas promovem neuroinflamação e/ou neurodegeneração no sistema nervoso central (SNC). Em um ambiente fisiológico, os astrócitos expressam proteínas intracitoplasmáticas 180-kDa e 230-kDa. O dano neural expõe as proteínas 180-kDa/230-kDa dos astrócitos. A exposição de 180-kDa/230-kDa como proteínas não-próprias recrutar células do sistema imune ao SNC, desencadeando a produção de autoanticorpos contra 180-kDa/230-kDa. O ambiente neuroinflamatório aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Este evento contribuiria para que o anti-180-kDa e anti-230-kDa obtivessem acesso aos vasos sanguíneos, e seriam direcionados às proteínas da pele BP180/BP230. Uma resposta cruzada entre antígenos hemidesmosomais neurais e cutâneos contribui para o aparecimento do PB. As bolhas subepidérmicas é uma característica exclusiva da histologia do PB. A imunofluorescência indireta (IFI) associada à técnica de Split Salt Skin (SSS) exibe depósitos lineares de IgG e/ou C3 no lado epidérmico da clivagem. Esses eventos poderiam justificar a associação PB-DN, principalmente a demência. Legenda. EM: esclerose múltipla; PB: Penfigoide bolhoso; KIF: filamento intermediário de queratina; Lam332: laminina 332; LL: lamina lucida; LD: lâmina densa; SLD: sublamina densa; Col: Colágeno.

Este trabalho compreendeu um estudo experimental comparativo entre as isoformas de BP180 e BP230 em células de queratinócitos e astrócitos humanos no contexto da relação existente entre as patologias demência e penfigoide bolhoso. Os experimentos *in vitro* confirmaram a expressão da proteína imunogênica de 180-kDa nos queratinócitos e astrócitos. O *immunoblot* confirmou a homologia e o mimetismo molecular entre a proteína BP180 expressa em células de queratinócitos na pele e a isoforma neural BP180 expressa em astrócitos. Além disso, as proteínas de 180-kDa e 230-kDa são reconhecidas por autoanticorpos de pacientes com PB e pacientes com demência, como demonstrado por meio dos experimentos de *immunoblot* com os lisados de queratinócitos e astrócitos. O reconhecimento das proteínas de 180-kDa e 230-kDa nas linhagens celular de queratinócitos e astrócitos pelos soros dos pacientes confirmou mimetismo molecular entre as isoformas de BP180 e BP230 expressas na pele e no cérebro. Em adição, o estudo contribuiu para elucidar o mecanismo patogênico envolvido na relação do PB com as doenças neurológicas, principalmente a demência. Por fim, os autoanticorpos contra as proteínas das isoformas neuronais de 180-kDa e / ou 230-kDa, secundários do dano cerebral, podem apresentar reação cruzada com os antígenos BP180 / BP230 da pele, justificando a demência anteceder o início do PB.

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABBOTT, N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability *Cellular and Molecular Neurobiology* Cell Mol Neurobiol, , 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10696506/>>. Acesso em: 10 jul. 2020

AGULHON, C. et al. Calcium signaling and gliotransmission in normal vs. Reactive astrocytes. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3 JUL, 2012.

AHMED, S. S. et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 294, 1 jul. 2015.

AKDEMIR, E. S.; HUANG, A. Y.-S.; DENEEN, B. Astrocytogenesis: where, when, and how. *F1000Research*, v. 9, p. 233, 2 abr. 2020.

ALAM, Q. et al. Inflammatory Process in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Central Role of Cytokines. *Current Pharmaceutical Design*, v. 22, n. 5, p. 541–548, 27 jan. 2016.

ALHOMAIDAN, H. T. et al. Bisphenol A modified DNA: A possible immunogenic stimulus for anti-DNA autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, v. 52, n. 7–8, p. 272–280, 17 nov. 2019.

ALMUTAIRI, M. M. A. et al. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhauser Verlag AG, , 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403789/>>. Acesso em: 10 jul. 2020

ALPSOY, E.; AKMAN-KARAKAS, A.; UZUN, S. Geographic variations in epidemiology of two autoimmune bullous diseases: pemphigus and bullous pemphigoid. *Archives of dermatological research*, v. 307, n. 4, p. 291–8, 2015.

ANTIGA, E. et al. Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, v. 28, n. 2, p. 222–30, fev. 2014.

BANFIELD, C. C. et al. The association of HLA-DQ7 with bullous pemphigoid is restricted to men. *The British journal of dermatology*, v. 138, n. 6, p. 1085–1090, jun. 1998.

BAIGRIE D, NOOKALA V. Bullous Pemphigoid. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 16, 2020.

BARRICK, B. J. et al. Bullous Pemphigoid, Neurodegenerative Disease, and Hippocampal BP180 Expression: A Retrospective Postmortem Neuropathologic Study. *The Journal of investigative dermatology*, v. 136, n. 10, p. 2090–2092, 1 out. 2016.

BASTUJI-GARIN, S. et al. Risk factors for bullous pemphigoid in the elderly: a prospective case-control study. *The Journal of investigative dermatology*, v. 131, n. 3, p. 637–643, 2011.

BENVENGA, S. et al. Endocrine disruptors and thyroid autoimmunity *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* Bailliere Tindall Ltd, , 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32081544/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

- BENVENGA, S.; GUARNERI, F. Molecular mimicry and autoimmune thyroid disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* Springer New York LLC, , 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27307072/>>. Acesso em: 31 jul. 2020
- BERNARD, P.; ANTONICELLI, F. Bullous Pemphigoid: A Review of its Diagnosis, Associations and Treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 18, n. 4, p. 513–528, 28 ago. 2017.
- BEUTNER, E. H.; JORDON, R. E. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 117, n. 2, p. 505–510, 1964.
- BOUAMEUR, J. E.; FAVRE, B.; BORRADORI, L. Plakins, a versatile family of cytolinkers: Roles in skin integrity and in human diseases. *Journal of Investigative Dermatology* Nature Publishing Group, , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24352042/>>. Acesso em: 29 jul. 2020
- BRICK, K. et al. Incidence and Mortality Rates of Bullous Pemphigoid in Olmsted County, Minnesota, Over 6 Decades. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 71, n. 1, p. 92–99, 2014a.
- BRICK, K. E. et al. A population-based study of the association between bullous pemphigoid and neurologic disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 71, n. 6, p. 1191–7, 2014b.
- CAI, Z.; WAN, C.-Q.; LIU, Z. Astrocyte and Alzheimer's disease. *Journal of neurology*, v. 264, n. 10, p. 2068–2074, 1 out. 2017.
- CHAGURY, A. A. et al. HLA-C*17, DQB1*03:01, DQA1*01:03 and DQA1*05:05 Alleles Associated to Bullous Pemphigoid in Brazilian Population. *Annals of dermatology*, v. 30, n. 1, p. 8–12, fev. 2018.
- CHARNEUX, J. et al. Usefulness of BP230 and BP180-NC16a Enzyme-Linked Immunosorbent Assays in the Initial Diagnosis of Bullous Pemphigoid. v. 147, n. 3, p. 286–291, 2011.
- CHEN, J. J. et al. Sera of elderly bullous pemphigoid patients with associated neurological diseases recognize bullous pemphigoid antigens in the human brain. *Gerontology*, v. 57, n. 3, p. 211–6, 2011.
- CHIA, J. S. J. et al. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. *Nutrition and Diabetes*, v. 7, n. 5, 15 maio 2017.
- CHIURI, R. M. et al. Bartonella henselae infection associated with autoimmune thyroiditis in a child. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 79, n. 3, p. 185–188, abr. 2013.
- CHOSIDOW, O. et al. Bullous pemphigoid and amyotrophic lateral sclerosis: a new clue for understanding the bullous disease? *Arch Dermatol.*, v. 136, n. 10, p. 521–4, 2000.
- CLAUDEPIERRE, T. et al. Collagen XVII and BPAG1 expression in the retina: evidence for

an anchoring complex in the central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, v. 487, n. 2, p. 190–203, 2005.

COPPIETERS, K. T.; WIBERG, A.; VON HERRATH, M. G. Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. *APMIS*, v. 120, n. 12, p. 941–949, dez. 2012.

CORDEL, N. et al. Neurological disorders in patients with bullous pemphigoid. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, v. 215, n. 3, p. 187–91, 2007.

COZZANI, E. et al. Atypical presentations of bullous pemphigoid: Clinical and immunopathological aspects. *Autoimmunity reviews*, v. 14, n. 5, p. 438–45, 2015.

CUNNINGHAM, M. W. Molecular Mimicry, Autoimmunity, and Infection: The Cross-Reactive Antigens of Group A Streptococci and their Sequelae. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 4, 5 jul. 2019.

CUSICK, M. F.; LIBBEY, J. E.; FUJINAMI, R. S. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, v. 42, n. 1, p. 102–111, fev. 2012.

DANIEL, B. S.; MURRELL, D. F. Review of Autoimmune Blistering Diseases: the Pemphigoid diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, p. jdv.15679, 13 maio 2019.

DELGADO, J. C. et al. A common major histocompatibility complex class II allele HLA-DQB1* 0301 is present in clinical variants of pemphigoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 16, p. 8569–71, 6 ago. 1996.

DESAI, N. et al. Autoantibodies to basement membrane proteins BP180 and BP230 are commonly detected in normal subjects by immunoblotting. *The Australasian journal of dermatology*, v. 49, n. 3, p. 137–41, ago. 2008.

DI ZENZO, G. et al. Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. *The Journal of investigative dermatology*, v. 122, n. 1, p. 103–10, 2004.

DIMSON, O. G. et al. Identification of a potential effector function for IgE autoantibodies in the organ-specific autoimmune disease bullous pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 120, n. 5, p. 784–788, 1 maio 2003.

DINIZ, L. P. et al. Astrocytes and the TGF- β 1 Pathway in the Healthy and Diseased Brain: a Double-Edged Sword. *Molecular neurobiology*, 30 out. 2018.

EROGLU S., TOPRAK S., URGAN O, MD, OZGE E. ONUR, MD, ARZU DENIZBASI, MD, HALDUN AKOGLU, MD, CIGDEM OZPOLAT, MD, EBRU AKOGLU, M. *DSM-IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder*. [s.l: s.n.]. v. 33

ESMAILI, N. et al. Association between HLA-DQB1*03:01 and Bullous pemphigoid in Iranian patients. *Iranian journal of immunology : IJI*, v. 10, n. 1, p. 1–9, mar. 2013.

- FAIRLEY, J. A.; CHANG, L. F.; GIUDICE, G. J. Mapping the binding sites of anti-BP180 immunoglobulin E autoantibodies in bullous pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, n. 3, p. 467–472, set. 2005.
- FANG, H. et al. Association of HLA class I and class II alleles with bullous pemphigoid in Chinese Hans. *Journal of Dermatological Science*, v. 89, n. 3, p. 258–262, mar. 2018.
- FENG, S. et al. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *International Journal of Dermatology*, v. 47, n. 3, p. 225–228, mar. 2008.
- FÖRSTI, A.-K. et al. Psychiatric and neurological disorders are associated with bullous pemphigoid - a nationwide Finnish Care Register study. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 37125, 15 dez. 2016.
- FÖRSTI, A.-K. et al. Neurological and psychiatric associations in bullous pemphigoid-more than skin deep? *Experimental Dermatology*, n. June, p. 1–7, 2017.
- FÖRSTI, A. K. et al. Increasing incidence of bullous pemphigoid in Northern Finland: a retrospective database study in Oulu University Hospital. *British Journal of Dermatology*, v. 171, n. 5, p. 1223–1226, 2014.
- FOUREUR, N. et al. [Correlation between the presence of type-2 anti-pemphigoid antibodies and dementia in elderly subjects with no clinical signs of pemphigoid]. *Annales de dermatologie et de venereologie*, v. 133, n. 5 Pt 1, p. 439–443, maio 2006.
- FROST, G. R.; LI, Y.-M. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open biology*, v. 7, n. 12, p. 170228, 13 dez. 2017.
- GAMMON, W. R. et al. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *The Journal of investigative dermatology*, 1984.
- GAO, H.-M. et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, v. 81, n. 6, p. 1285–97, jun. 2002.
- GENOVESE, G. et al. New Insights Into the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid: 2019 Update. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 1506, 2 jul. 2019.
- GETTS, D. R. et al. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunological Reviews*, v. 253, n. 1, p. 1–15, set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23947356/>>. Acesso em: 31 jul. 2020
- GHOHESTANI, R. F. et al. IgE antibodies in sera from patients with bullous pemphigoid are autoantibodies preferentially directed against the 230-kDa epidermal antigen (BP230). *Journal of Clinical Immunology*, v. 18, n. 3, p. 202–209, 1998.
- HAEBERLE, S. et al. Regulatory T-cell deficiency leads to pathogenic bullous pemphigoid antigen 230 autoantibody and autoimmune bullous disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 142, n. 6, p. 1831–1842.e7, 1 dez. 2018.

- HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Mechanisms of Disease: Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 11, n. 1, p. 175–197, 2016.
- HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Recent Advances in Understanding Pemphigus and Bullous Pemphigoid. *The Journal of investigative dermatology*, v. 140, n. 4, p. 733–741, 1 abr. 2020.
- HERTL, M.; EMING, R.; VELDMAN, C. T cell control in autoimmune bullous skin disorders. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 5, p. 1159–66, maio 2006.
- HIRAKO, Y. et al. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Experimental cell research*, v. 324, n. 2, p. 172–82, 10 jun. 2014.
- HOFMANN, S. et al. Severity and phenotype of bullous pemphigoid relate to autoantibody profile against the NH2- and COOH-terminal regions of the BP180 ectodomain. *The Journal of investigative dermatology*, v. 119, n. 5, p. 1065–73, 2002.
- HOLTSCHE, M. M. et al. Prospective study in bullous pemphigoid: association of high serum anti-BP180 IgG levels with increased mortality and reduced Karnofsky score. *British Journal of Dermatology*, v. 179, n. 4, p. 918–924, 1 out. 2018.
- HURSKAINEN, T. et al. Deletion of the major bullous pemphigoid epitope region of collagen XVII induces blistering, autoimmunization, and itching in mice. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 135, n. 5, p. 1303–1310, 22 maio 2015.
- IKAWA, T. et al. Bullous pemphigoid with immunoglobulin G anti-LAD-1 antibodies without evident erythema and eosinophil infiltration. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 96, n. 6, p. 832–833, 1 set. 2016.
- ISHIURA, N. et al. Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid. *Journal of dermatological science*, v. 49, n. 2, p. 153–61, 2008.
- IZUMI, K. et al. Autoantibody Profile Differentiates between Inflammatory and Noninflammatory Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 11, p. 2201–2210, 1 nov. 2016.
- JOLY, P. et al. Incidence and mortality of bullous pemphigoid in France. *The Journal of investigative dermatology*, v. 132, n. 8, p. 1998–2004, 2012.
- JULIO, T. A. et al. Biological predictors shared by dementia and bullous pemphigoid patients point out a cross-antigenicity between BP180/BP230 brain and skin isoforms. *Immunologic research*, 15 set. 2018.
- KALIŃSKA-BIENIAS, A. et al. The association between neurological diseases, malignancies and cardiovascular comorbidities among patients with bullous pemphigoid: Case-control study in a specialized Polish center. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, v. 28, n. 5, p. 637–642, 2019.

- KAPLAN, M. H.; SUCHY, M. L. IMMUNOLOGIC RELATION OF STREPTOCOCCAL AND TISSUE ANTIGENS. II. The Journal of experimental medicine, v. 119, n. 4, p. 643–650, 1964.
- KASPERKIEWICZ, M.; ZILLIKENS, D.; SCHMIDT, E. Pemphigoid diseases: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. Autoimmunity, v. 45, n. 1, p. 55–70, 2012.
- KATISKO, K. et al. The association between frontotemporal lobar degeneration and bullous pemphigoid. Journal of Alzheimer's Disease, v. 66, n. 2, p. 743–750, 2018.
- KATZAV, A. et al. Passive transfer of narcolepsy: Anti-TRIB2 autoantibody positive patient IgG causes hypothalamic orexin neuron loss and sleep attacks in mice. Journal of Autoimmunity, v. 45, p. 24–30, set. 2013.
- KERSHENOVICH, R.; HODAK, E.; MIMOUNI, D. Diagnosis and classification of pemphigus and bullous pemphigoid. Autoimmunity Reviews, v. 13, n. 4–5, p. 477–481, 2014.
- KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nature Neuroscience, v. 18, n. 7, p. 942–952, 25 jun. 2015.
- KHOSRAVANI, S. et al. Frequency of Neurological Disorders in Bullous Pemphigoid Patients: A Cross-Sectional Study. International scholarly research notices, v. 2017, p. 6053267, 2017.
- KOKKONEN, N. et al. Increased Levels of the Bullous Pemphigoid BP180 Autoantibody Are Associated with More Severe Dementia in Alzheimer's Disease. The Journal of investigative dermatology, v. 137, n. 1, p. 71–76, 1 jan. 2017.
- KÜNZLI, K. et al. One gene but different proteins and diseases: The complexity of dystonin and bullous pemphigoid antigen 1. Experimental Dermatology, v. 25, n. 1, p. 10–16, 1 jan. 2016.
- KURIMOTO, M. et al. Establishment and characterization of a novel malignant astrocytoma cell line derived from a tumor removed in a patient with neurofibromatosis type 1. Journal of neurosurgery, v. 94, n. 2, p. 301–8, fev. 2001.
- KWAN, Z. et al. The Association Between Bullous Pemphigoid and Neurological Disorders in A Selected Malaysian Population. The Medical journal of Malaysia, v. 70, n. 2, p. 81–85, abr. 2015.
- LAI, Y. C.; YEW, Y. W.; LAMBERT, W. C. Bullous pemphigoid and its association with neurological diseases: a systematic review and meta-analysis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV, v. 30, n. 12, p. 2007–2015, dez. 2016.
- LANGAN, S. M. et al. Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study. Bmj, v. 337, n. jul09 1, p. a180–a180, 9 jul. 2008.
- LANGAN, S. M.; GROVES, R. W.; WEST, J. The relationship between neurological disease and bullous pemphigoid: a population-based case-control study. The Journal of investigative dermatology, v. 131, n. 3, p. 631–6, mar. 2011.
- LAVIALLE, M. et al. Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin

and metabotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 31, p. 12915–9, 2 ago. 2011.

LEHNARDT, S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury *GLIA*, , 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19705460/>>. Acesso em: 10 jul. 2020

LI, L. et al. Sera from patients with bullous pemphigoid (BP) associated with neurological diseases recognized BP antigen 1 in the skin and brain. *The British journal of dermatology*, v. 160, n. 6, p. 1343–5, 2009.

LIBERTO, C. M. et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes *Journal of Neurochemistry* *J Neurochem*, , jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15147501/>>. Acesso em: 30 jul. 2020

LIU, B.; HONG, J.-S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 304, n. 1, p. 1–7, jan. 2003.

LO SCHIAVO, A. et al. Bullous pemphigoid: Etiology, pathogenesis, and inducing factors: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, v. 31, n. 4, p. 374–381, 2013.

LOPES PINHEIRO, M. A. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* *Elsevier B.V.*, , 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527183/>>. Acesso em: 10 jul. 2020

MACHADO, A. R. DA S. R. et al. Herpes simplex virus 1 and cytomegalovirus are associated with pemphigus vulgaris but not with pemphigus foliaceus disease *Experimental Dermatology* *Blackwell Publishing Ltd*, , 1 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28370424/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

MARAZZA, G. et al. Incidence of bullous pemphigoid and pemphigus in Switzerland: a 2-year prospective study. *The British journal of dermatology*, v. 161, n. 4, p. 861–8, 2009.

MARIOTTI, F. et al. Development of a novel ELISA system for detection of anti-BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. *The British journal of dermatology*, v. 151, n. 5, p. 1004–10, 2004.

MARTINEZ-DE PABLO, M. I. et al. [Childhood bullous pemphigoid]. *Arch Dermatol.*, v. 143, n. 4, p. 215–220, 2007.

MATSUI, K. et al. Bullous pemphigoid with IgG anti-LAD-1 antibodies. *European Journal of Dermatology*, v. 24, n. 2, p. 275–276, 2014.

MEIJER, J. M. et al. Significantly higher prevalence of circulating bullous pemphigoid-specific IgG autoantibodies in elderly patients with a nonbullous skin disorder. *British Journal of Dermatology*, v. 173, n. 5, p. 1274–1276, 2015.

MERRHEIM, J. et al. Estrogen, estrogen-like molecules and autoimmune

diseasesAutoimmunity ReviewsElsevier B.V., , 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31927086/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

MESSINGHAM, K. A. N. et al. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 005, p. 2015–2017, 2015.

MESSINGHAM, K. A. N. et al. Autoantibodies to Collagen XVII Are Present in Parkinson's Disease and Localize to Tyrosine-Hydroxylase Positive Neurons. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 3, p. 721–723, 2016.

MESSINGHAM, K. N. et al. Demographics and Autoantibody Profiles of Pemphigoid Patients with Underlying Neurologic Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 9, p. 1860–1866.e1, 1 set. 2019.

MEUDEEC, L. et al. Presence of anti-BP180 and anti-BP230 in the cerebrospinal fluid of patients with bullous pemphigoid and neurological disease: is there any intrathecal synthesis? *British Journal of Dermatology* Blackwell Publishing Ltd, , 1 out. 2019.

MILLER, R. A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science (New York, N.Y.)*, v. 273, n. 5271, p. 70–4, 5 jul. 1996.

MINAGAWA, A. et al. An immunogenetic study of bullous pemphigoid with mucosal involvement in two siblings. *European journal of dermatology : EJD*, v. 25, n. 2, p. 186–8, abr. 2015.

MINTZ, E. M.; MOREL, K. D. Treatment of Chronic Bullous Disease of Childhood. *Dermatologic Clinics*, v. 29, n. 4, p. 699–700, 2011.

MIYASHITA, K. et al. A case of bullous pemphigoid with IgG antibodies against LAD-1, but not BP180 NC16a domain or BP230 *European Journal of Dermatology* John Libbey Eurotext, , 1 mar. 2018.

MORRIS, J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*, v. 43, n. 11, p. 2412–4, nov. 1993.

MURAI, K. K.; PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses *GLIA*, , nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21850709/>>. Acesso em: 30 jul. 2020

N. FOUREUR, V. DESCAMPS, B. LEBRUN-VIGNES, C. PICARD-DAHAN, M. GROSSIN, S. BELAICH, B. C. Bullous pemphigoid in a leg affected with hemiparesia: a possible relation of neurological diseases with bullous pemphigoid? *European Journal of Dermatology*, v. 2, p. 2–6, 2012.

NAGELE, R. G. et al. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, v. 25, n. 5, p. 663–74, 2004.

NEAU, J.-P. et al. Neurodermatology. *Handbook of clinical neurology*, v. 121, p. 1561–94, 2014.

- NISHIE, W. Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *Journal of dermatological science*, v. 73, n. 3, p. 179–86, 2014.
- OKAZAKI, A. et al. Polymorphisms of HLA-DR and -DQ genes in Japanese patients with bullous pemphigoid. *The Journal of dermatology*, v. 27, n. 3, p. 149–56, mar. 2000.
- OKSANEN, M. et al. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhauser Verlag AG, , 30 jul. 2019.
- OSAWA, M. et al. A case of childhood bullous pemphigoid with IgG and IgA autoantibodies to various domains of BP180. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 70, n. 6, p. e129–e131, 2014.
- PAHARI, S. et al. Morbid Sequences Suggest Molecular Mimicry between Microbial Peptides and Self-Antigens: A Possibility of Inciting Autoimmunity - PubMed. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.
- PAPAKONSTANTINO, E. et al. Neurological disorders are associated with bullous pemphigoid. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, v. 33, n. 5, p. 925–929, 27 maio 2019.
- PARKER, S. R. S.; MACKELFRESH, J. Autoimmune blistering diseases in the elderly. *Clinics in Dermatology*, v. 29, n. 1, p. 69–79, 2011.
- PARTINEN, M. et al. Narcolepsy as an autoimmune disease: The role of H1N1 infection and vaccination *The Lancet Neurology* Lancet Publishing Group, , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24849861/>>. Acesso em: 31 jul. 2020
- PATEL, F. et al. Pathophysiology of autoimmune bullous diseases: Nature versus nurture. *Indian Journal of Dermatology*, v. 62, n. 3, p. 262–267, 1 maio 2017.
- PELLEGRINO, P.; CLEMENTI, E.; RADICE, S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives *Autoimmunity Reviews* Elsevier, , 1 out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26031899/>>. Acesso em: 31 jul. 2020
- PICKFORD, W. J. et al. T cell participation in autoreactivity to NC16a epitopes in bullous pemphigoid. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 180, n. 2, p. 189–200, 2015.
- PREDIERI, B. et al. Endocrine disrupting chemicals and type 1 diabetes *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 2 abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32331412/>>. Acesso em: 31 jul. 2020
- PRÜMANN, W. et al. Prevalence of pemphigus and pemphigoid autoantibodies in the general population. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 10, n. 63, p. doi: 10.1186/s13023-015-0278-x., 2015.
- QUAGLINO, P. et al. Circulating CD4+ CD25brightFOXP3+ regulatory T-cells are

significantly reduced in bullous pemphigoid patients. *Archives of Dermatological Research*, v. 304, n. 8, p. 639–645, out. 2012.

RECKE, A. et al. Parkinson disease and multiple sclerosis are not associated with autoantibodies against structural proteins of the dermal-epidermal junction. *The British journal of dermatology*, v. 175, n. 2, p. 407–9, ago. 2016.

RICCI, G. et al. Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *Journal of biological physics*, v. 35, n. 4, p. 317–36, 14 out. 2009.

RODRIGUES, M. C. O. et al. The innate and adaptive immunological aspects in neurodegenerative diseases *Journal of Neuroimmunology* Elsevier, , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24161471/>>. Acesso em: 10 jul. 2020

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J. J. et al. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 323, p. 170–82, 26 maio 2016.

ROH, J. Y. et al. The 120-kDa soluble ectodomain of type XVII collagen is recognized by autoantibodies in patients with pemphigoid and linear IgA dermatosis. *The British journal of dermatology*, v. 143, n. 1, p. 104–11, jul. 2000.

ROJAS, M. et al. Molecular mimicry and autoimmunity *Journal of Autoimmunity* Academic Press, , 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30509385/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

ROUSSEL, A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the combination of bullous pemphigoid antigens 1 and 2 in the diagnosis of bullous pemphigoid. *Archives of dermatology*, v. 147, n. 3, p. 293–298, 2011.

RUSO, V. et al. Granzyme B is elevated in autoimmune blistering diseases and cleaves key anchoring proteins of the dermal-epidermal junction. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

SADIK, C. D. et al. Checkpoint inhibition may trigger the rare variant of anti-LAD-1 IgG-positive, anti-BP180 NC16A IgG-negative bullous pemphigoid. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. AUG, 2019.

SAKUMA-OYAMA, Y. et al. Evaluation of a BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay in the initial diagnosis of bullous pemphigoid. *The British Journal of Dermatology*, v. 151, n. 1, p. 126–31, 2004.

SASAKA, T. et al. Intravenous IgG Reduces Pathogenic Autoantibodies, Serum IL-6 Levels, and Disease Severity in Experimental Bullous Pemphigoid Models. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 138, n. 6, p. 1260–1267, 1 jun. 2018.

SCHÄCKE, H. et al. Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 40, p. 25937–43, 2 out. 1998.

SCHMIDT, E. et al. Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid. *Archives of Dermatology*, v. 136, n. 2, p. 174–178, 2000.

- SCHMIDT, E. et al. Meeting Report of the Pathogenesis of Pemphigus and Pemphigoid Meeting in Munich, September 2016 *Journal of Investigative Dermatology*. Anais...Elsevier B.V., 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28390814/>>. Acesso em: 28 jul. 2020
- SCHMIDT, E.; DELLA TORRE, R.; BORRADORI, L. Clinical features and practical diagnosis of bullous pemphigoid. *Dermatologic clinics*, v. 29, n. 3, p. 427–38, viii– ix, maio 2012.
- SCHMIDT, E.; ZILLIKENS, D. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 10, n. 2, p. 84–89, 2010.
- SCHULZE, F. et al. Malignancies in pemphigus and pemphigoid diseases *Journal of Investigative Dermatology* Nature Publishing Group, , 22 maio 2015.
- SELMI, C.; BARIN, J. G.; ROSE, N. R. Current trends in autoimmunity and the nervous system. *Journal of autoimmunity*, v. 75, p. 20–29, 1 dez. 2016.
- SEPPÄNEN, A. et al. Collagen XVII is expressed in human CNS neurons. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 25, n. 3, p. 185–8, 2006.
- SEPPÄNEN, A. et al. Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain research*, v. 1158, p. 50–6, 2007.
- SEPPÄNEN, A. Collagen XVII: a shared antigen in neurodermatological interactions? *Clinical & developmental immunology*, v. 2013, p. 240570, 2013.
- SHLOMCHIK, M. J. Activating systemic autoimmunity: B's, T's, and tolls *Current Opinion in Immunology* Curr Opin Immunol, , dez. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800208/>>. Acesso em: 28 jul. 2020
- SWEENEY, M. D.; SAGARE, A. P.; ZLOKOVIC, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders *Nature Reviews Neurology* Nature Publishing Group, , 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29377008/>>. Acesso em: 10 jul. 2020
- TAGHIPOUR, K. et al. The association of bullous pemphigoid with cerebrovascular disease and dementia: a case-control study. *Archives of dermatology*, v. 146, n. 11, p. 1251–1254, 2010.
- TAKATA, Y. et al. Alogliptin-induced bullous pemphigoid associated with HLA-DQB1*03:01: a case report. *International journal of dermatology*, v. 58, n. 7, p. e132–e133, 10 jul. 2019.
- TARAZONA, M. J. M. et al. Bullous pemphigoid and neurological disease: statistics from a dermatology service. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 90, n. 2, p. 280–282, 2015.
- TASANEN, K. et al. Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *The American journal of pathology*, v. 164, n. 6, p. 2027–38, jun. 2004.
- THOMA-USZYNSKI, S. et al. Autoreactive T and B Cells from Bullous Pemphigoid (BP)

Patients Recognize Epitopes Clustered in Distinct Regions of BP180 and BP230. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 3, p. 2015–2023, 1 fev. 2006.

TSUJI-ABE, Y. et al. Correlation of clinical severity and ELISA indices for the NC16A domain of BP180 measured using BP180 ELISA kit in bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science*, v. 37, n. 3, p. 145–149, 2005.

TUUSA, J. et al. BP180 Autoantibodies Target Different Epitopes in Multiple Sclerosis or Alzheimer's Disease than in Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 2, p. 293–299, 1 fev. 2019.

TZENG, S. F.; HSIAO, H. Y.; MAK, O. T. Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, jun. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101543/>>. Acesso em: 30 jul. 2020

UJIE, H. et al. Immune reaction to type XVII collagen induces intramolecular and intermolecular epitope spreading in experimental bullous pemphigoid models. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JUN, 2019.

VAIRA, F. et al. Bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis association: a genetic predisposition. *The Journal of dermatology*, v. 40, n. 11, p. 940–1, nov. 2013.

VAN BEEK, N. et al. Serum autoantibodies against the dermal-epidermal junction in patients with chronic pruritic disorders, elderly individuals and blood donors prospectively recruited. *British Journal of Dermatology*, v. 170, n. 4, p. 943–947, 2014.

VAN BEEK, N.; ZILLIKENS, D.; SCHMIDT, E. Diagnosis of autoimmune bullous diseases. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, v. 16, n. 9, p. 1077–1091, set. 2018.

VAN ELDIK, L. J. Glia and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11578767/>>. Acesso em: 30 jul. 2020

VARPULUOMA, O. et al. Dermatitis Herpetiformis and Celiac Disease Increase the Risk of Bullous Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 3, p. 600–604, 1 mar. 2019.

VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, Springer Verlag, 1 jul. 2017.

VERNAL, S. et al. Bullous Pemphigoid Associated with Ischemic Cerebrovascular Accident and Dementia: Exclusive Blistering Lesions on the Upper Hemiparetic Limb. *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC*, v. 26, n. 2, p. 179–182, jun. 2018.

VOJDANI, A. The characterization of the repertoire of wheat antigens and peptides involved in the humoral immune responses in patients with gluten sensitivity and Crohn's disease. *ISRN allergy*, v. 2011, 2011.

VOJDANI, A.; GUSHGARI, L. R.; VOJDANI, E. Interaction between food antigens and the

immune system: Association with autoimmune disorders *Autoimmunity Reviews* Elsevier B.V., , 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31917265/>>. Acesso em: 31 jul. 2020

WAKABAYASHI, K. et al. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology*, v. 48, n. 2, p. 531–540, ago. 2008.

WANG, Y. et al. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 14 out. 2014.

WATAD, A. et al. The autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA)/Shoenfeld's syndrome: descriptive analysis of 300 patients from the international ASIA syndrome registry. *Clinical Rheumatology*, v. 37, n. 2, p. 483–493, 1 fev. 2018.

WATAD, A. et al. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) demonstrates distinct autoimmune and autoinflammatory disease associations according to the adjuvant subtype: Insights from an analysis of 500 cases. *Clinical Immunology*, v. 203, p. 1–8, 1 jun. 2019.

XU, L. et al. Characterization of BALB/c mice B lymphocyte autoimmune responses to skin basement membrane component type XVII collagen, the target antigen of autoimmune skin disease bullous pemphigoid. *Immunology letters*, v. 77, n. 2, p. 105–11, 1 jun. 2001.

YANCEY, K. B. Itch, eosinophils, and autoimmunity: A novel murine model of bullous pemphigoid *Journal of Investigative Dermatology* Nature Publishing Group, , 22 maio 2015.

ZABRISKIE, J. B.; FREIMER, E. H. An immunological relationship between the group. A streptococcus and mammalian muscle. *The Journal of experimental medicine*, v. 124, n. 4, p. 661–678, 1966.

ZAKKA, L. R.; RECHE, P.; AHMED, A. R. Role of MHC Class II Genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmunity Reviews*, v. 11, n. 1, p. 40–47, 2011.

ZANELLA, R. R. et al. Bullous pemphigoid in younger adults: three case reports. *An Bras Dermatol*, v. 86, n. 2, p. 355–358, 2011.

ZHENG, M. et al. Characteristics of IgG subclasses and complement deposition in BP230-type bullous pemphigoid. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 33, n. 3, p. 595–600, 1 mar. 2019.

ZHENG, X. et al. Guillain-Barre syndrome caused by hepatitis E infection: Case report and literature review. *BMC Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, 23 jan. 2018.

ANEXO A - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA HUMANO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Associação do penfigoide bolhoso com a demência: Investigação do mimetismo molecular antigênico dos peptídeos hemidesmossomais da pele com peptídeos neuronais

Pesquisador: TAMIRIS AMANDA JULIO

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 57749716.5.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.137.539

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental envolvendo extratos proteicos de linhagem de queratinócitos (KC) e de 3 linhagens neuronais serão utilizados para a produção de anticorpos em coelhos, que serão validados por contra imunoeletroforese e por citometria de fluxo. Em um estudo caso-controle realizado anteriormente com aprovação do CEP do HC-FMRP, foram coletados soros de pacientes com penfigoide bolhoso, pacientes com demência e controles geriátricos. A Imunofluorescência indireta será utilizada para verificar se esses soros, comparados aos anti-BP180/230 comerciais, reconhecem proteínas da pele humana e das 4 linhagens celulares. Ainda, extrato da pele humana e das linhagens celulares serão utilizadas em imunoblotting. As frações proteicas reconhecidas pelos soros dos pacientes e dos animais imunizados serão sequenciadas e analisadas.

Objetivo da Pesquisa:

Tem-se por objetivo geral investigar o mimetismo molecular antigênico dos peptídeos hemidesmossomais da pele humana com peptídeos expressos em linhagens de células neuronais na relação PB e demência.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3802-2228 **Fax:** (16)3833-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.137.539

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nenhum risco para os pacientes, visto que as amostras de soro já foram coletadas anteriormente para o projeto de Mestrado (aprovação CEP: 051174/2015). Há riscos com a execução dos experimentos laboratoriais, incluindo os ensaios propostos e a manipulação dos animais. Porém, a responsável pelo projeto, quem irá desenvolver os ensaios já tem uma experiência com as técnicas e com manipulação de animais, o que ameniza os riscos e também haverá o uso correto de EPIs e todos os cuidados necessários.

Benefícios:

Esse estudo contribuirá para elucidar a relação existente entre os peptídeos da pele e peptídeos neuronais. Espera-se a comprovação da hipótese do mimetismo antigênico entre peptídeos da pele e neuronais, os quais poderão ser sintetizados para estudos futuros.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENDA:

Venho solicitar a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP para realizar uma alteração na metodologia do experimento de Immunoblotting descrito no projeto de pesquisa do meu doutorado. Meu projeto de pesquisa é intitulado "ASSOCIAÇÃO DO PENFIGOIDE BOLHOSO COM A DEMÊNCIA: INVESTIGAÇÃO DO MIMETISMO MOLECULAR ANTIGÊNICO DOS PEPTÍDEOS HEMIDESMOSSOMAS DA PELE COM PEPTÍDEOS NEURONAIS" e o número do parecer é 1.657.036. No momento em que iniciei a execução do experimento havia um estoque de extrato proteico de pele humana previamente estocado no laboratório de Dermatologia do HC-FMRP-USP, o qual se esgotou. Portanto, gostaria da aprovação do Comitê de Ética para obtenção de novos fragmentos de pele humana.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as pendências foram atendidas.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP aprovou a EMENDA bem como o Projeto de pesquisa Versão 4-21/06/2017 e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3 – 02/06/2017. O CEP tomou ciência do relatório parcial do estudo.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.137.539

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_905209_E1.pdf	21/06/2017 11:08:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	21/06/2017 11:07:47	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	autorizacao_HE.pdf	02/06/2017 10:34:21	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Resposta_Pendencias.pdf	02/06/2017 10:31:29	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/06/2017 10:30:30	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Relatorio_Projeto.pdf	09/05/2017 13:19:59	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Carta_Plastica.pdf	18/04/2017 17:35:42	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Carta_Urologia.pdf	18/04/2017 17:35:03	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Alteracao_Proposta_Metodologia.pdf	18/04/2017 17:30:04	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Carta_Encaminhamento_DraMarcia.pdf	18/04/2017 17:28:23	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	biorepositorio.pdf	12/07/2016 11:26:12	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_tcle.pdf	07/07/2016 15:38:02	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto_Tamiris_Julio.pdf	14/06/2016 12:24:37	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Outros	Aprovacao_UPC.pdf	10/06/2016 17:02:49	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	10/06/2016 16:56:16	TAMIRIS AMANDA JULIO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.137.539

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Junho de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – MODELO DA FICHA DO MINI EXAME DO ESTADO MENTAL (MEEM) UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO MENTAL DOS PACIENTES DO GRUPO DEMÊNCIA E CONTROLE

FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO	ESCALAS DE AVALIAÇÃO EM GERIATRIA Divisão de Clínica Médica e Geriatria - Departamento de Clínica Médica -	
Escolaridade: ..... Examinador: ..... Data: ..... / ..... /		
Escore		
ORIENTAÇÃO		
5 ( ) ano-mês - dia do mês - dia da semana - hora aproximada 5 ( ) estado - cidade - bairro - hospital - andar ou setor		
REGISTRO		
3 ( ) pente - vaso - laranja Tentativas:		
ATENÇÃO E CÁLCULO		
5 ( ) seriado descendente de 7: 93,86,79,72,65 ou soletrar "mundo" de trás para frente		
EVOCAÇÃO		
3 ( ) repetir as 3 palavras dadas para registro		
LINGUAGEM		
9 ( ) - denominar um relógio de pulso e uma caneta (2 pontos) - repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto) - atender ao comando 3-estágios: "Pegue o papel com a mão direita, dobre-o ao meio e ponha-o no chão" (3 pontos) - ler e obedecer o seguinte: FECHÉ OS OLHOS (1 ponto) - escrever uma frase (1 ponto): _____ - copiar o desenho (1 ponto)		
Escore total: ..... (máx. 30 pontos)		
- HC. 31.154 i -		

ANEXO C – Escala clínica da demência

	Saudável CDR 0	Demência questionável CDR 0,5	Demência leve CDR 1	Demência moderada CDR 2	Demência grave CDR 3
MEMÓRIA	Sem perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; “esquecimento benigno”	Perda de memória moderada, mais acentuada para fatos recentes; o déficit interfere com atividades do dia a dia	Perda de memória grave; apenas material <i>muito</i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
ORIENTAÇÃO	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Dificuldade moderada com as relações de tempo; orientado no espaço no exame, mas pode ter desorientação geográfica em outros locais	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS	Resolve bem problemas do dia a dia, juízo crítico é bom em relação ao desempenho passado	Leve comprometimento na solução de problemas, semelhanças e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas, semelhanças e diferenças; julgamento social geralmente mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, semelhanças e diferenças. Juízo social geralmente comprometido	Incapaz de resolver problemas ou de ter qualquer juízo crítico
ASSUNTOS NA COMUNIDADE	Função independente na função habitual de trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Leve dificuldade nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente e nestas atividades embora ainda possa desempenhar algumas; pode parecer normal à avaliação superficial	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece suficientemente bem para ser levado a atividades fora de casa	Sem possibilidade de desempenho fora de casa. Parece muito doente para ser levado a atividades fora de casa
LAR E PASSATEMPOS	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais mantidos	Vida em casa, passatempos, e interesses intelectuais levemente afetados	Comprometimento leve, mas evidente em casa; abandono das tarefas mais difíceis; passatempos e interesses mais complicados são também abandonados	Realiza as tarefas mais simples. Interesses muito limitados e pouco mantidos	Sem qualquer atividade significativa em casa
CUIDADOS PESSOAIS	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência no vestir e na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais. Geralmente incontinente

Adaptado de MORRIS, 1993.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

SETOR DE DERMATOLOGIA HCFMRP-USP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Associação do penfigoide bolhoso com a demência: investigação do mimetismo molecular antigênico dos peptídeos hemidesmossomais da pele com peptídeos neuronais”

Local: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

A equipe de profissionais e pesquisadores da Dermatologia do ambulatório de Dermatoses auto-imunes do HCFMRP coordenada pela Professora Dra. Ana Maria Ferreira Roselino está realizando a pesquisa acima. Gostaríamos que você participasse desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

Esta pesquisa refere-se ao Penfigoide Bolhoso, doença auto-imune, com influência genética e não transmissível entre pessoas. É conhecido que o organismo do doente forma anticorpos (substâncias que normalmente fazem a defesa do nosso organismo contra vírus e bactérias) que passam a reagir contra a pele e/ou mucosas. Doenças neurológicas como as demências tem relação com o surgimento do Penfigoide Bolhoso, mas ainda há muito que se conhecer sobre o assunto. A equipe de Dermatologia do ambulatório de Dermatoses auto-imunes do HCFMRP, cujo atendimento é realizado às segundas-feiras, acompanha diversos pacientes com diagnóstico de Penfigoide Bolhoso. Desta forma, estamos iniciando uma pesquisa para investigar a relação entre o Penfigoide Bolhoso e a demência.

Parte deste estudo envolve a realização de experimentos em um laboratório de pesquisa para avaliar a formação de anticorpos em pacientes com penfigoide bolhoso, pacientes com demência e pacientes que não apresentam essas doenças. Para um destes experimentos é necessário extrair proteínas da pele humana. As pessoas que participarem deste estudo irão ceder sobras de pele decorrentes de cirurgia (postectomia ou blefaroplastia) para que sejam obtidas as proteínas. Não será alterada em nada a cirurgia a qual o/a senhor (a) vai se submeter. A pele que será aproveitada iria ser desprezada. A pele cedida será utilizada apenas para a extração das proteínas e será descartada e os dados do paciente não serão identificados e nem divulgados.

A participação nesta pesquisa é voluntária. Você tem a liberdade de recusar ou desistir da participação na pesquisa sem ter penalidade e sem ter nenhum prejuízo ao seu tratamento. A coleta irá ocorrer na data e horário que vier para a cirurgia, para que não tenha nenhum gasto extra com transporte ou alimentação. Conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa, o senhor (a) terá direito a indenização.

Após a assinatura do TCLE abaixo em duas vias de igual teor, ficando uma em sua posse, fica garantido o cumprimento do que foi informado acima. O senhor (a) poderá ter acesso aos resultados da pesquisa através do telefone descrito abaixo. As informações do estudo ficam à disposição do Pesquisador e do Comitê de Ética deste Hospital, podendo ser divulgadas em caráter científico, preservando-se rigorosamente o sigilo da identidade dos participantes. Desde já agradecemos sua participação e sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

DECLARAÇÃO

Eu, _____ registro HC/ RG _____ li o termo de consentimento e aceito participar da pesquisa, de forma voluntária, sem que para isso eu tenha sido forçado ou obrigado.

Nome do participante: _____ assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador: _____ assinatura: _____ data: _____

Pesquisadores responsáveis: Tamiris Amanda Julio / Dra Ana Maria Ferreira Roselino

Telefone Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP: (016) 3602-2228 (dúvidas ☐ éticas) ☐

Telefone do pesquisador responsável: (019) 983910007 ☐

E-mail: aj_tamiris@usp.br

2