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

MARCELA CALIXTO BRANDÃO MIGUEL

TESE DE DOUTORADO

Desmogleína 2 na patogênese do pênfigo foliáceo e do pênfigo vulgar

RIBEIRÃO PRETO

2021

MARCELA CALIXTO BRANDÃO MIGUEL

Desmogleína 2 na patogênese do pênfigo foliáceo e do pênfigo vulgar

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Clínica

Orientadora: Profª. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino

Suporte Financeiro: FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/51729-2), FAEPA – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência.

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

RIBEIRÃO PRETO

2021

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Miguel, Marcela Calixto Brandão

Desmogleína 2 na patogênese do pênfigo foliáceo e do pênfigo vulgar.

Marcela Calixto Brandão Miguel; Orientadora Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino. –
Ribeirão Preto, 2021. 212 f.

Tese (Doutorado Direto) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Clínica.

Acantólise. Desmogleína 1. Desmogleína 2. Desmogleína 3. Pênfigo. Pênfigo vulgar.

MIGUEL, M.C.B. Desmogleína 2 na patogênese do pênfigo foliáceo e do pênfigo vulgar.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências do Programa de Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Clínica.

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese a Deus, que me guiou durante toda a trajetória para completar esta etapa importante da minha vida e continua iluminando meu caminho, das pessoas que eu amo e dos pacientes que eu acompanho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, que me ensinaram desde sempre os valores mais importantes que eu carrego, a humildade, o amor e o respeito às pessoas, a dedicação e a persistência. Eles me apoiaram em todas as etapas da minha vida e são exemplos de seres humanos para mim. Amo vocês!

Ao meu marido Licério Miguel, melhor companheiro que eu poderia escolher. Vivenciei comigo no dia a dia todas as dificuldades, angústias e alegrias durante o doutorado. Ele me dá forças para ser sempre melhor e cuida muito bem de mim. Tenho muito orgulho de você, te amo!

Às minhas filhas Helena e Maria, que me deram inspiração e energia para finalizar o doutorado. Aos meus irmãos Fernanda e Raul que me ensinaram desde pequena a saber dividir e a multiplicar a união e as alegrias. Também me apoiaram sempre em tudo e compreenderam quando eu não pude estar tão presente. Estamos juntos para sempre.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Roselino, por toda a confiança e apoio durante o meu doutorado. Por estar sempre presente e ser um exemplo de dermatologista e pesquisadora para mim.

À Aline Turatti, pelo auxílio nos experimentos de imunohistoquímica, imunofluorescência e extração de DNA. Obrigada por estar sempre tão disposta a me ajudar, pelo carinho e pela sua amizade.

À Natália de Paula, pelo auxílio na aprendizagem da extração de RNA, RT-PCR e também na discussão de todas as outras técnicas laboratoriais que eu realizei ao longo do meu projeto. Obrigada também pelo carinho e pela amizade.

À Tamiris Julio, pela paciência em realizar comigo os ELISAs, extração de proteínas e *immunoblottings*. Obrigada por me ajudar na montagem das aulas e na escrita dos textos. Minha companheira de experimentos e minha amiga.

Ao Sebastián Vernal, pela sabedoria compartilhada, por ter me ensinado *immunoblotting*, ter me ajudado com análises estatísticas, escrita de textos e pela amizade.

À Sandra pela ajuda com a RT-PCR, pela disponibilidade e conhecimentos compartilhados, e à Flávia pela ajuda com os ELISAs e *immunoblottings*, pela companhia e pela amizade.

Aos queridos colegas da pós-graduação Tamiris, Sebastian, Victor, Ludmila e Ederson pelas discussões de sexta feira, pelo conhecimento e experiências compartilhados.

Ao Fernando Henrique Alves pela parceria nas biópsias de pele e mucosa.

À Aline Rafaela pela realização de parte dos ELISAs anti-DSG1 e 3 comerciais e pelos experimentos piloto de ELISA *in house* anti-DSG2 e à Margarida pelo auxílio nos experimentos piloto de ELISA *in house* anti-DSG2.

À Cristina, secretária da Dermatologia, pela atenção e disponibilidade em sempre ajudar.

A todos os médicos assistentes do ambulatório de Dermatoses Autoimunes, Roberto, Letícia, Fernanda, Juliana e Andressa, e aos residentes de dermatologia pelo conhecimento compartilhado na discussão de casos dos pacientes e pela companhia sempre agradável.

Ao 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.

Às minhas amigas dermatologistas de Botucatu, pela amizade, pela discussão de casos, pelo apoio e paciência com minhas reclamações nos períodos mais difíceis do doutorado.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MIGUEL, M.C.B. Desmogleína 2 na patogênese do pênfigo foliáceo e do pênfigo vulgar. 212f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: Pênfigos são doenças bolhosas autoimunes, que afetam a pele e as mucosas, cuja produção de autoanticorpos IgG contra desmogleínas (DSGs) leva à acantólise. No pênfigo foliáceo (PF), há acometimento exclusivo da pele, por produção de anti-DSG1; no pênfigo vulgar (PV) forma mucosa, de anti-DSG3, e no PV forma mucocutânea, de anti-DSG 1 e 3. A teoria multipatogênica sugere a participação de outras moléculas não-DSG 1 e 3 na acantólise. A DSG2 é a isoforma de caderina desmossomal mais disseminada no organismo, porém, sua função na manutenção da integridade da epiderme e na patogênese dos pênfigos continua sendo estudada. **Hipótese:** A DSG2 estaria relacionada ou não à acantólise nos pênfigos, pela produção de anti-DSG2 ser patogênica ou decorrer do fenômeno de *epitope-spreading*, respectivamente. **Objetivos:** Determinar a produção de anticorpos contra DSG2 e correlacioná-los com os dados demográficos e clínicos, e com anti-DSG 1 e 3, e a concentração do peptídeo DSG2 em amostras de soro de pacientes com PF e PV, comparados aos indivíduos controles; e comparar a expressão proteica e gênica das DSGs 1, 2 e 3 em amostras de pele e/ou mucosa de pacientes com PF e PV. **Casuística e métodos:** Estudo transversal com amostras de 202 pacientes com PF, 131 com PV, 51 familiares de PF (FPF), 57 FPV e 114 controles. A determinação de anticorpos contra DSGs foi feita por ELISA e *imunoblotting* (IB). Os títulos de anti-DSG 1 e 3 foram determinados por kits comerciais, e de anti-DSG2, por ELISA *in house*. IB foi realizado com extrato de epiderme humana incubada com soro de 7 pacientes com PF, 7 PV, 5 FPF, 5 FPV e 4 controles. A determinação do peptídeo DSG2 no soro de 25 pacientes com PF, 17 PV e 42 controles foi realizada por kit ELISA comercial. Para a expressão proteica e gênica das DSGs, utilizou-se amostras de pele íntegra (PI) e pele lesional (PL), e de mucosa íntegra (MI) ou lesional (ML) de 3 pacientes com PF e de 3 com PV, comparadas à pele normal controle. Imunohistoquímica (IHQ) foi realizada com anticorpos monoclonais contra as DSGs, e RT-PCR com primers específicos para cada DSG. Para a análise estatística, utilizou-se testes não paramétricos e análise de variância. **Resultados:** Os títulos de anti-DSG2 foram maiores nos grupos PF, PV e FPV, comparados aos controles ($p<0,0001$), e maiores no grupo PF em relação ao FPF ($p<0,0046$). A soroprevalência de anti-DSG2 foi maior nos grupos PF (63,9%), PV (66,4%) e FPV (73,7%), em comparação ao controle (27,2%) ($p<0,0001$), e foi maior no grupo PF, comparado ao FPF ($p<0,0012$). A correlação entre os níveis de anti-DSG1 e anti-DSG2 foi significativa no PF ($r=0,175$; $p=0,012$); no PV, houve tendência à correlação positiva entre anti-DSG3 e anti-DSG2 ($r=0,167$, $p=0,056$). No grupo PF, houve correlação positiva entre a idade e os títulos de anti-DSG2 ($r=0,1457$, $p=0,0385$); e o gênero masculino apresentou níveis mais elevados de anti-DSG2, comparado ao gênero feminino ($p=0,0092$). No grupo PV, os títulos de anti-DSG2 foram maiores no grupo sem tratamento comparados àqueles em tratamento sem e com lesões ativas ($p=0,0110$ e $p=0,0311$, respectivamente). IB não permitiu discriminar as bandas de 150 kDa (DSG2) ou de 160 kDa (DSG1) pelas amostras de soro. A expressão proteica da DSG2 ocorreu em toda a epiderme íntegra e no teto e assoalho das bolhas na pele de PF e PV. Grânulos de DSG1 e DSG3, mas não de DSG2, foram observados em amostras lesionais de PF e PV, respectivamente. Os genes DSG1 e DSG3 foram tipicamente expressos na pele de PF e PV; a expressão gênica de DSG2 foi maior nas mucosas

de PF e PV. **Conclusões:** Anticorpos anti-DSG2 estão presentes no soro de pacientes com pênfigo, e também de familiares e controles, indícios de que não são patogênicos isoladamente nos pênfigos. O peptídeo DSG2 teve concentração similar nos pacientes com pênfigos e nos controles saudáveis, o que favorece a hipótese de que ele não tem participação nos pênfigos. IB e ELISA são técnicas diferentes usadas para detecção da ligação antígeno-anticorpo. A ausência de internalização da DSG2, comparada às DSG 1 e 3 no PF e PV, respectivamente, favorece não ter participação nos mecanismos de acantólise. A maior expressão proteica da DSG2 nas amostras dos pacientes com PF e PV em relação à pele normal controle pode ter ocorrido para auxílio no reparo tecidual. Como conclusão final, os autoanticorpos anti-DSG2 não são patogênicos nos pênfigos.

Palavras chaves: Acantólise. Desmogleína 1. Desmogleína 2. Desmogleína 3. Pênfigo. Pênfigo vulgar.

ABSTRACT

MIGUEL, M.C.B. Desmoglein 2 in the pathogenesis of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. 212p. Dissertation (Doctorate) –Ribeirão Preto Medical University, São Paulo University, Ribeirão Preto, 2021.

Introduction: Pemphigus are autoimmune bullous diseases that affect the skin and mucous membranes, whose production of IgG autoantibodies against desmogleins (DSGs) leads to acantholysis. In pemphigus foliaceus (PF), there is exclusive involvement of the skin, by production of anti-DSG1; in pemphigus vulgaris (PV) mucosa form, anti-DSG3, and in PV mucocutaneous form, anti-DSG 1 and 3. The multipathogenic theory suggests the participation of other non-DSG1 and 3 molecules in acantholysis. DSG2 is the most widespread desmosomal cadherin isoform in the body, but its function in maintaining the epidermis integrity and in pemphigus' pathogenesis continues to be studied. Hypothesis: DSG2 would be related or not to acantholysis in pemphigus, because the production of anti-DSG2 is pathogenic or the result of an epitope-spreading phenomenon, respectively. **The aim of this study:** To determine the production of antibodies against DSG2 and correlate them with demographic and clinical data, and with anti-DSG 1 and 3, and the concentration of the Peptide DSG2 in serum samples of patients with PF and PV, compared to control individuals; and to compare the protein and gene expression of DSGs 1, 2 and 3 in skin and/or mucosal samples of patients with PF and PV. **Methods:** Cross-sectional study with samples of 202 patients with PF, 131 with PV, 51 relatives of PF (PFR), 57 PVR and 114 controls. Antibodies against DSGs were determined by ELISA and immunoblotting (IB). The titles of anti-DSG 1 and 3 were determined by commercial kits, and anti-DSG2, by ELISA in house. IB was performed with human epidermis extract incubated with serum from 7 patients with PF, 7 PV, 5 PFR, 5 FPV and 4 controls. The determination of the DSG2 peptide in the serum of 25 patients with PF, 17 PV and 42 controls was performed by commercial ELISA kit. For the protein and gene expression of DSGs, we used samples of intact skin (IS) and lesional skin (LS), and intact mucosa (IM) or lesional mucosa (LM) of 3 patients with PF and 3 with PV, compared to normal control skin. Immunohistochemistry (IHQ) was performed with monoclonal antibodies against DSGs, and RT-PCR with primers specific to each DSG. For statistical analysis, nonparametric tests and variance analysis were used. **Results:** Anti-DSG2 titers were higher in the PF, PV and PVR groups, compared to controls ($p<0.0001$), and higher in the PF group in relation to PFR ($p<0.0046$). The seroprevalence of anti-DSG2 was higher in the PF (63.9%), PV (66.4%) and PVR (73.7%), compared to control (27.2%) ($p<0.0001$), and was higher in the PF group, compared to PFR ($p<0.0012$). The correlation between anti-DSG1 and anti-DSG2 levels was significant in PF ($r=0.175$; $p=0.012$); in PV, there was a tendency to positive correlation between anti-DSG3 and anti-DSG2 ($r=0.167$, $p=0.056$). In the PF group, there was a positive correlation between age and anti-DSG2 titers ($r=0.1457$, $p=0.0385$); and males had higher levels of anti-DSG2 compared to females ($p=0.0092$). In the PV group, anti-DSG2 titers were higher in the untreated group compared to those undergoing treatment without and with active lesions ($p=0.0110$ and $p=0.0311$, respectively). IB did not allow the 150 kDa (DSG2) or 160 kDa (DSG1) bands to be discriminated by serum samples. The protein expression of DSG2 occurred throughout the intact epidermis and on the ceiling and floor of the blisters on the skin of PF and PV. DSG1 and DSG3 granules, but not DSG2 granules, were observed in lesional samples of PF and PV, respectively. The DSG1 and DSG3 genes were typically expressed in PF and PV skin; the gene

expression of DSG2 was higher in the mucous membranes of PF and PV. **Conclusion:** Anti-DSG2 antibodies are present in the serum of patients with pemphigus, and also of relatives and controls, indications that they are not pathogenic in pemphigus alone. The Peptide DSG2 had similar concentration in patients with pemphigus and healthy controls, which favors the hypothesis that it has no participation in pemphigus. IB and ELISA are different techniques used for antigen-antibody binding detection. The absence of internalization of DSG2, compared to DSG 1 and 3 in PF and PV, respectively, favors not having participation in the mechanisms of acantholysis. The higher protein expression of DSG2 in the samples of patients with PF and PV in relation to normal control skin may have occurred to aid tissue repair. As a final conclusion, anti-DSG2 autoantibodies are not pathogenic in pemphigus.

Keywords: Acantholysis. Desmoglein 1. Desmoglein 2. Desmoglein 3. Pemphigus. Pemphigus vulgaris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura desmossomal.....	37
Figura 2. Representação esquemática das estruturas proteicas das desmogleínas 1, 2 e 3.....	39
Figura 3. Distribuição das proteínas desmossomais nas diferentes camadas celulares da epiderme.....	39
Figura 4. O papel dos autoanticorpos anti-desmogleína 1 e 3 nos mecanismos de acantólise.....	45
Figura 5. Teoria da Compensação das Desmogleínas.....	46
Figura 6. Representação esquemática das amostras de pele e/ou mucosa biopsiadas dos pacientes com PF e PV.....	59
Figura 7. Curva padrão-resposta para a determinação da concentração da DSG2 a ser definida para o método ELISA <i>in house</i>	61
Figura 8. Curvas ROC com valores de ELISA anti-DSG2 para determinação do valor <i>cut-off</i>	63
Figura 9. Distribuição dos valores de anti-DSG2 (DO) no grupo controle.....	64
Figura 10. Curva padrão-resposta do teste ELISA sanduíche para determinação de DSG2 em amostras de soro.....	66
Figura 11. Curvas ROC para determinação do valor de <i>cut-off</i> da concentração do peptídeo DSG2 nos grupos estudados.....	67
Figura 12. Gel de poliacrilamida corado pela prata após corrida eletroforética de extrato proteico de epiderme humana.....	70
Figura 13. Coloração da membrana de nitrocelulose por <i>Ponceau S Stain</i> com os extratos proteicos de epiderme humana.....	72
Figura 14. Gel de agarose para avaliar a integridade do RNA.....	77

Figura 15. Teste para a definição do gene endógeno utilizado na normalização das reações de RT-PCR.....	79
Figura 16. Blast das sequências obtidas na RT-PCR com cDNA de pele normal e primers específicos para DSG 1, 2 e 3 para confirmar a especificidade.....	81
Figura 17. Títulos de anticorpos IgG contra DSG2 por ELISA <i>in house</i> nos grupos em estudo.....	87
Figura 18. Títulos de anticorpos IgG contra DSG 1 e 3 por ELISA nos grupos em estudo.....	88
Figura 19. Curvas ROC dos resultados anti-DSG 1, 2 e 3 dos grupos PF, PV, e PF+PV, comparados ao grupo controle.....	91
Figura 20. Correlação entre os títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo pênfigo foliáceo (PF)	92
Figura 21. Correlação dos títulos de anti-DSG1 e de anti-DSG3 com os títulos de anti-DSG2 no grupo pênfigo vulgar (PV)	93
Figura 22. Correlação dos títulos de anti-DSG2 com a idade dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF)	94
Figura 23. Comparação dos títulos de anti-DSG2 com o gênero no grupo pênfigo foliáceo (PF)	94
Figura 24. Correlação da duração da doença com os títulos de anti-DSG2 nos grupos pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV)	95
Figura 25. Títulos de anti-DSG2 em relação às formas de tratamento no grupo pênfigo vulgar.....	96
Figura 26. Títulos de anticorpos IgG contra DSG2 nos grupos PF e PV sem tratamento, comparados aos grupos FPF, FPV e controle.....	97

Figura 27. Títulos de anti-DSG 1 e 3 (U/mL) em relação ao tratamento e à atividade da doença nos grupos pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV)	98
Figura 28. Comparação dos títulos de anti-DSG2 (DO) nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar sem tratamento.....	99
Figura 29. Comparação dos títulos de anti-DSG1 (U/mL) nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) sem tratamento.....	100
Figura 30. Comparação dos títulos de anti-DSG3 nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) sem tratamento.....	100
Figura 31. Concentração do peptídeo DSG2 nos grupos pênfigo foliáceo (PF), pênfigo vulgar (PV) e controle.....	105
Figura 32. Immunoblotting com amostras de soro de pacientes com PF e PV para detecção de DSGs em extrato de epiderme humana.....	109
Figura 33. <i>Imunnoblotting</i> com amostras do soro dos grupos FPF, FPV e controle para detecção de DSGs em extrato de epiderme humana.....	110
Figura 34. Histologia dos cortes congelados de pele e mucosa, corados por H&E (hematoxilina-eosina), de pacientes com PF.....	114
Figura 35. Histologia dos cortes congelados de pele e mucosa, corados por H&E (hematoxilina-eosina), de pacientes com PV.....	116
Figura 36. Histologia de corte congelado de pele corado por H&E (hematoxilina-eosina), de controle saudável.....	117
Figura 37. Imuno-histoquímica da biópsia de pele íntegra do paciente com PF1.....	119
Figura 38. Imuno-histoquímica das biópsias de pele e da mucosa do paciente com PF2....	120
Figura 39. Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias de pele do paciente com PF2.....	121

Figura 40. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias de pele do paciente com PF2.....	122
Figura 41. Imuno-histoquímica das biópsias de pele do paciente com PF3.....	123
Figura 42. Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias de pele do paciente com PF3.....	124
Figura 43. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias de pele do paciente com PF3.....	124
Figura 44. Imuno-histoquímica da biópsia da mucosa do paciente com PV2.....	125
Figura 45. Imuno-histoquímica das biópsias de pele e mucosa do paciente com PV3.....	126
Figura 46. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias de pele do paciente com PV3.....	127
Figura 47. Imuno-histoquímica da DSG3 nas biópsias de pele do paciente com PV3.....	127
Figura 48. Imuno-histoquímica da biópsia da mucosa do paciente com PV4.....	128
Figura 49: Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias da mucosa.....	129
Figura 50. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias da mucosa.....	129
Figura 51: Imuno-histoquímica da DSG3 nas biópsias da mucosa.....	130
Figura 52. Imuno-histoquímica de pele normal de controle saudável.....	130
Figura 53: Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG1.....	132
Figura 54. Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG2.....	132

Figura 55. Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG3.....	133
Figura 56. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 441 pb correspondentes à sequência da DSG1.....	134
Figura 57. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 793 pb correspondentes à sequência da DSG2.....	135
Figura 58. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 107 pb correspondentes à sequência da DSG3.....	135
Figura 59. Expressão gênica relativa das DSG 1, 2 e 3 na pele de <i>lifting</i>	139
Figura 60. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele íntegra e lesional dos pacientes com PF.....	140
Figura 61. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras da mucosa lesional dos pacientes com PV.....	141
Figura 62. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 na pele íntegra dos pacientes com PF e PV.....	141
Figura 63. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 na pele lesional dos pacientes com PF e PV.....	142
Figura 64. Expressão gênica relativa da DSG 2 em todas as amostras de pele e mucosa dos pacientes com PF e PV.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação das amostras de RNA extraído de biopsias de pele e da mucosa de pacientes com PF e PV, antes e após o tratamento com DNase.....	76
Tabela 2. Primers <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) e ciclos para a determinação de sequências das DSG 1, 2 e 3, e dos genes endógenos ribossomal (18S) e GAPDH humanos.....	78
Tabela 3. Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos PF, PV, FPF, FPV e controles.....	85
Tabela 4. Soroprevalência dos anticorpos anti-DSG 1, 2 e 3 nos grupos de estudo.....	90
Tabela 5. Títulos de anticorpos anti-DSG2 (em densidade óptica) nas amostras de PF e PV após 4 ensaios seriados de adsorção com o peptídeo DSG2 por ELISA indireto.....	101
Tabela 6. Títulos de anti-DSG 1 e 3 pré e pós-adsorção dos soros de pacientes com PF e PV com o peptídeo DSG2.....	102
Tabela 7. Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos PF, PV e controle no ensaio de dosagem de DSG2.....	104
Tabela 8. Dados demográficos e clínicos, resultados dos ensaios ELISA anti-DSG 1, 2 e 3, e do immunoblotting dos grupos PF e PV, FPF, FPV e controle.....	106
Tabela 9. Dados demográficos e clínicos, e titulação de anticorpos contra DSG 1, 2 e 3 por ELISA dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa.....	112
Tabela 10. Cycle threshold (cT) do gene endógeno 18S e das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele e/ou mucosa de cada paciente com PF e PV.....	137
Tabela 11. Expressão gênica relativa de cDNA ($\times 10^{-4}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele e/ou mucosa de cada paciente com PF e PV.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS:	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ADAI:	Ambulatório de Dermatoses Autoimunes
CTL:	Grupo Controle
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DO:	Densidade óptica medida por absorbância em espectrofotômetro
DSC:	Desmocolina
DSG:	Desmogleína
EDTA:	Anticoagulante Ácido Etilenedinitrilotetracético
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático, do inglês “Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay”
FAPESP:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FPF:	Grupo de Familiares dos pacientes com Pênfigo Foliáceo
FPV:	Grupo de Familiares dos pacientes com Pênfigo Vulgar
HCRP-FMRP-USP:	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
H&E:	Hematoxilina e Eosina
IB:	<i>Immunoblotting</i> (técnica)
IgG:	Imunoglobulina do isotipo G
IL:	Interleucinas
KC:	Queratinócito
kDa:	Quilodaltons (medida de peso para proteínas)
LF:	<i>Lifting</i> facial

MI:	Mucosa íntegra
ML:	Mucosa lesional
NA:	Não aplicável ao grupo/ Não avaliado
ND:	Dados não disponíveis para análise
PBS:	Tampão Bicarbonato-Fosfato pH=7,0 ou inglês “ <i>Phosphate buffered saline</i> ”
PF:	Pênfigo foliáceo
PG:	Placoglobina
PI:	Pele íntegra
PL:	Pele lesional
PMSF:	Solução de Fluoreto Sulfonil Fenilmetano
PV:	Pênfigo vulgar
<i>r</i> :	coeficiente de correlação de Spearman
SDS:	Solução Dodecil sulfato de sódio
TA:	Temperatura ambiente
TBS:	Solução Salina Tris-tamponada
TTBS:	Solução Salina Tris-tamponada (TBS) e polissorbato 20
TMB/H ₂ O ₂ :	Tetrametilbenzidina conjugada com Peróxido de Hidrogênio
Tris-HCL:	Solução de Cloridrato de Tris (hidroximetil) aminometano
U/mL:	Unidades de valor por mL de amostra testada

SÍMBOLOS

μL :	microlitro
H_2SO_4 :	Solução de ácido sulfúrico
mL :	mililitro
μg :	micrograma
ng :	nanograma
pg :	picograma
nm :	nanômetros – comprimento de onda do espectrofotômetro
$^{\circ}\text{C}$:	Graus Celsius
$\%$:	porcentagem
P :	valor P

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1) Introdução	31
2.2) Epidemiologia dos pênfegos	31
2.3) Etiopatogênese dos pênfegos	32
2.4) Fisiopatologia e mecanismos da acantólise nos pênfegos	37
2.5) Teoria da compensação das desmogleínas	45
2.6) Quadro clínico	47
2.7) Teoria multipatogênica dos pênfegos	47
2.8) Desmogleína 2	49
2.9) <i>Epitope-spreading</i>	51
3. OBJETIVOS	53
3.1) Objetivo geral	54
3.2) Objetivos específicos	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1) Aspectos éticos	56
4.2) Tipo de estudo epidemiológico	56
4.3) Caracterização da população estudada	56
4.4) Coleta e preparo das amostras de pele e mucosa	58
4.5) ELISA para detecção e quantificação dos anticorpos contra as proteínas DSG1 e DSG3	59
4.6) ELISA <i>in house</i> para a quantificação dos anticorpos contra DSG2	60

4.7) Adsorção dos soros com o peptídeo DSG2 para verificar a especificidade dos anticorpos contra DSGs 1, 2 e 3	64
4.8) ELISA sanduíche para a detecção do peptídeo DSG2	64
4.9) <i>Western blotting</i> para verificar o reconhecimento das DSGs 1, 2 e 3 do extrato de epiderme humana por amostras de soros de pacientes e controles	67
4.10) Coloração de hematoxilina-eosina	72
4.11) Imuno-histoquímica (IHQ) para detecção da expressão proteica das DSGs 1, 2 e 3 nas biópsias de pele e mucosa	73
4.12) RT-PCR para detecção da expressão gênica das DSGs 1, 2 e 3 nas biopsias de pele e mucosa	74
4.13) Estudo estatístico	82
5. RESULTADOS	83
5.1) Análise dos dados demográficos e clínicos da casuística estudada	84
5.2) Titulação dos anticorpos IgG anti-DSG 1, 2 e 3	87
5.3) Soroprevalência dos anticorpos IgG contra DSG 1, 2 e 3	88
5.4) Curvas ROC dos resultados anti-DSG 1, 2 e 3 nos grupos PF e PV, comparados ao controle	90
5.5) Correlação dos títulos de anti-DSG2 com anti-DSG 1 e 3 nos grupos PF, PV e controle	92
5.6) Correlação dos títulos de anti-DSG2 com as variáveis demográficas	93
5.7) Correlação dos títulos de anti-DSG 1, 2 e 3 com a duração, tratamento e atividade dos pênfigos	94

5.8) Correlação dos títulos de anti-DSG 1, 2, 3 com as formas clínicas do PF e PV no subgrupo sem tratamento (virgens de tratamento e sem tratamento há mais de 60 dias)	98
5.9) Teste de adsorção dos soros com o peptídeo DSG2	101
5.10) Detecção do peptídeo DSG2 por ELISA sanduíche nos grupos PF e PV sem tratamento e no grupo controle	102
5.11) <i>Immunoblotting</i> com extrato de epiderme humana e soro de pacientes, familiares e controles	105
5.12) Amostras de pele e mucosa utilizadas no ensaio RT-PCR e na IHQ coradas por hematoxilina-eosina	110
5.13) Expressão proteica das DSG 1, 2 e 3 na pele e/ou mucosa de pacientes com pênfigo, por imuno-histoquímica	117
5.14) Expressão gênica das DSG 1, 2 e 3 por RT-PCR nas amostras de pele e mucosa de pacientes com PF e PV	130
6. DISCUSSÃO	144
7. CONCLUSÕES	160
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	163
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
10. ANEXOS	178
10.1) Parecer de aprovação do comitê de ética humano (em anexo 2 páginas)	179
10.2) Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	181
10.3) Manuscrito submetido a publicação	182

1. INTRODUÇÃO

Pênfigos são doenças bolhosas autoimunes, caracterizados pela produção de autoanticorpos IgG contra moléculas desmossomais, resultando na perda da coesão entre os queratinócitos (KCs) - denominada acantólise (EGAMI; YAMAGAMI; AMAGAI, 2020; WILGRAM; CAULFIELD; LEVER, 1961). Alelos *HLA* e fatores ambientais estão associados à etiopatogênese dos pênfigos (HAMMERS; STANLEY, 2016; KASPERKIEWICZ et al., 2017; POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

As principais moléculas-alvo envolvidas na patogênese dos pênfigos são as desmogleínas (DSG) - proteínas transmembrana, pertencentes à família das caderinas, responsáveis pela adesão dos KCs (HAMMERS; STANLEY, 2016; HASHIMOTO T, OGAWA MM, KONOYANA A, 1990).

O pênfigo foliáceo (PF) manifesta-se clinicamente por lesões exclusivamente cutâneas, e os autoanticorpos IgG são dirigidos contra a DSG1, levando à acantólise subcórnea. No pênfigo vulgar (PV), quando os autoanticorpos IgG são dirigidos contra a DSG3, acarretando acantólise supra basal, o envolvimento é exclusivo das mucosas. Quando são dirigidos contra as DSG 1 e 3, a pele e as mucosas são afetadas (HAMMERS; STANLEY, 2016; MAHONEY et al., 1999; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

O mecanismo da acantólise nos pênfigos ainda não é totalmente conhecido. A ligação dos autoanticorpos IgG às DSGs resulta em mecanismos sinérgicos, tais como: inibição direta da transinteração homofílica e heterofílica, gerando bloqueio da adesão entre as DSGs, e das DSGs com as desmocollinas (DSC) (ISHII et al., 2020; KASPERKIEWICZ et al., 2017; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019); ativação de vias de sinalização intracelulares: p38 *mitogen-activated protein kinase*

(MAPK) e seu efector MAPK-*activated protein kinase 2* (MK2), *epidermal growth factor receptor* (EGFR), RHO GTPases; c-MYC, fosfolipase C (PLC) e sua forma ativada fosfoquinase C (PKC) e caspases, que promovem o enfraquecimento da adesão celular (HAMMERS; STANLEY, 2016; KASPERKIEWICZ et al., 2017; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019); e alteração da organização das DSGs na superfície do KC por internalização citoplasmática, levando à depleção das DSGs desmossomais (IWATSUKI et al., 1999; KASPERKIEWICZ et al., 2017; OKTARINA et al., 2011; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019; SPINDLER et al., 2017).

A hipótese da "compensação das desmogleínas", proposta por Mahoney et al., em 1999, é a mais clássica para explicar a fisiopatologia da acantólise nos pênfigos, na qual a distribuição das DSG 1 e 3 na pele e nas mucosas, e o perfil dos autoanticorpos apresentados pelos pacientes com PF e PV determinam a localização das bolhas acantolíticas na pele e/ou mucosas nas diferentes camadas epidérmicas (KASPERKIEWICZ et al., 2017; MAHONEY et al., 1999; SPINDLER et al., 2017). Como esta hipótese monopatogênica não se aplica à patogênese da totalidade dos casos de pênfigo, Grando et al. sugeriram a teoria da participação de "múltiplas moléculas" na patogênese da acantólise (GRANDO, 2000). Sardana et al. retomaram esta hipótese em 2013, e Ahmed et al., em 2016, descreveram a "teoria multipatogênica" (AHMED et al., 2016; SARDANA; GARG; AGARWAL, 2013). De acordo com esta teoria, é necessária a inativação simultânea e sincronizada de diferentes mecanismos fisiológicos, que regulam a adesão intercelular dos KCs, para acarretar o fenômeno da acantólise intraepidérmica. Ainda, análises dos perfis sorológicos de pacientes com pênfigo também revelaram a produção de autoanticorpos contra DSCs (ISHII et al., 2015), receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina (GRANDO, 2000), proteínas mitocondriais e

outras moléculas intracelulares, que apoiam esta última hipótese (AHMED et al., 2016; DI ZENZO; BORRADORI; MULLER, 2017; SARDANA; GARG; AGARWAL, 2013). Mais recentemente, foi proposta por Sinha e Sajda, para a patogênese do PV, a hipótese da “Supercompensação”, na qual a soma da atuação de anticorpos patogênicos ou não patogênicos pode desencadear a acantólise (SINHA; SAJDA, 2018).

A DSG2 é a proteína desmossomal mais abundante no corpo humano (SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994) e, ao contrário das DSG 1 e 3, não é expressa somente na epiderme, mas também nos tecidos cardíaco, endotelial, e mucosas respiratória e gastrointestinal (AMAGAI; STANLEY, 2012; EBERT et al., 2016; HARTLIEB et al., 2014). É responsável pela integridade epitelial dos tratos respiratório e intestinal (HARTLIEB et al., 2014), além de ser receptor de alguns adenovírus no pulmão (WANG et al., 2011). No entanto, sua função na integridade da epiderme e na patogênese dos pênfigos ainda não está completamente elucidada (AMAGAI; STANLEY, 2012; FRANK et al., 2001; HARTLIEB et al., 2014; SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994).

Ainda, *epitope-spreading* é um fenômeno no qual, na vigência de processo inflamatório, são expostos antígenos diversos do alvo inicial, gerando a produção de novos autoanticorpos (VANDERLUGT; MILLER, 1996). Pode ser intramolecular ou intermolecular (CORNABY et al., 2015; LI et al., 2003; OHYAMA et al., 2012). No processo patogênico da acantólise, poderia haver exposição da DSG2, com consequente produção de autoanticorpos contra a DSG2 pelo fenômeno de *epitope-spreading*. Como a acantólise no PV é supra basal – coincidente com a região de maior expressão da DSG2 – formulamos a hipótese de que este fenômeno de possível exposição antigênica pudesse ser mais pronunciado no PV, em relação ao PF.

Considerando essa hipótese e por haver raros estudos relacionados à DSG2 nos pênficos (BRENNAN et al., 2010; FLORES et al., 2012; HARTLIEB et al., 2014; IWATSUKI et al., 1999; OTA et al., 2003), teve-se por objetivo estudar a participação da DSG2 na patogênese dos pênficos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Introdução

A palavra pênfigo deriva do grego ‘*pemphix*’, que significa bolha, e descreve um grupo de dermatoses bolhosas autoimunes, nas quais anticorpos IgG se ligam aos contradomínios extracelulares de proteínas de membrana dos KCs resultando na perda da adesão celular, denominada acantólise. Há diferentes variantes clínicas dos pênfigos, sendo os clássicos denominados pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV), e os demais, pênfigo por IgA, pênfigo paraneoplásico, pênfigo herpetiforme, pênfigo vegetante (variante do PV) e pênfigo eritematoso (variante do PF). Nos pênfigos clássicos, os anticorpos são da classe IgG (na doença em atividade, em geral IgG4), contra peptídeos denominados desmogleínas (DSGs) 1 e 3, que fazem parte de estruturas da adesão celular na epiderme da pele e mucosas (EGAMI; YAMAGAMI; AMAGAI, 2020; KASPERKIEWICZ et al., 2017; POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

2.2) Epidemiologia dos pênfigos

O PV é a forma clínica mais comum no mundo, com incidência variável entre os países, de 0,76/milhão de habitantes na Finlândia a 16,1/milhão em Jerusalém (judeus *Ashkenazi*), sem preferência por gênero (KRIDIN; ZELBER-SAGI; BERGMAN, 2017). Afeta principalmente adultos com pico de incidência entre a quarta e sexta décadas de vida. Antes do advento do tratamento com corticosteroides e imunossupressores, o prognóstico da doença era ruim, com mortalidade de 100% em 5 anos, e de 50% em 2 anos, em consequência de complicações secundárias, como infecções e desnutrição. Após a descoberta dos corticoides, a mortalidade diminuiu para 10%, mas ainda se mantém, principalmente devido às consequências do uso crônico de imunossupressores

(POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

O PF possui 2 formas de apresentação: a esporádica, também denominada pênfigo de Cazenave, com distribuição mundial, mais rara, e outra endêmica, conhecida como Fogo Selvagem (FS) no Brasil, relacionada a determinadas áreas geográficas. A diferença entre ambas é a epidemiologia. O FS é endêmico no Brasil, na Tunísia e outros países da América do Sul como Colômbia, Peru, Paraguai e Venezuela (GONÇALVES et al., 2011; POLLMANN et al., 2018). No Brasil, foram descritos focos no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Minas Gerais, Paraná e São Paulo (CELERE et al., 2017b). Predomina em indivíduos adultos jovens, moradores de áreas rurais e em membros familiares. Nas áreas endêmicas, sua incidência é bastante elevada, com cerca de 25 casos por milhão de habitantes por ano. Estudo descritivo retrospectivo, realizado em área endêmica para PF, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), por revisão de prontuários, avaliou 163 pacientes com PF e 103 com PV, atendidos de 1988 a 2008, e mostrou aumento da incidência do grupo PV, ultrapassando a do grupo PF, desde 1998, além da diminuição da idade de manifestação da doença no PV (GONÇALVES et al., 2011). Outro estudo realizado nesta região analisou a incidência de casos do grupo PV de 1976 a 2014 no Hospital das Clínicas da FMRP-USP, e corroborou com os dados epidemiológicos descritos, além de destacar que o PV pode ser considerado endêmico na região nordeste do estado de São Paulo, assim como o PF (CELERE et al., 2017a).

2.3) Etiopatogênese dos pênfigos

A incidência mais elevada das dermatoses bolhosas epidérmicas autoimunes em alguns grupos étnicos, como o PV em judeus *Ashkenazi*, ou em algumas regiões, como o

PF no Brasil, sugerem a participação de fatores genéticos e ambientais na determinação dos pênficos (ABRÉU-VÉLEZ et al., 2010; ALPSOY; AKMAN-KARAKAS; UZUN, 2015).

A associação do fator genético na patogênese dos pênficos tem sido amplamente estudada. Assim como outras doenças autoimunes, os pênficos foram associados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), uma grande região genômica localizada no cromossomo 6, que contém as três classes de genes que codificam as moléculas MHC de classe I, classe II e classe III, classificados de acordo com sua estrutura e função. O MHC humano é denominado Antígeno Leucocitário Humano (*HLA*), e codifica glicoproteínas transmembrana envolvidas na apresentação de antígenos e na resposta imune. Alelos específicos dos *HLAs* de classe I e II apresentam frequências elevadas (presumivelmente alelos de susceptibilidade), enquanto outros alelos apresentam frequências menores (presumivelmente alelos de resistência) nos pacientes, comparados à população saudável (BROCHADO et al., 2016; POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

Nos estudos brasileiros, os alelos *HLA-DRB1* *01:01, 01:02, 01:03, *04:04, 04:06, 04:10, *14:06 e *16:01 foram associados com susceptibilidade ao PF, enquanto alelos *HLA-DQB1* 02:01 foram associados com proteção. No PV, alelos *HLA-DQB1* 04:02, 08:04 e 14 foram associados a susceptibilidade. Poucos estudos mostraram associação dos pênficos com *HLA* de classe I. *HLA-B* *16 foi o único alelo descrito associado a susceptibilidade ao PF em brasileiros (FRANCO BROCHADO et al., 2016).

Estudo do grupo de pesquisa da dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP avaliou perfil de alelos *HLA* de classe I (*A*, *B* e *C*) e classe II (*DRB1* e *DQA1/DQB1*) de 83 pacientes com PF e 86 com PV, comparados com 1592 controles

saudáveis da região nordeste do estado de São Paulo. Nesta população, para pacientes com PF, os alelos de susceptibilidade mais frequentemente encontrados foram *HLA-A* *11, 33, -B *14; -*DRBI* *01:01, 01:02; -*DQA1* * 01:02 e -*DQBI* *05:01; e no PV foram os alelos *HLA-B* *38; -C *12; -*DRBI* *04:02, *08:04, *14:01, 14:04; -*DQA1* *03:01; e -*DQBI* *03:02 e *05:03 (BROCHADO et al., 2016).

Alguns genes não HLA também têm sido associados com PV em algumas populações específicas, como DSG3, que codifica o auto antígeno do pênfigo vulgar Dsg3, associado a população do Reino Unido; TAP2, que codifica uma proteína envolvida na montagem e transporte de peptídeos para antígenos HLA classe 1 e ST18, que codifica um fator de transcrição envolvido na inflamação e apoptose, associados a população judaica; e IL6, que codifica a citocina inflamatória interleucina-6, associada a população egípcia (SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019; VODO; SARIG; SPRECHER, 2018).

Fatores genéticos isolados não são suficientes para causar os pênfigos, e desencadeantes ambientais parecem ter papel na indução e/ou exacerbação da doença (MARTINELLI et al., 2016). Do ponto de vista imunológico, a maioria dos agentes que estimulam o sistema imune podem atuar como gatilhos à autoimunidade, como alterações hormonais, medicamentos, doenças, alimentos, estresse emocional, gestação, entre outros (TAVAKOLPOUR, 2017).

As medicações são os principais desencadeantes descritos nos pênfigos. São classicamente divididos em três grupos principais: drogas -tiol, -fenol, não-tiol e não-fenol. As mais associadas aos pênfigos são do grupo tiol, as quais inibem enzimas que agregam e ativam enzimas que desagregam KCs. Exemplos deste grupo são penicilamina e captopril. As drogas do grupo fenol, por sua vez, podem estimular os KCs a liberar

citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1). Exemplos desta classe de drogas são a aspirina, a rifampicina, a levodopa, e a heroína, que já foi associada ao pênfigo vegetante (BRENNER; GOLDBERG, 2011; DOWNIE; DICOSTANZO; COHEN, 1998; TAVAKOLPOUR, 2017). Algumas vacinas também foram associadas com o desencadeamento ou exacerbação do pênfigo, como anti -influenza, hepatite B, tetânica e rábica. Entretanto, como o tratamento dos pênfigos é baseado na imunossupressão e os pacientes estão mais susceptíveis a infecções, algumas vacinas são indicadas para estes pacientes (TAVAKOLPOUR, 2017).

Alimentos e nutrientes são pouco discutidos nos pênfigos. Os vegetais, como alho, cebola, cebolinha e alho-poró possuem possível papel como gatilhos dietéticos na indução da doença. Foi proposto que ingredientes dietéticos ricos em tióis, isotiocianatos, fenóis e taninos também sejam considerados possíveis gatilhos (RUOCCO; BRENNER; RUOCCO, 2001). Ainda, micronutrientes, como vitamina D, selênio e zinco, foram relatados como deficientes nos pacientes com pênfigo (LA SERRA et al., 2019; TAVAKOLPOUR, 2017).

A associação de doenças autoimunes pode ser explicada pela diminuição na vigilância imunológica devido à atividade primária de uma doença autoimune. Existem relatos de associações de pênfigo com diferentes condições autoimunes (TAVAKOLPOUR, 2017), incluindo lúpus eritematoso sistêmico, penfigoide bolhoso, líquen plano, psoríase, alopecia areata, artrite reumatoide e tireoidite autoimune (KRIDIN et al., 2018; LESHEM et al., 2011).

O estresse emocional também está muito associado à maioria das doenças autoimunes. Matias, A. et al, 2013, entrevistaram 30 pacientes com PF e 30 com PV,

internados para pulsoterapia. Quando questionados sobre perdas, doenças na família ou separação prévios ao pênfigo, 100% dos pacientes relacionaram o desenvolvimento da doença a um evento estressante (MATIAS; FERREIRA ROSELINO, 2013). Além disso, na prática clínica, pacientes relataram piora e recidiva da doença associadas a eventos estressantes.

Em relação aos vírus, podem causar indução ou exacerbação de doenças autoimunes, por alterarem respostas imunes. O risco de indução ou exacerbação do pênfigo associado a infecções pelo vírus herpes simples é discutido na literatura e foi demonstrada sua correlação com o PV, mas não com o PF, na população da região nordeste do estado de São Paulo (MACHADO et al., 2017).

Há descrição sobre a associação entre picada de insetos do gênero *Similium nigrimanum* e o desencadeamento do PF, corroborada pelo *link* epidemiológico entre áreas endêmicas do PF e a presença do inseto. Além disso, proteínas (maxadilán e LJM11) da saliva do flebotômio *Lutzomia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral, já foram associadas à autoimunidade cruzada com a DSG1 no PF. Vernal, S. et al, 2017, associaram a distribuição destes insetos na região nordeste do estado de São Paulo à distribuição dos casos de PF, confirmando *link* epidemiológico nesta região. Demonstraram também, por ELISA, reconhecimento maior do soro de pacientes com PF, em relação ao soro de controles, por proteínas de extrato salivar de *Similium nigrimanum* e *Nyssomia neivai* (vetor da leishmaniose tegumentar, distribuído na região do estudo), sugerindo que pode haver reação cruzada entre DSG1 e proteínas da saliva destes insetos (VERNAL et al., 2017).

2.4) Fisiopatologia e mecanismos da acantólise nos pênfigos

A associação da predisposição genética por alelos *HLA* - de classes I e II - e os fatores ambientais permitem o desencadeamento da produção de autoanticorpos, principalmente da classe IgG, contra as DSGs 1 e 3. As DSGs são proteínas transmembrana, cálcio-dependentes, da grande família das caderinas, presentes nos desmossomos, que são as principais estruturas de adesão celular (Figura 1). São descritas 4 isoformas de DSG - 1, 2, 3 e 4 - e 3 isoformas de DSC - 1, 2 e 3, as quais fazem parte da família das caderinas.

Figura 1. Estrutura desmossomal

Estrutura desmossomal de dois queratinócitos demonstrando a interação das desmogleínas com placoglobinas e desmoplaquinas, ligando-se aos filamentos intermediários de queratina. Fonte: Spindler, V., Waschke, J. Desmosomal Cadherins and Signaling: Lessons from Autoimmune Disease. *Cell Communication & Adhesion*, 21:1, 77-84 (2014). DSG: desmogleína; DSC: desmoculina; PG: Placoglobina; PKP: placofilina; DPK: desmoplaquina

Ainda, as estruturas de adesão desmossomais são formadas pelas placoglobinas (PG), que estão ligadas às DSGs e às desmoplaquinas, as quais se ligam também às placofilinas e aos filamentos intermediários de queratina. (KITAJIMA, 2014). As DSGs

possuem 5 regiões extracelulares, ectodomínios (EC), uma região transmembrana, e domínios citoplasmáticos que permitem sua ligação ao citoesqueleto celular. Há elevado grau de homologia entre suas estruturas gênica e proteica (Figura 2) (CELENTANO; CIRILLO, 2017; FRANK et al., 2001). Além disso, apresentam padrões de expressão específicos nos diferentes tecidos epiteliais e nos diferentes estados de diferenciação da epiderme. DSGs 2 e 3, e DSCs 2 e 3 estão presentes nas células basais e suas expressões vão diminuindo durante a diferenciação dos KCs, enquanto as DSGs 1 e 4, e a DSC1 são expressas nas camadas superiores da epiderme. Nos epitélios da mucosa oral, as DSG3 e DSC3 estão mais presentes, com níveis mínimos de DSG1, e baixos níveis de DSG2 e DSC2 nas células basais (Figura 3) (CIRILLO, 2014; KITAJIMA, 2014).

Figura 2. Representação esquemática das estruturas proteicas das desmogleínas 1, 2 e 3

Schematic Representation of the Different Human Desmogleins (Dsg1–Dsg3) and their Amino Acid (aa) Sequence Relationships in the Specific Molecular Domains

Note. % Identical aa; values in brackets represent homologies including conservative exchanges. For designation of domains see legend to Fig. 3. Identities and homologies of RUD domains correspond to the specific RUD segments.

Representação esquemática das estruturas proteicas transmembrana das desmogleínas 1, 2 e 3 e a porcentagem de homologia entre cada região intracelular e extracelular. Fonte: Schäfer, S., Koch, P. J. & Franke, W. W. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein DSG2, and the Expression Catalogue of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. Exp. Cell Res.211, 391–399 (1994)

Figura 3. Distribuição das proteínas desmosomais nas diferentes camadas celulares da epiderme

A expressão da Dsg1 predomina nas porções superiores da epiderme, enquanto as Dsg2 e 3 estão mais expressas nas camadas inferiores da epiderme. Fonte: Cirillo, N. 150th anniversary series: Desmosomes in physiology and disease, Cell Communication & Adhesion. 21:2, 85-88 (2014). Legenda: Dsg: desmogleína; Dsc: desmocolina; PG: placoglobina; DP: desmoplaquina; Pkp: perplaquina

Estudos com modelos experimentais em ratos, culturas de KCs humanos e biópsias de pele de pacientes com pênfigo sugerem que a ligação dos autoanticorpos nas DSGs podem gerar acantólise por diversos mecanismos sinérgicos (Figura 4). Os autoanticorpos nos pênfigos são principalmente da classe IgG4, a qual não ativa complemento, ativa muito pouco a resposta inflamatória e não interage efetivamente com o antígeno. Assim, a ligação do anticorpo compromete diretamente a função desmossomal. Soros de pacientes com PF e PV contêm anticorpos principalmente contra a porção amino-terminal dos ectodomínios EC1 e EC2, os quais são reconhecidos como os mais importantes domínios na transinteração entre as DSGs nos desmossomos. Anticorpos monoclonais anti-DSG3 patogênicos, clonados de pacientes com PV e modelos animais (ratos), ligam-se diretamente a moléculas que medeiam a transadesão homofílica entre DSGs de células vizinhas. Ainda, experimentos com microscopia de força atômica indicam que autoanticorpos IgG policlonais de pacientes com PV podem inibir diretamente a transinteração homofílica da DSG3 (HEUPEL et al., 2008). Estes dados reforçam o mecanismo de bloqueio mecânico (“steric hindrance”) da adesão entre as DSGs na indução da acantólise nos pênfigos (POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019; SHARMA; MAO; PAYNE, 2007). Estudo recente mostra que a ligação heterofílica entre DSG e DSC é uma unidade adesiva fundamental dos desmossomos. Neste estudo, os anticorpos patogênicos anti-DSG1 e anti-DSG3, que se ligam à interface trans-adesiva, bloquearam a agregação das esferas DSG1 / DSC1 e DSG3 / DSC3, respectivamente, enquanto os anticorpos monoclonais não patogênicos não bloquearam. Todos os soros testados de 8 pacientes com PF e 8 com PV com doença ativa inibiram a adesão das esferas DSG1 / DSC1 e DSG3 / DSC3, respectivamente. Quando os soros pareados obtidos de 7 pacientes com PF e 6 com PV com doença ativa

e em remissão foram comparados, o primeiro inibiu a agregação melhor que o último (ISHII et al., 2020).

Entretanto, o mecanismo de “steric hindrance” não explica por completo a acantólise nos pênfigos. Estudo com cultura de KCs de ratos deficientes em PG não demonstraram retração dos filamentos intermediários de queratina e perda de adesão celular em resposta à IgG do grupo PV. Além disso, há relato com IgG do grupo PF que causou a dissociação de queratinócitos sem bloquear a transinteração homofílica da DSG1. Assim, um segundo mecanismo foi proposto para explicar a acantólise, no qual os autoanticorpos causam agrupamento e/ou internalização das DSGs e consequente depleção nos desmossomos. Esta hipótese atribui a perda da adesão celular à habilidade dos autoanticorpos anti-DSG dos pênfigos em agrupar e redistribuir as DSGs, resultando na internalização e impedindo novas DSGs fabricadas de serem incorporadas aos desmossomos. Por fim, o desmossomo fica depletado de DSG, dificultando a adesão celular (HAMMERS; STANLEY, 2016; KASPERKIEWICZ et al., 2017; SPINDLER et al., 2014). Há descrição na literatura da internalização de antígenos desmossomais na epiderme lesional e perilesional de pacientes com PV, PF e pênfigo vegetante. Este fenômeno não foi visto em outras dermatoses acantolíticas e é demonstrado através da presença de grânulos citoplasmáticos contendo desmogleínas na epiderme dos pacientes com pênfigo através de imunohistoquímica (IWATSUKI et al., 1999; STEEVES et al., 2002). Estudo que analisou a distribuição de IgG e de moléculas de adesão desmossomais em biópsias de pele de 18 pacientes com PV e 10 com PF, através de imunofluorescência, mostrou alteração na distribuição normal intercelular regular das desmogleínas. Na pele de pacientes com PF, a DSG1, mas não a DSG3 mostrou formação de grânulos principalmente nas porções inferiores da epiderme. Na pele íntegra de

pacientes com PV forma mucosa, com anticorpos anti-DSG3 positivos, a DSG3, mas não a DSG1, mostrou o padrão granular condizente com a localização dos depósitos de IgG *in vivo*. Nos pacientes com PV forma mucocutânea, com anticorpos anti-DSG 1 e 3 positivos, houve presença de grânulos de DSG1 e DSG3 (OKTARINA et al., 2011). Foi demonstrado também em outros estudos que as moléculas desmossomais que formam clusters após ligação de IgG sofrem endocitose, e nos pacientes com PF, na pele lesional e perilesional podem se localizar perinucleares (OKTARINA et al., 2019).

Além destes dois mecanismos, numerosas moléculas de sinalização e vias metabólicas têm sido implicadas na acantólise nos pênfigos: p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e seu efetor MAPK- *activated protein kinase 2* (MK2); *Epidermal growth factor receptor* (EGFR); RHO GTPases; c-MYC; fosfolipase C (PLC) e sua forma ativada fosfoquinase C (PKC) e caspases. Entretanto, nenhum evento de sinalização é suficiente para induzir acantólise epidérmica específica do PV ou PF. O p38 representa uma das subfamílias principais das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e foi identificada como possível via de sinalização para a patogênese PV, baseado na detecção de níveis aumentados de MAPKp38 fosforilado após o tratamento de cultura de KCs humanos primários com IgG PV. A inibição farmacológica de MAPKp38 impediu a formação de bolhas *in vivo* em estudos de transferência passiva com modelos de rato para PV e PF. A sinalização do EGFR foi mediada por anticorpos PV adicionados a cultura de KC e se mostrou a jusante do MAPKp38. Além disso, IgG policlonal do grupo PV induz internalização das desmogleínas provavelmente mediado pela ativação de EGFR e MAPKp38 (EGU et al., 2017; KITAJIMA, 2014; SAJDA; SINHA, 2018; SHARMA; MAO; PAYNE, 2007; SPINDLER et al., 2017; SPINDLER; WASCHKE, 2018).

O membro A da família de genes Ras (RhoA) é uma pequena proteína GTPase, considerado um fator regulador de funções como a dinâmica do citoesqueleto, transcrição, progressão do ciclo celular e transformação celular. A contribuição de RhoA para a fisiopatologia do pênfigo é pouco clara. IgG dos pênfigos inibe RhoA de uma maneira dependente de p38MAPK. Estudos demonstraram que a ativação das GTPases da família Rho pode estabilizar os KCs humanos contra os efeitos patogênicos da IgG PV. Corrente importante da literatura sugere que o estado funcional das junções de aderência (estruturas de adesão celular localizadas próximas aos desmossomos) conduz tanto a montagem como a desmontagem de desmossomos. Em conjunto, esses estudos sugerem que a inibição de RhoA desestabiliza as junções de aderência e que os efeitos tardios sobre os desmossomos podem ser um evento secundário. (SAJDA; SINHA, 2018; SHARMA; MAO; PAYNE, 2007; SPINDLER et al., 2017; SPINDLER; WASCHKE, 2018)

O proto-oncogene c-Myc é conhecido por seu papel na proliferação celular como ativador transcricional. Na pele, c-Myc é expresso na camada basal, bulbo e protuberância capilar. Por ensaios de imunoprecipitação e transcrição de cromatina, demonstrou-se que a PG suprime a transcrição de c-Myc. Tratamento de cultura de KCs de rato com IgG do grupo PV levou à diminuição da fração nuclear da PG, o que resultou em aumento da expressão do c-Myc e retenção do fenótipo proliferativo. Curiosamente, o mesmo fenótipo não foi observado em lesões de pacientes com PF, provavelmente refletindo os diferentes padrões de expressão de DSG1 e DSG3 em relação ao c-Myc. Inibição farmacológica do c-Myc impede os anticorpos PV de causar acantólise em ratos. (SAJDA; SINHA, 2018; SHARMA; MAO; PAYNE, 2007; SPINDLER et al., 2014; YULIS; KUSTERS; NUSRAT, 2018)

Papel patogênico da PLC e PKC no pênfigo foi sugerido pela descoberta de que inibidores destas moléculas impediram a formação de bolhas causadas por IgG PV após transferência passiva para ratos neonatais. A PKC regula negativamente a hiperadesão desmosomal, um estado em que os desmosomos tornam-se dependentes de Ca^{2+} . À medida que as membranas se separam nos desmosomos em resposta aos autoanticorpos do pênfigo, as moléculas extradesmosomais são necessárias para manter a adesão celular. Além disso, essas moléculas podem ser relevantes para a sinalização intracelular, pois algumas delas, tais como as GTPases Rho ativas, estão especificamente acopladas à DSG3 extradesmosomal. Os estudos discutidos identificaram a ativação de múltiplos caminhos de sinalização após a ligação de IgG dos pênfigos às células. Esses eventos de sinalização podem ocorrer como uma resposta coordenada à perda de adesão celular após a ligação de anticorpos patogênicos aos antígenos DSG (KITAJIMA, 2014; SAJDA; SINHA, 2018; SHARMA; MAO; PAYNE, 2007; SPINDLER; WASCHKE, 2018; YULIS; KUSTERS; NUSRAT, 2018).

Figura 4. O papel dos autoanticorpos anti-desmogleínas 1 e 3 nos mecanismos de acantólise

Mecanismos de acantólise: os autoanticorpos interferem diretamente na adesão celular por causarem modificação química espacial da DSG; causam agregação e/ou internalização das desmogleínas 1 e/ou 3, resultando em depleção nos desmossomos; promovem ativação das vias de sinalização intracelular, contribuindo para a perda da adesão celular. Fonte: Kasperkiewicz, M. et al. Pemphigus. Nat. Rev. Dis. Prim. 3, 17026 (2017).

2.5) Teoria da compensação das desmogleínas

A diferença na expressão dos antígenos alvos dos pênfegos (DSG1 e 3) determina as diferenças no comprometimento muco-cutâneo em suas variantes clínicas. DSG1 é expressa principalmente nas porções superiores da epiderme, enquanto a DSG3 predomina na porção suprabasal. Na mucosa a DSG3 está em toda a epiderme e a DSG1 tem baixa expressão. Pacientes com PF produzem anticorpos IgG contra DSG1, as lesões são exclusivamente cutâneas, e a acantólise é subcórnea, já que nas camadas inferiores da epiderme a DSG3 compensa a falta da DSG1. Já os pacientes com PV produzem anticorpos contra DSG3, as lesões são mucosas, pois na pele a DSG1 compensa a

depleção da DSG3, e a acantólise é suprabasal, pois a desmogleína 3 é mais expressa nesta região. Há também pacientes com PV que produzem anticorpos anti-DSG1 e 3, gerando a forma clínica muco-cutânea, com acantólise também supra-basal (Figura 5). O motivo pelo qual a acantólise não ocorre em toda a epiderme na forma muco-cutânea do PV não pode ser explicado pela Teoria da Compensação das Desmogleínas (AMAGAI; STANLEY, 2012; CHEN et al., 2015; MAHONEY et al., 1999; SHIRAKATA et al., 1998).

Figura 5. Teoria da Compensação das Desmogleínas

Representação histológica da acantólise na camada subcórnea e na camada suprabasal da epiderme nas formas clínicas do grupo PF e PV, respectivamente. Triângulos em verde representam a DSG1 e, em azul, a DSG3. Fonte: Mahoney, M. G. et al. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. J. Clin. Invest. 103, 461–468(1999)

2.6) Quadro clínico

Pacientes com PF, clinicamente, apresentam exulcerações cutâneas mais superficiais, compatíveis com o nível da acantólise. Nas formas mais brandas, as lesões predominam em áreas seboreicas, como tronco superior, face e couro cabeludo. As bolhas são flácidas e muito raramente podem ser vistas pois rompem-se facilmente. Há também formas mais graves, com lesões generalizadas. Já os pacientes com PV apresentam, em geral, comprometimento mucoso precedendo as lesões cutâneas, com exulcerações mucosas dolorosas de extensão variável, e exulcerações cutâneas mais profundas que no PF, sangrantes, às vezes associadas a bolhas flácidas e retalhos de bolha, podendo acometer toda a epiderme. O sinal de Nikolsky está presente em ambas as formas clínicas e é bastante característico dos pênfigos em atividade. Antes da utilização do tratamento imunossupressor com glicocorticoides, a mortalidade era bastante elevada, e atualmente, apesar da diminuição drástica na mortalidade, a morbi-mortalidade ainda é relevante nos pênfigos, principalmente devido aos efeitos adversos das medicações usadas no tratamento (HAMMERS; STANLEY, 2016; POLLMANN et al., 2018; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

2.7) Teoria multipatogênica dos pênfigos

Contradições na Teoria da Compensação das Desmogleínas foram descritas desde sua descrição para explicar a patogênese dos pênfigos. Relatos na literatura de 5 a 33% de casos do grupo PV com ELISA anti-DSG 1 e anti-DSG 3 negativos, da presença de vários tipos de anticorpos não desmogleínas no soro de pacientes com PV e ativação de diversas vias de sinalização nos KCs expostos a PVIgG sugerem que mecanismos não-DSG estão envolvidos na patogênese do PV (AHMED et al., 2016; GRANDO et al.,

2001; SARDANA; GARG; AGARWAL, 2013).

Diversos estudos demonstraram baixa correlação entre a reatividade anti-DSG e o fenótipo clínico: anticorpos anti-DSG 1 e 3 podem estar ausentes em pacientes com PV em atividade e presentes nos pacientes com PV em remissão, assim como em pacientes saudáveis; Pacientes com PF podem apresentar anticorpos anti-DSG 1 e 3 positivos. Títulos de anti-DSG 3 nem sempre correspondem à presença de anticorpos na superfície celular por imunofluorescência indireta (IFI) (AHMED et al., 2016; BELLONI-FORTINA et al., 2009; SARDANA; GARG; AGARWAL, 2013). Apesar da presença de DSG3, linhagens de ratos com ausência de DSC3 desenvolveram bolhas extensas, indicando que a DSG 3 sozinha não é suficiente para manter a integridade da epiderme (CHEN; DEN; KOCH, 2008). Amagai et al. mostrou que formação de bolhas eram induzidas na pele de ratos através de anticorpos PVIgG depletados de anti-DSG3. Depois, ratos neonatos sem DSG3 desenvolveram bolhas disseminadas apenas após a transferência de PVIgG sem anticorpo anti-DSG 1 (AHMED et al., 2016). Além disso, análise do soro de pacientes com pênfigo e controles saudáveis revelaram reatividade com DSCs 1 e 3, vários subtipos de receptores de acetilcolina muscarínicos e nicotínicos, moléculas *HLA*, proteínas mitocondriais, tireoperoxidase (TPO) e outras moléculas intracelulares (AHMED et al., 2016; AMBER; VALDEBRAN; GRANDO, 2018; DI ZENZO; BORRADORI; MULLER, 2017; FLORES et al., 2012; GRANDO, 2000; SARDANA; GARG; AGARWAL, 2013). Se a teoria monopatógênica fosse verdadeira, e a integridade da pele e da mucosa fossem garantidos integralmente pelas DSGs 1 e 3, os pacientes com PV teriam a desintegração do epitélio em uma suspensão de células isoladas.

A teoria Multipatógênica explica a formação das bolhas nos pênfigos através da

hipótese de “múltiplas vias”, na qual é necessária a inativação simultânea e sincronizada de diferentes mecanismos patofisiológicos que medeiam a adesão celular dos KC para romper a integridade epidérmica. Anticorpos anti moléculas não-DSG tem potencial de amplificar a atividade dos anticorpos anti-DSG. Evidência deste sinergismo pode ser demonstrada, por exemplo, através de estudo com cultura de tecido de pele de rato neonatal, da qual foi feita pré-absorção de PVIgG tanto com proteínas mitocondriais quanto não mitocondriais e houve prevenção de acantólise, sugerindo que ambas são indispensáveis. Além disso, em cultura de tecido de pele de rato neonatal, altas concentrações de anticorpo monoclonal PV anti-DSG induziu acantólise, porém, quando diluído nas concentrações fisiológicas, não. Acantólise foi induzida quando foi adicionado anticorpo anti-mitocondrial à doses mais baixas de anti-DSG (AHMED et al., 2016; CHEN et al., 2015). Mais recentemente foi também sugerida a hipótese da “Supercompensação” para explicar a patogênese do PV, após estudos usando a técnica de microarray de proteínas. De acordo com esta hipótese, a combinação de autoanticorpos patogênicos ou não, atuando sobre um conjunto de antígenos específicos, podem ativar vias de sinalização intracelular e levar à acantólise se a soma dos efeitos destas ligações antígeno-anticorpo atingir um limite (SINHA; SAJDA, 2018).

2.8) Desmogleína 2

Desmogleína 2 é a isoforma mais abundante no organismo e a primeira a se formar durante o desenvolvimento embrionário (SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994). Assim como as demais moléculas da família das caderinas, seu gene está localizado no braço curto do cromossomo 18. Possui peso molecular de 150 quilodaltons (kDa), enquanto a DSG1 possui 160 kDa e a DSG3, 130 kDa. Está presente no miocárdio e uma mutação

em sua molécula leva à Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (AMAGAI; STANLEY, 2012). Também está presente em epitélios simples da mucosa respiratória, na qual pode atuar como receptor para alguns adenovírus sorotipo B (WANG et al., 2011), e intestinal, na qual contribui para a integridade do tecido. Está presente também no endotélio (EBERT et al., 2016), nos linfonodos, nos folículos pilosos e nas porções mais inferiores da epiderme (DENNING et al., 1998; HARTLIEB et al., 2014).

Trabalhos de Eva Hartlieb et al. (2014) pesquisaram a participação da DSG2 na manutenção da integridade da epiderme. Um deles realizou incubação de culturas celulares HaCat (linhagem celular de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados), SCC9 (linhagem celular de carcinoma espinocelular), ambas expressando DSG2 e DSG3, e também Caco-2 (linhagem celular de carcinoma colon-retal), que expressa apenas DSG2, com anticorpos anti DSG2 monoclonal e AK23 (anticorpo monoclonal de modelos de pênfigo ativo em ratos que se liga na DSG3). O anticorpo monoclonal anti-DSG2, em contraste com AK23, não conseguiu reduzir a adesão celular nas linhagens celulares HaCat e SCC9, porém prejudicou facilmente a integridade da cultura celular com expressão apenas da DSG2. Além disso, este estudo mostrou que sob maior estresse mecânico, a DSG2 teve participação na coesão celular (HARTLIEB et al., 2014). O outro estudo utilizou linhagens celulares HaCat, porém com depleção da DSG2, e quando incubado com o anticorpo AK23 contra a DSG3 a perda da integridade da epiderme foi bem maior do que quando a incubação dos anticorpos foi realizada em linhagens celulares com a DSG2, mostrando que a DSG2 pode compensar a perda de função da DSG3 na epiderme (HARTLIEB et al., 2014).

Outro estudo, com modelos de ratos transgênicos expressando DSG2 nas camadas superficiais da epiderme, mostrou que o aumento nos níveis de DSG2 limitaram a

formação de bolhas superficiais induzidas pela injeção de anticorpos anti-DSG1 do PF e toxina esfoliativa A nestes animais, comparados a ratos neonatos com expressão normal das desmogleínas (BRENNAN et al., 2010).

Há inúmeras associações na literatura entre DSG2 e alguns tipos de câncer humanos, porém o papel da DSG2 no desenvolvimento ou proteção destes tumores não é bem conhecido. Por exemplo, é descrito que a expressão da DSG2 está reduzida no câncer gástrico tipo difuso (YASHIRO; NISHIOKA; HIRAKAWA, 2006), câncer de próstata (BARBER et al., 2014) e pancreático (HÜTZ et al., 2017). Em contraste, estudos mostraram aumento da expressão da DSG2 nos carcinomas espinocelulares e basocelulares cutâneos (BRENNAN; MAHONEY, 2009), e também no câncer de pulmão não-pequenas células (CAI et al., 2017).

2.9) *Epitope-spreading*

Epitope-spreading é um fenômeno pelo qual, na vigência de um processo inflamatório, há exposição de antígenos diferentes dos alvos originais, com produção de anticorpos contra estes novos antígenos (OHYAMA et al., 2012). Este fenômeno é essencial para uma resposta imune adaptativa efetiva, ao mesmo tempo em que contribui para a progressão de desordens autoimunes. Existe a forma intramolecular, dentro da mesma molécula, e intermolecular, entre moléculas diferentes (CORNABY et al., 2015; DIDONA; DI ZENZO, 2018). Nos pênfigos, há descrição de *epitope-spreading* intramolecular em estudo realizado com indígenas de Limão Verde, MS, no qual a população foi avaliada antes e após iniciado o PF, quando houve o reconhecimento de epítomos da DSG1 não patogênicos (EC4/EC5) antes do desenvolvimento da doença, e reconhecimento de epítomos patogênicos (EC1/EC2) após a manifestação do PF (LI et al.,

2003). Além disso, exemplo de *epitope-spreading* intermolecular ocorre no PV. A maioria dos pacientes desenvolve inicialmente anticorpos anti-DSG3 e lesões mucosas; depois, com a evolução da doença, há produção também de anticorpos anti-DSG1 e aparecimento de lesões cutâneas (CORNABY et al., 2015). Ohyama B. et al. também estudam o mecanismo de *epitope-spreading* no PV, por imunoprecipitação e imunoblotting, e concluem que é rara a alteração no reconhecimento dos epítomos extracelulares (EC) nos pacientes estudados, em diferentes fases de atividade da doença, mantendo predomínio pelo reconhecimento de EC1 e EC2 (OHYAMA et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Estudar a participação da DSG2 na patogênese dos pênfigos.

3.2) Objetivos específicos

- (i) Relatar a soroprevalência dos anticorpos contra DSG 1, 2 e 3 em amostras de pacientes com PF e com PV, de familiares e de controles, moradores na região nordeste do estado de São Paulo.
- (ii) Verificar a associação dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais com anticorpos séricos contra a DSG2 nos grupos de pacientes com PF e PV.
- (iii) Verificar o reconhecimento do soro dos pacientes com pênfigos pelo peptídeo DSG2 em extrato da epiderme humana.
- (iv) Determinar a concentração do peptídeo DSG2 em amostras do soro dos pacientes com pênfigos comparados aos controles.
- (v) Comparar a expressão proteica das DSG 1, 2 e 3 nas amostras de pele e de mucosa dos pacientes com PF e PV, com ênfase na internalização das DSGs no processo de acantólise.
- (vi) Comparar a expressão gênica das DSG 1, 2 e 3 nas amostras de pele e de mucosa dos pacientes com PF e PV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Aspectos éticos

Este estudo foi 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), protocolo número 56944116.1.0000.5440, em 11 de julho de 2016 (Anexo 10.1). Os participantes incluídos durante o período do estudo aceitaram participar do trabalho após receberem todas as informações necessárias e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 10.2).

4.2) Tipo de estudo epidemiológico

Estudo transversal analítico.

4.3) Caracterização da população estudada

Para a determinação da prevalência dos autoanticorpos contra as DSG 1, 2 e 3 por ELISA, foram utilizadas todas as amostras de soro estocadas no Banco de amostras do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (FMRP-USP). A casuística foi composta por 202 pacientes com PF e 131 com PV, moradores da região nordeste do estado de São Paulo. Os pacientes com PF e PV tiveram os achados clínicos confirmados por exame histopatológico e por imunofluorescência direta (IFD) na biopsia da lesão, mostrando acantólise e depósito de IgG entre os KCs, respectivamente, e/ou por imunofluorescência indireta (IFI) em substrato de pele humana, utilizando-se amostra de soro do paciente. As amostras corresponderam aos pacientes acompanhados no Ambulatório de Dermatoses Autoimunes (ADAI) do HC-FMRP-USP, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2016.

Foram incluídos os seguintes grupos controles: 50 familiares dos pacientes com PF (FPF), 57 familiares de pacientes com PV (FPV) e 114 indivíduos controles sadios da região em estudo. Os familiares e controles eram acompanhantes dos pacientes durante a consulta no ADAI. Determinou-se como critério de inclusão para o grupo de familiares: parentesco de até segundo grau com o caso índice, não apresentarem pênfigo ou doenças autoimunes; e para o grupo controle: serem moradores próximos à residência do caso índice, não possuírem parentesco com o caso índice e não apresentarem pênfigo ou doenças autoimunes.

A distribuição dos dados demográficos e clínicos dos pacientes, familiares e controles pode ser vista na Tabela 3.

Para a análise da especificidade dos anticorpos anti-DSG2, nos testes de adsorção de anticorpos contra DSG2, foram utilizadas amostras de soro de 6 pacientes com PF e 6 pacientes com PV. Esses pacientes foram selecionados por apresentarem maiores títulos de anti-DSG 1, 2 e 3 dentre a casuística estudada (Tabelas 5 e 6).

Para a identificação do peptídeo DSG2 por ELISA sanduíche, foram utilizadas amostras de soro de 25 pacientes com PF e de 17 com PV sem tratamento (virgens de tratamento e sem tratamento há mais de 60 dias) e com lesões ativas. Ainda, 42 controles saudáveis foram selecionados aleatoriamente da casuística. Os dados demográficos e clínicos podem ser vistos na Tabela 7.

Para a identificação de anticorpos anti-DSG2 em substrato epidérmico por immunoblotting (IB), foram utilizadas amostras de soro de 7 pacientes com PF, 7 com PV, 5 FPF, 5 FPV e 4 controles. As amostras foram selecionadas com base nos títulos de anticorpos anti-DSG 1, 2 e 3 obtidos no ELISA, optando-se por valores variados desses anticorpos. Os dados demográficos e clínicos podem ser vistos na Tabela 8.

Para a determinação da expressão gênica e proteica da DSG2 em biópsias congeladas de pele e mucosa por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e imunohistoquímica (IHQ), respectivamente, selecionou-se três pacientes com PF e três com PV, segundo a ordem de atendimento no ADAI, no ano de 2016. Os critérios de inclusão foram: pacientes com a doença em atividade, sem terem iniciado tratamento ou que estavam sem tratamento há mais de 60 dias. Os dados demográficos e clínicos constam na Tabela 9.

4.4) Coleta e preparo das amostras de pele e mucosa

Foram realizadas biópsias de pele e/ou da mucosa com punch de 4mm, tanto de lesão em atividade (denominadas pele lesional e mucosa lesional), quanto de uma região aparentemente saudável (denominadas pele íntegra e mucosa íntegra) próxima à amostra lesional. Ainda, foram utilizadas sobras de pele de cirurgia de *lifting* (região frontal na inserção do couro cabeludo) de 2 pacientes saudáveis como controles, doadas anonimamente, e sem constar a idade, pela equipe de cirurgia plástica.

As amostras biopsiadas foram seccionadas ao meio, identificadas, e um dos fragmentos foi acondicionado em RNAlater® (*Life Technologies*) para posterior extração de RNA para o ensaio de RT-PCR, e o outro, em meio Tissue-Tek (Sakura finetek, USA) para coloração com hematoxilina-eosina e IHQ. As amostras foram armazenadas no freezer a -80°C para posterior uso.

A Figura 6 mostra a distribuição das amostras dos pacientes submetidos à biópsia.

Figura 6: Representação esquemática das amostras de pele e/ou mucosa biopsiadas dos pacientes com PF e PV

Os números correspondem à identificação dos pacientes nas tabelas apresentadas nos resultados

4.5) ELISA para detecção e quantificação dos anticorpos contra as proteínas DSG1 e DSG3

A detecção dos anticorpos IgG anti-DSG 1 e 3 foi realizada com kits comerciais (DSG1 e DSG3, MBL®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 100µL do soro, diluídos a 1:100 no diluente fornecido pelo fabricante, foram adicionados aos poços da microplaca de ELISA sensibilizada com o antígeno DSG1 ou DSG3, e incubada à temperatura ambiente (TA) por 60 minutos (min). Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com Tampão Bicarbonato-Fosfato (PBS) Tween 0,1% e adicionados 100µL do conjugado (*Horseradish Peroxidase goat anti-human IgG*), sendo incubadas novamente à TA, por 60 min, e então lavadas por 4 vezes. Para a revelação, adicionou-se 100µL do substrato Tetrametilbenzidina conjugada com Peróxido de Hidrogênio (TMB/H₂O₂) e incubou-se à TA por 30 min. Finalmente, foram adicionados 100µL da solução stop (H₂SO₄ 1,0M) e realizada a leitura da absorbância/densidade óptica (DO) em espectrofotômetro ASYS Expert Plus, filtro 450 nm, com fundo de referência 620 nm.

Os títulos dos anticorpos anti-DSG1 e anti-DSG3 foram estimados em Unidades de valor/mL (U/mL). O cálculo dos resultados expressos em U/mL foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, seguindo a fórmula abaixo.

$$U/mL = A_{450} <Amostra> - A_{450} <Calibrador Negativo>$$

$$(A_{450} <Calibrador Positivo para Pênfigo - A_{450} <Calibrador Negativo>) \times 100$$

A₄₅₀: abreviação para valor de absorbância a 450 nm

Os resultados obtidos em U/mL foram comparados com o ponto de corte sugerido pelo fabricante. Para os valores de anticorpos anti-DSG1 e anti-DSG3, quando ≥ 20 U/mL foram considerados positivos.

4.6) ELISA *in house* para a quantificação dos anticorpos contra DSG2

Padronização do método ELISA

Inicialmente, fez-se uma curva padrão-resposta para avaliar a viabilidade do método ELISA e definir a concentração do peptídeo DSG2 (Leinco, Fenton, EUA) a ser incubado nas placas (Figura 7). Para a padronização foram utilizados: anticorpo comercial anti-DSG2 (Abcam, Cambridge, EUA) e amostras de soro, em duplicata, de um paciente com PV com resultado positivo e de um controle com resultado negativo contra DSG2 em experimento-piloto.

Para a construção da curva padrão-resposta foram plotados a média dos valores de absorbância das duplicatas das amostras de soro de paciente com positividade para anti-DSG2 e as concentrações crescentes do peptídeo DSG2 (Figura 7). R² é chamado de coeficiente de determinação e é um indicativo da linearidade do método desenvolvido. Quanto mais próximo de 1 o valor de R², mais fidedigno é o ensaio (ANDREASSON et al., 2015; PEREIRA, 2019). Definiu-se a concentração do peptídeo para forrar as placas em 5 ng/μL, a maior testada, por tratar-se de metodologia *in house*, com valores baixos de DO.

Figura 7. Curva padrão-resposta para a determinação da concentração da DSG2 a ser definida para o método ELISA *in house*

A ordenada mostra a média dos títulos de anti-DSG2, em densidade óptica (DO), das amostras de soro em duplicata de um paciente com PV. A abscissa mostra as concentrações crescentes do peptídeo DSG2 (Leinco, Fenton, EUA) usadas para forrar a placa. A linha contínua mostra os valores (DO) de anti-DSG2 para cada concentração do peptídeo DSG2 (ng/μL), e a linha pontilhada representa os valores ideais da absorbância de anti-DSG2 em DO para que a reação seja linear

Ensaio ELISA *in house* com amostras de soro da casuística

Resumidamente, incubou-se, em cada poço, 50 μL da solução contendo 250 ng do peptídeo DSG2 (Leinco, Fenton, EUA) diluídos em solução carbonato-bicarbonato (pH 7,4) (concentração de 5 ng/μL de DSG2), em placas de 96 poços (Corning, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 4°C *overnight*. Após 4 lavagens com PBS/Tween 0,05% e incubação durante 1 hora com solução de bloqueio (PBS / Tween 0,05% / leite em pó 5%), foram adicionados 50 μL das amostras do soro (1:100 diluídas em solução de bloqueio), seguido por incubação por 2 horas em TA. Após 4 lavagens, seguiu-se a incubação de 50 μL do anticorpo conjugado anti-IgG humano (1:5000 diluído em solução de bloqueio) (Abcam, Cambridge, EUA) por 1 hora, à TA. Após 4 lavagens, 50μL de

substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram adicionados por 15 min, à TA, no escuro e, finalmente, a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M. Os valores da DO foram determinados em leitor de placas ELISA (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, Cambourne, Reino Unido) com filtro de absorvância de 405 nm. As amostras foram testadas em duplicata e os mesmos reagentes foram utilizados para evitar a variabilidade do ensaio.

Ainda, para cada ensaio ELISA com as amostras da casuística, foram utilizados os seguintes controles internos, em duplicata: dois poços com anticorpo comercial anti-DSG2 (Abcam, Cambridge, EUA) como controle positivo; dois poços com exclusão do peptídeo DSG2 (para mostrar que não havia ligação inespecífica do soro com a placa) e com um pool amostras positivas com os maiores valores de DO em experimento-piloto (1 µL de soro de 19 pacientes com PF e de 25 pacientes com PV diluídos 1:100 na solução de bloqueio); dois poços com um soro de indivíduo negativo em experimento-piloto, como controle negativo; e dois poços sem amostra (para mostrar que não havia ligação inespecífica do conjugado com a placa ou o peptídeo DSG2).

Determinação do valor de *cut-off* (ponto de corte)

O valor de *cut-off* (em DO) foi determinado por curvas ROC, considerando-se duas situações: A. todos os títulos do grupo controle foram utilizados (Figura 8 A-C). Fixando a especificidade do teste em 95%, os valores de sensibilidade resultaram <20%, e os valores de *cut-off* para os grupos PF, PV e PF+PV resultaram em >0,3370, > 0,3360 e >0,3360, respectivamente. Considerando valores de especificidade ~75% e de sensibilidade de ~60%, resultaram em >0,1425, >0,1425 e > 0,1425, respectivamente. B. Na figura 8 D-F, excluiu-se os valores acima de 0,40 DO - 0,513; 0,542; 0,702 e 0,983,

pela distribuição dos demais valores estar abaixo de 0,40 DO (vide distribuição dos valores de DO dos controles na Figura 9). Considerando-se a especificidade de 95%, e sensibilidade de ~40%, os valores de *cut-off* para os grupos PF, PV e PF+PV resultaram em >0,2110, >0,2105 e >0,2105, respectivamente, e considerando valores de especificidade de e sensibilidade ~65%, resultaram em >0,1365 para todos os grupos.

Considerou-se como resultado positivo de anti-DSG2, para a casuística estudada, aqueles cujos títulos resultaram $\geq 0,1365$ DO, baseado no *cut-off* da curva ROC com exclusão de 4 valores do grupo controle acima de 0,4 DO, e com melhor especificidade e sensibilidade para o grupo PF+PV comparado ao controle.

Figura 8. Curvas ROC com valores de ELISA anti-DSG2 para determinação do valor *cut-off*

A, B e C mostram as curvas ROC com resultados de anti-DSG2 (DO) considerando o grupo controle completo, com grupos PF e PV, PF+PV, respectivamente. D, E e F mostram as curvas ROC com resultados de anti-DSG2 (DO) considerando o grupo controle com exclusão das 4 amostras com DO > 0,4. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV; AUC: área sob a curva.

Figura 9. Distribuição dos valores de anti-DSG2 (DO) no grupo controle

A. A ordenada mostra os valores de absorbância de anti-DSG2 nos ensaios ELISA em DO e a abscissa mostra o grupo controle. **B.** A ordenada mostra os valores de absorbância de anti-DSG2 nos ensaios ELISA em DO e a abscissa mostra o grupo controle, excluindo aqueles com DO acima de 0,400

4.7) Adsorção dos soros com o peptídeo DSG2 para verificar a especificidade dos anticorpos contra DSGs 1, 2 e 3

Para confirmar não haver reação cruzada dos anticorpos anti-DSG 1 e 3 com o peptídeo DSG2, selecionou-se soros de 6 pacientes com PF e 6 pacientes com PV com títulos elevados de anticorpos anti-DSG 1, 2 e 3 (tabelas 5 e 6). Ensaios ELISA foram feitos em placas previamente incubadas com peptídeo DSG2 na concentração 5 ng/ μ L. Amostras dos soros 1:100 foram incubadas nos poços da placa. O sobrenadante foi repassado aos poços seguintes até que os títulos de anticorpos anti-DSG2 caíssem para valores negativos de DO. Após a adsorção seriada, o soro remanescente foi colocado em placa de ELISA comercial anti-DSG 1 e 3 (MBL, Nagoya, Japão) para comparar os valores de anti-Dsg 1 e 3 pré e pós adsorção.

4.8) ELISA sanduíche para a detecção do peptídeo DSG2

A determinação da curva padrão-resposta foi realizada com o kit comercial para detectar o peptídeo DSG2 (human DSG2, Cloud-Clone Corp., Houston, EUA), com

placas de ELISA sensibilizadas com anticorpo anti-DSG2 (imunógeno de proteína DSG2 recombinante), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, a solução Standard contendo o peptídeo recombinante DSG2 foi preparada na concentração de 10 pg/mL, com redução seriada até o valor negativo (apenas diluente) e adicionada em 7 poços de microplaca de ELISA previamente sensibilizada com o anticorpo anti-DSG2. Os valores foram plotados em uma curva padrão-resposta (Figura 10). Nos demais poços foram adicionados 100 µL do soro diluídos 1:10 em PBS. Para a padronização da diluição do soro, curva padrão-resposta com diluições seriadas (1:100 até 1:10) de uma amostra de soro de paciente com PV com anti-DSG2 positivo e uma amostra de controle saudável com anti-DSG2 negativo (resultados obtidos no ELISA anti-DSG2 *in house*) foi realizada, definindo-se a diluição 1:10. As amostras de soro foram incubadas a 37°C por 2 horas. Após a remoção do conteúdo dos poços da placa (sem lavar), adicionou-se 100 µL do Reagente A (*biotin-conjugated antibody specific to DSG2*) incubado por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com *Wash Buffer* e adicionados em cada poço 100 µL do Reagente B (*avidin conjugated to horseradish peroxidase – HRP*), incubados novamente a 37°C por 30 min e, então, as placas lavadas por 5 vezes com *Wash Buffer*. Para a revelação, adicionou-se 90 µL de *Substrate Solution* (TMB/H₂O₂) e incubou-se a 37°C por 20 min. Finalmente, foram adicionados 50 µL da solução stop e realizada a leitura da absorbância/densidade óptica (DO) em espectrofotômetro ASYS Expert Plus, filtro 450nm, com fundo de referência 620nm.

Figura 10. Curva padrão-resposta do teste ELISA sanduíche para determinação de DSG2 em amostras de soro

Placa comercial sensibilizada com anticorpo anti-DSG2. Diluições seriadas da solução standard da proteína recombinante DSG2 seguiram as recomendações do fabricante (DSG2, Cloud-Clone Corp., Houston, EUA). A ordenada mostra os títulos de DSG2 em densidade óptica (DO), e a abscissa, as concentrações da solução standard contendo a DSG2 em ng/mL. A linha contínua mostra os valores de DSG2 (DO) obtidos para cada concentração da solução standard utilizada, e a linha pontilhada representa os valores ideais da absorbância de DSG2 em DO para que a reação seja linear

Determinação do valor de *cut-off* (ponto de corte)

O valor de *cut-off* foi determinado por curvas ROC, considerando-se duas situações:

A. todos os valores do grupo controle foram utilizados (Figura 11 A-C). Fixando a especificidade do teste entre 80 e 85%, os valores de *cut-off* para os grupos PF, PV e PF+PV resultaram em $>0,7750$, $> 0,8050$ e $>0,7750$, respectivamente. B. Excluindo-se os valores 2,87 ng/mL, 5,72 ng/mL e 3,37 ng/mL, pois estavam fora do grupamento dos valores (Figura 11 D-F), e considerando-se especificidade entre 80 e 85%, os valores de *cut-off* para os grupos PF, PV e PF+PV resultaram em $>0,6000$, $>0,5850$ e $>0,5850$, respectivamente.

Considerou-se como resultado positivo de DSG2, para a casuística estudada, aqueles cujas concentrações resultaram $>0,5850$ ng/mL, obtidas da curva ROC para grupo

PF+PV comparadas ao grupo controle, com exclusão das amostras com concentrações mais elevadas, considerando especificidade de 82,05% e sensibilidade de 40,48%.

Figura 11. Curvas ROC para determinação do valor de *cut-off* da concentração do peptídeo DSG2 nos grupos estudados

A, B e C mostram as curvas ROC com concentrações de DSG2 em ng/mL considerando o grupo controle completo, com grupos PF e PV, PF+PV, respectivamente. D, E e F mostram as curvas ROC com concentrações de DSG2 em ng/mL considerando o grupo controle com exclusão das amostras com concentrações de 2,87 ng/mL, 5,72 ng/mL e 3,37 ng/mL. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV; AUC: área sob a curva

4.9) Western blotting para verificar o reconhecimento das DSGs 1, 2 e 3 do extrato

de epiderme humana por amostras de soros de pacientes e controles

Obtenção do extrato proteico de pele humana de prepúcio

Fragmentos de pele de prepúcio foram obtidos pela equipe de urologia de imediato após as cirurgias de postectomia. Resumidamente, fragmentos de 5 cm² de pele de prepúcio foram mantidos em gelo, e lavados com PBS gelado. A seguir, foram incubados em 500 mL de solução estéril PBS, pH 7,2, contendo o anticoagulante ácido

etilenedinitrilotetracético (EDTA) 2 mM (Merck®) e solução de fluoreto sulfonil fenilmetano (PMSF) 1 mM (Sigma-Aldrich®), a 4°C por 24 horas. Após, a solução foi trocada, e a incubação mantida a 4°C por mais 24 horas. Assim, a derme foi separada da epiderme e cada fragmento foi colocado em tubo *eppendorf* 1,5 mL para a extração de proteínas (HASHIMOTO T, OGAWA MM, KONOYANA A, 1990).

Extração de proteínas da epiderme da amostra de prepúcio

A extração proteica da epiderme foi realizada em 5 ocasiões para padronização e realização dos ensaios.

O fragmento da epiderme foi adicionado a um buffer de extração proteica (2 mL do buffer) diluído em 5 mL de água destilada, contendo 0,01% de Solução de Cloridrato de hidroximetil aminometano (Tris-HCL), pH 6,8, com 1,5% de Solução Dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% 2-mercaptoetanol, e posteriormente adicionados EDTA 2 mM, PMSF 2 mM e 100 µL de inibidores da proteinase (Sigma-Aldrich, Cat#P8340). A solução foi homogeneizada por 30 min, seguido de fervura por 5 min, e finalmente centrifugada a 14.000 rotações por minuto (rpm) por 30 min. O sobrenadante foi aliquoteado em 50 µL e conservado a -80°C até o uso (HASHIMOTO T, OGAWA MM, KONOYANA A, 1990).

Quantificação da proteína total dos extratos de epiderme de prepúcio

O extrato proteico de epiderme foi quantificado em espectrofotômetro (Nanovue®), observando-se a média de quantificação de 26,21 µg/µL.

Eletroforese vertical

Utilizou-se diluição 1:2 (em média 8 µg/µL) do extrato proteico em tampão de redução da amostra (Tris HCl 0,125mM pH 6,8; SDS 3,125%, glicerol 12,5%, 0,00125% de azul de bromofenol e 5% β-Mercaptoetanol). Realizada padronização inicial baseada na concentração do extrato proteico, e definida a diluição do extrato proteico em 5 µg/µL.

Alguns ensaios não resultaram detecção das proteínas nos géis de acrilamida, assim, optou-se por aumentar a concentração do extrato proteico para 8 µg/µL.

Resumidamente, a amostra foi aquecida a 99°C por 5 min (Thermomixer comfort, *Eppendorf*®, Cat#5355900-012) e aplicados 20 µL por poço no gel de poliacrilamida (gel 4-15%, 10-wells, Cat#456-1085). Paralelamente, foram aplicados 6 µL da solução de peso molecular (PM) (Precision Plus Protein, Dual-Color®, Bio-Rad, Cat#1610374) no poço anterior e subsequente às amostras. As amostras foram submetidas à eletroforese vertical (Mini Protean® II, Electrophoresis Cell, Bio-Rad Cat#165-8000) em tampão de corrida SDS-PAGE, por 2 horas e 30 min, a 120V. Nesse intervalo, o buffer para IB (25mMTris, 192mM glicine, 20% metanol, pH 8) e a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad®, Trans-blot tranfer medium Cat#1620114 – 15x9,32cm) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Finalizada a corrida eletroforética, corou-se o gel de poliacrilamida com nitrato de prata 2% (Figura 12).

Figura 12. Gel de poliacrilamida corado pela prata após corrida eletroforética de extrato proteico de epiderme humana

O extrato de proteínas da epiderme humana foi adicionado nos poços 2 a 6 do gel de poliacrilamida em concentrações decrescentes (1:2 até 1:32). No poço 1 foi colocado o marcador de Peso Molecular (Dual-Color BioRad®, cat#161-0374). Observar peptídeos da epiderme humana com PM variando de <50 kDa a 250 kDa

Após a padronização da concentração do extrato proteico da epiderme, amostras de soro da casuística foram testadas e, como controles positivos do ensaio, utilizaram-se anticorpos comerciais anti-DSG1 (ab124798 Abcam MA, USA) e anti-DSG2 (ab150372 Abcam MA, USA), e amostra de soro de paciente com PV com título de anti-DSG3 185,88. Não se obteve resultado com o anticorpo comercial anti-DSG3 (ab14416, Abcam MA, USA). Assim, utilizou-se uma amostra de soro de paciente com PV como controle.

Immunoblotting (IB)

Finalizada a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi montado em “sandwich” com a membrana de nitrocelulose 0,20 µm (Cat#162-0115 *BioRad*®) para a transferência das proteínas (Mini Trans-Blot®, Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Cat#170-3930), a 0,36 mA, por 1 hora e 15 min. Realizada coloração de *Ponceau S Stain* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para confirmar a qualidade da transferência (Figura 13).

Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio - Solução Salina Tris-tamponada (TBS) (Cat#170-6404, *BioRad*®) - contendo 3% de leite desnatado, em TA, sob agitação, por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada 4 vezes por 5 min com TTBS (Tris Buffer saline contendo 0,05% Tween 20), acrescido à lavagem final por 5 min com TBS. Amostras de soro e amostras comerciais foram diluídas em TBS (1:100 e 1:1000 respectivamente) acrescidos 3% de leite desnatado, e incubadas sobre as tiras de nitrocelulose contendo a proteína transferida, com agitação leve, *overnight*, a 4°C. Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas, como descrito previamente, e adicionou-se o anticorpo secundário HRP (H+L) anti-IgG humana produzido em cabra (cat#172-1050, *BioRad*®) diluído em TBS 1:1000, acrescidos 3% de leite desnatado, em agitação leve, à TA, por 1 hora. Seguiu-se a última série de lavagens, e finalmente adicionou-se o reagente de revelação Luminol ECL Prime (GE Amersham) e fez-se a leitura no aparelho ChemiDoc XR, *BioRad*®.

Figura 13. Coloração da membrana de nitrocelulose por *Ponceau S Stain* com os extratos proteicos de epiderme humana

A primeira coluna mostra o marcador de Peso Molecular (PM) (Dual-Color BioRad®, cat#161-0374) e, as demais, o extrato proteico de epiderme na concentração de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ transferido do gel de poli(acrilamida) para a membrana de nitrocelulose.

4.10) Coloração de hematoxilina-eosina

Resumidamente, cortes de 5 μm do material congelado foram obtidos em criostato (Microm HM525, UK) e transferidos para lâminas de vidro específicas para material congelado Star frost / knittel glass (waldemar knittel, Alemanha). Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris (Merck Millipore, MA, USA) por 2 min, enxaguados em água destilada e mergulhados em álcool 80%, depois coradas com Eosina (Merck Millipore, MA, USA) por 30 seg. Os cortes foram desidratados em banhos crescentes de etanol e, por fim, diafanizados em banhos de xilol. A lâmina foi fixada com meio de montagem Entellan (Merck®, Darmstadt, Alemanha) para posterior observação em microscópio óptico (Imager-A1, Zeiss, Alemanha). Todas as amostras biopsiadas foram revistas quanto à integridade do tecido e as amostras de pele e mucosa lesional foram revistas quanto à presença de acantólise.

4.11) Imuno-histoquímica (IHQ) para detecção da expressão proteica das DSGs 1, 2 e 3 nas biópsias de pele e mucosa

Para a reação de IHQ, utilizou-se o sistema de detecção HRP-Polymer MACH 1 (Biocare Medical, Concord, CA, USA), conforme recomendações do fabricante. Os cortes congelados foram fixados em acetona (Merck) a 4°C por 10 min e lavados em PBS pH 7,4; e a inibição da peroxidase endógena foi feita com incubação de H₂O₂ 0,3% (Labsynth, SPBrasil) por 10 min. A seguir, os cortes foram incubados com solução de bloqueio Sniper por 10 min à TA e, em seguida, com anticorpo monoclonal produzido em coelho anti-DSG1 5 µg/mL (ab124798 Abcam MA, USA), e anticorpos monoclonais produzidos em camundongo anti-DSG2 e anti-DSG3 5 µg/mL (ab150372 e ab14416, Abcam MA, USA) por 2 horas em câmara úmida. Após, os cortes foram lavados em PBS, 2 vezes por 3 min cada. A seguir, adicionou-se o Probe por 15 min. Os cortes foram novamente lavados em PBS e, a seguir, incubados com o polímero HRP por 30 min. Após as lavagens, a reação foi finalizada com a adição do substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 2 min, preparado conforme instruções do fabricante (Biocare Medical, Concord, CA, USA). A seguir, os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris (Merck Millipore, MA, USA) por 40 seg e lavados em água corrente. Para a montagem das lâminas, os cortes foram desidratados em banhos crescentes de etanol e, por fim, diafanizados em banhos de xilol. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck, Alemanha), cobrindo-se os cortes com lamínula para posterior observação em microscópio óptico (Imager-A1, Zeiss, Alemanha).

4.12) RT-PCR para detecção da expressão gênica das DSGs 1, 2 e 3 nas biopsias de pele e mucosa

Extração do RNA

No momento da coleta da amostra, o fragmento foi acondicionado em microtubo com 500 µL (ou volume suficiente para envolver toda a amostra) de RNAlater® (*Life Technologies*), e acondicionado em freezer -80°C, com a finalidade de ser preservado (livre de RNase) para posterior processamento.

A extração do RNA seguiu as recomendações do fabricante (TRIzol™ Reagent, Invitrogen, Cat#15596026). Para o processamento da amostra e extração de RNA, todo material utilizado foi lavado com água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, cat.: D5758) ativa, seguida por água DEPC inativa (inativação realizada por autolavagem). A mesma haste foi usada para homogeneização de todo o material, sendo que, a cada fragmento macerado, a probe foi limpa com álcool 70%, seguida de água DEPC ativa e, por último, água DEPC inativa. Após homogeneização dos fragmentos com homogeneizador de tecidos (Omni TH®), em velocidade máxima com 1 mL de TRIzol, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e centrifugados a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 min. Após, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e adicionado isopropanol 0,5 mL, e mantidas a -80°C por 24 horas. As amostras foram deixadas em TA por 10 min para recomençar o processo, e depois centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 min. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e mantido o pellet, adicionado 1 mL de etanol 75% por amostra e centrifugado novamente a 7.500 rpm, a 4°C, por 5 min. A seguir, o etanol foi retirado e o pellet, após seco em TA por 15 min, foi ressuspendido com 40 µL de água destilada.

Quantificação do RNA

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Promega M6101) e quantificadas (antes e depois do tratamento com DNase) em NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences) com o volume de 2 μ L, observando-se a quantificação em ng/ μ L e o valor da razão 260/280 nm (Tabela 1). A quantificação das amostras PV3 foram as menores, embora tivessem a mesma quantidade de tecido que as demais biopsias. Após teste com diluições seriadas do RNA tratado com DNase e, levando em consideração as amostras com menores concentrações de RNA total apresentadas na Tabela 1, optou-se por diluir todas as amostras de RNA tratadas com DNase a 10 ng/ μ L e usar 40 ng para a síntese de cDNA.

Tabela 1. Quantificação das amostras de RNA extraído de biopsias de pele e da mucosa de pacientes com PF e PV, antes e após o tratamento com DNase

Amostras	RNA	RNA + DNase
PF1 Pele íntegra	106,8 ng/ μ L	66,4 ng/ μ L
PF2 Pele íntegra	139,0 ng/ μ L	96,0 ng/ μ L
PF2 Pele lesional	236,4 ng/ μ L	160,0 ng/ μ L
PF2 Mucosa íntegra	633,2 ng/ μ L	426,0 ng/ μ L
PF3 Pele íntegra	162,6 ng/ μ L	103,6 ng/ μ L
PF3 Pele lesional	447,6 ng/ μ L	302,0 ng/ μ L
PV2 Mucosa lesional	136,8 ng/ μ L	68,0 ng/ μ L
PV3 Pele íntegra	10,7 ng/ μ L	7,4 ng/ μ L
PV3 Pele lesional	12,0 ng/ μ L	9,6 ng/ μ L
PV3 Mucosa lesional	15,2 ng/ μ L	10,4 ng/ μ L
PV4 Mucosa lesional	243,6 ng/ μ L	164,4 ng/ μ L
<i>Lifting</i> 1	120,0 ng/ μ L	75,2 ng/ μ L
<i>Lifting</i> 2	710,1 ng/ μ L	172 ng/ μ L

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar. Os números das amostras representam a identificação dos pacientes nas tabelas dos resultados

Confirmação da integridade do RNA extraído

A integridade do RNA foi confirmada em gel de agarose 1,5%, detectando-se as duas bandas do RNA ribossomal (28S/18S) (Figura 14). As amostras de RNA foram acondicionadas em freezer -80°C para posterior processamento.

Figura 14. Gel de agarose para avaliar a integridade do RNA

Gel de agarose 1,5% mostrando a integridade do RNA extraído das biopsias dos pacientes com pênis-fígado, com exceção da amostra PV3-PI. PI: pele íntegra; PL: pele lesional; MI: mucosa íntegra; ML: mucosa lesional. Os números correspondem à identificação dos pacientes; Br: branco (sem RNA)

Síntese do cDNA a partir do RNA tratado com DNase

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit Promega Go Script™ Reverse Transcriptase (Cat #A5001), conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, em tubo de 0,2 µL, acrescentou-se Oligo dT 500M (1 µL) à amostra de RNA (4 µL). A seguir, o tubo foi acondicionado em termociclador a 70°C por 5 min, seguido por transferência ao gelo para choque térmico por 1 min. A seguir, foram adicionados Buffer 5X (4 uL), MgCl₂ (2,4 uL), nucleotídeos MIX (1 uL), RNasin (0,5 uL) RT (1uL) e água RNase free (6,1 uL). Após homogeneização em vórtex por 5 min, usou-se o seguinte ciclo no termociclador - 25°C por 5 min, 42°C por 1 hora, seguido de 70°C por 15 min. Após, as amostras foram armazenadas a -80°C até o uso.

Padronização dos ensaios de RT-PCR

As sequências dos primers para a detecção das DSG 1, 2 e 3, e dos genes endógenos (para controle da extração) estão apresentadas na Tabela 2. A concentração dos primers de 10µM foi escolhida após testar diferentes diluições.

Tabela 2. Primers *forward* (F) e *reverse* (R) e ciclos para a determinação de sequências das DSG 1, 2 e 3, e dos genes endógenos ribossomal (18S) e GAPDH humanos

Gene alvo	Amplicon	Identificação	Sequência	Ciclo	Referência
DSG1	411pb	F	5' TCAAGTTCGCAGCAGCCTGT3'	95°C 2 min, 45 ciclos de 94°C 1 min, 57°C 2 min e 72°C 2 min	(IWATSUKI et al., 1999)
		R	5' TGTTCGGTTCATCTGCGTCA 3'		
DSG2	793pb	F	5' CAGTAGCTTCCCAGTTCC3'	95°C 2 min, 45 ciclos de 94°C 1 min, 57°C 2 min e 72°C 2 min	(IWATSUKI et al., 1999)
		R	5'CTGTAAGCTTCATGAAAAATCAG 3'		
DSG3	107pb	F	5' TGATCTGTCCCATTTCAGTGT3'	95°C 2 min, 45 ciclos de 95°C 15 seg e 60°C 60 seg	(SAVCI-HEIJINK et al., 2009)
		R	5' TCATATTAGACGGGAGCAAGGA3'		
18S	151pb	F	5' GTAACCCGTTGAACCCCAT 3'	95°C 2 min, 45 ciclos de 95°C 15 seg e 60°C 60 seg	RHO et al., 2010; VANDESOMPELE et al., 2002)
		R	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'		
GAPDH	87pb	F	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'	95°C 2 min, 45 ciclos de 95°C 15 seg e 60°C 60 seg	RHO et al., 2010; VANDESOMPELE et al., 2002)
		R	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'		

As reações foram preparadas como segue: preparo do MIX, com volume final de 22,5 µL/amostra, contendo 12,5 µL de Master Mix Sybr Green (Promega Cat #A6001), 0,5 µL de cada *primer* F e R [10 µM], 2,5 µL do cDNA de cada amostra diluído 1:4 em água destilada e 6,5 µL de água. Os ciclos utilizados no termociclador Rotor Gene-Q® podem ser vistos na Tabela 2. As amostras foram testadas 2 vezes em duplicata. O par de primers para o gene endógeno 18S foi utilizado para controle da reação, e foi escolhido após a comparação com GAPDH, por apresentar amplificação mais homogênea entre as amostras (Figura 15).

Figura 15. Teste para a definição do gene endógeno utilizado na normalização das reações de RT-PCR

Curvas obtidas na RT-PCR com todas as amostras da casuística em duplicata. À esquerda estão as curvas de amplificação e de melting com os primers 18S, à direita, com os primers do gene GAPDH

A análise dos resultados da casuística foi feita usando o *Threshold cycle* (cT) de cada amostra, após estabelecer o *Threshold* das reações. O método de Livak e Schmittgen (2001) preconiza a fórmula $2^{\Delta cT}$, que foi usada para calcular a expressão gênica relativa da amostra testada em relação ao gene endógeno. Inicialmente o ΔCT foi calculado subtraindo o valor de CT do gene alvo (DSG 1, 2 e 3) do valor de CT do gene referência

(18S), e o valor de ΔCT obtido foi aplicado na fórmula $2^{\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O resultado obtido representa quantas vezes mais o gene alvo está expresso em relação ao gene endógeno (18S).

Para verificar a especificidade dos primers, foi realizado sequenciamento do amplicon obtido na PCR com uma amostra de pele controle com os primers *forward* e *reverse* das DSGs 1, 2 e 3, e as sequências foram analisadas pela ferramenta Blast do site www.ncbi.nlm.nih.gov. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 16).

Figura 16. Blast das sequências obtidas na RT-PCR com cDNA de pele normal e primers específicos para DSG 1, 2 e 3 para confirmar a especificidade

desmoglein type 1 [Homo sapiens]

Sequence ID: [CAA39976.1](#) Length: 1049 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 52 to 175 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
226 bits(575)	4e-66	Compositional matrix adjust.	122/124(98%)	122/124(98%)	0/124(0%)	-2

Query 385 FFPPAACREGEDNSKRSPIAKIESDCAANQGVTYRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINI 206
RP AACREGEDNSKRSPIAKIESDCAANQGVTYRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINI
Sbjct 52 IXFAAACREGEDNSKRSPIAKIESDCAANQGVTYRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINI 111

Query 305 TSIVGREVTFFFIIYCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENH 26
TSIVGREVTFFFIIYCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENH
Sbjct 112 TSIVGREVTFFFIIYCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENH 171

Query 25 ASTL 14
Sbjct 172 ASTL 175

desmoglein 2 [Homo sapiens]

Sequence ID: [CAAB1226.1](#) Length: 1117 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 937 to 1117 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
354 bits(908)	4e-111	Compositional matrix adjust.	175/181(97%)	178/181(98%)	0/181(0%)	+3

Query 126 TSYVVGSTHPPFTVILGPGSQSHIVDRVAFSTLVQGFANSGTVVTERVIGPBG 305
T TSYVVGSTHPPFTVILGPGSQSHIVDRVAFSTLVQGFANSGTVVTERVIGPBG
Sbjct 937 TSYVVGSTHPPFTVILGPGSQSHIVDRVAFSTLVQGFANSGTVVTERVIGPBG 996

Query 326 GSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAPSGVQPLAMPHAVGVVTVTERVLAFASTL 485
GSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAPSGVQPLAMPHAVGVVTVTERVLAFASTL
Sbjct 997 GSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAPSGVQPLAMPHAVGVVTVTERVLAFASTL 1036

Query 486 QSSFDIPENSHANTTVSGAGVPGPLDFGLEESGHSNSTITTSSTWTHSTVQRE 665
QSSFDIPENSHANTTVSGAGVPGPLDFGLEESGHSNSTITTSSTWTHSTVQRE
Sbjct 1057 QSSFDIPENSHANTTVSGAGVPGPLDFGLEESGHSNSTITTSSTWTHSTVQRE 1116

Query 666 S 668
S
Sbjct 1117 S 1117

pemphigus vulgaris antigen [Homo sapiens]

Sequence ID: [AAA60230.1](#) Length: 999 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#)

desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen), isoform CRA_a [Homo sapiens]

Sequence ID: [EAX01258.1](#)

desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen), isoform CRA_a [Homo sapiens]

Sequence ID: [EAX01259.1](#)

Range 1: 979 to 999 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
51.2 bits(121)	2e-06	Composition-based stats.	21/21(100%)	21/21(100%)	0/21(0%)	+3

Query 12 PTCGRGSHLACTDPCSLI 74
PTCGRGSHLACTDPCSLI
Sbjct 979 PTCGRGSHLACTDPCSLI 999

desmoglein type 1 [Homo sapiens]

Sequence ID: [CAA39976.1](#) Length: 1049 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 66 to 185 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
214 bits(544)	5e-62	Compositional matrix adjust.	117/120(98%)	119/120(99%)	0/120(0%)	+1

Query 13 KEDPIAKIHS DCAANQGVTRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINITSIVGREVTFFFII 192
K +PIAKIHS DCAANQGVTRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINITSIVGREVTFFFII
Sbjct 66 KRNPIAKIHS DCAANQGVTRISGVGIDQPPYGIIPVINGKTGEINITSIVGREVTFFFII 125

Query 193 YCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENSNTLWMLNATDAE 372
YCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENSNTLWMLNATDAE
Sbjct 126 YCRALNSMGQDLERPLELRVRVDINDNPPVFSMATFAGQIEENSNTLWMLNATDAD 185

desmoglein 2 [Homo sapiens]

Sequence ID: [CAAB1226.1](#) Length: 1117 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 905 to 1094 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
331 bits(848)	2e-102	Compositional matrix adjust.	180/190(95%)	183/190(96%)	0/190(0%)	-1

Query 702 IVTERSVSRQAGKVATPLDPHASNVIATETSYTGSTHPPFTVILGPGSQSHIVTE 523
IVTERSVSRQAGKVATPLDPHASNVIATETSYTGSTHPPFTVILGPGSQSHIVTE
Sbjct 905 IVTERSVSRQAGKVATPLDPHASNVIATETSYTGSTHPPFTVILGPGSQSHIVTE 964

Query 522 SVYAFASLTVQGFANSGTVVTERVIGPBGGSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAP 343
SVYAFASLTVQGFANSGTVVTERVIGPBGGSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAP
Sbjct 965 SVYAFASLTVQGFANSGTVVTERVIGPBGGSNPLEGTHLQGVPTVYRERESFLAP 1024

Query 342 SSGVCHTIAIKTAVGVTVTERVLAFASTHGSSTQIPKNSHTANPTVSGGVVPS+ 163
SSGOV TLA+ NIAVGGVTVTERVLAFAST+GSSSTQIP ENSHTAN TVSG GVVGP
Sbjct 1025 SSGVCHTIAIKTAVGVTVTERVLAFASTHGSSTQIPKNSHTANPTVSGGVVPS+ 1084

Query 162 PFGLEESGY 133
PFGLEESG+
Sbjct 1085 PFGLEESGH 1094

pemphigus vulgaris antigen [Homo sapiens]

Sequence ID: [AAA60230.1](#) Length: 999 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#)

desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen), isoform CRA_a [Homo sapiens]

Sequence ID: [EAX01258.1](#)

desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen), isoform CRA_a [Homo sapiens]

Sequence ID: [EAX01259.1](#)

Range 1: 965 to 989 GenPept Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
50.1 bits(118)	Se-06	Composition-based stats.	22/25(88%)	23/25(92%)	0/25(0%)	-2

Query 82 LSCPTSSVPGSLAGPTQLRSHTFF 8
+LSCPTSSVPGSLAGPTQLRSHT
Sbjct 965 VICPTSSVPGSLAGPTQLRSHTML 989

À esquerda, os resultados do gene correspondente às sequências obtidas no sequenciamento com primer *foward* e, à direita, com primer reverse das DSG 1, 2 e 3 (www.ncbi.nlm.nih.gov). O Blast confirmou a especificidade dos primers para as respectivas sequências das desmogleínas. Para a DSG1, as sequências obtidas com os primers *foward* e *reverse* mostraram 98% de homologia. Para a DSG2, a sequência com o primer *foward* teve 97% e *reverse* 95% de homologia. Para a DSG3, a sequência obtida com o primer *foward* teve 100% e *reverse* 88% de homologia.

4.13) Estudo estatístico

Os dados foram avaliados quanto à distribuição de normalidade Gaussiana por teste D'Agostino-Pearson. Os dados demográficos e clínicos dos pacientes e dos controles foram comparados por testes de Qui-quadrado (χ^2) e pelo teste exato de Fisher para os dados escassos. Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn foram empregados para comparar os valores de anticorpos contra as DSG 1, 2 e 3 por ELISA entre os grupos, e a expressão gênica das DSGs nas amostras de biopsias. O teste de Spearman foi usado para correlacionar os níveis de anticorpos anti-DSGs, bem como com a duração da doença e a idade dos pacientes. Teste de Friedman foi realizado para comparar os títulos de anti-DSG2 antes e depois da adsorção do soro com o peptídeo DSG2. Teste de Wilcoxon foi usado para comparar títulos de anti-DSG 1 e 3 antes e depois da adsorção com anti-DSG2. A significância foi ajustada em $\alpha = 5\%$. O software GraphPad Prism 8.4.1 foi utilizado para as análises estatísticas e confecção dos gráficos (GraphPad software Inc., La Jolla, EUA).

Realizou-se análise de variância (ANOVA) multifatorial, seguida de pós-teste de Bonferroni, para a comparação dos títulos de anti-DSG2 entre os grupos de estudo e com os dados demográficos, e para a comparação dos títulos de anti-DSG2 nos diferentes grupos de tratamento para os pacientes com PF e PV. Realizou-se análise de regressão logística multifatorial para comparar a soroprevalência de anti-DSG2 entre os grupos de estudo com os dados demográficos e para a comparação da soroprevalência de anti-DSG2 nos diferentes grupos de tratamento para os pacientes com PF e PV. As análises multifatoriais foram realizadas com SPSS Statistics 17.0 (IBM SPSS® software, EUA).

5. RESULTADOS

5.1) Análise dos dados demográficos e clínicos da casuística estudada

A casuística foi composta por 202 pacientes com PF, 131 com PV, 50 FPF, 57 FPV e 114 controles (Tabela 3). Em relação à idade, foi menor no grupo PF comparada à dos grupos PV e controle ($p=0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente), e no grupo PV comparada ao grupo controle ($p=0,0068$). Já o grupo PV apresentou maior idade comparada ao grupo FPF ($p=0,0001$). A maioria era do gênero feminino (59,66%), predominando nos grupos PV, FPF e FPV (feminino:masculino 2,1:1, 2,57:1 e 2,3:1, respectivamente), quando comparados com PF e controle (feminino:masculino 1:1, 0,93:1, respectivamente). Considerando a duração da doença, houve diferença estatística da frequência de pacientes nos grupos PF e PV nos intervalos: 1 ano a 5 anos no grupo PV, e 6 anos a 10 anos e >15 anos, no grupo PF.

Em relação ao tratamento e atividade da doença, os pacientes foram alocados em cinco grupos – (i) em remissão (sem tratamento há mais de 60 dias e sem lesões cutâneas); (ii) em tratamento com lesões ativas; (iii) em tratamento sem lesões ativas; (iv) sem tratamento por mais de 60 dias com lesões ativas; e (v) virgens de tratamento (Tabela 3).

Em relação ao tratamento, na data da coleta do soro, 51,6% do grupo PF e 70,0% do PV estavam em tratamento - 8,6% sem lesões e 43% com lesões ativas no PF, e 18,8% sem lesões e 51,2% com lesões ativas no PV; 18,3% do grupo PF e 8,7% do grupo PV estavam sem tratamento com lesões ativas; 23,1% do grupo PF e 15,8% do grupo PV estavam virgens de tratamento; e 7% do grupo PF e 5,6% do grupo PV estavam em remissão (Tabela 3).

Quanto à forma clínica, na data da coleta do soro, para os pacientes com lesões ativas, virgens de tratamento e sem tratamento há mais de 60 dias, 34 (50,0%) com PF tinham a forma localizada e 34 (50,0%), a generalizada; 8 (28,6%) pacientes com PV tinham a forma mucosa exclusiva, 2 (7,1%) a cutânea exclusiva e 18 (64,3%), a generalizada (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos PF, PV, FPF, FPV e controles

	PF n = 202	PV n = 131	FPF n = 50	FPV n = 57	Controles n = 114	p
Mediana da idade em anos (25/75)	35 (21/54) ^a	48 (35/62) ^b	40 (29/49) ^c	30 (19/45) ^d	60 (46/71) ^e	^{a,b} 0,0001 ^{a,c} >0,9999 ^{a,e} <0,0001 ^{b,d} 0,0001 ^{b,e} 0,0068
Gênero	n (%) 202	n (%) 131	n (%) 43	n (%) 48	n (%) 114	
Feminino	102 (50,2) ^a	88 (67,7) ^b	36 (72,0) ^c	40 (70,2) ^d	55 (48,2) ^e	^{a,b} 0,0033 ^{b,e} 0,0027 ^{a,e} 0,8150
Masculino	101 (49,8)	42 (32,3)	14 (28,0)	17 (29,8)	59 (51,7)	^{c,d} 1,0000 ^{c,e} 0,0022 ^{d,e} 0,0088
Duração da doença (anos)	n = 199	n = 130				
< 1	45 (22,6)	31 (23,8)	-	-	-	0,8967
1-5	87 (43,7)	86 (66,2)	-	-	-	0,0296
6 -10	32 (16,1)	9 (6,9)	-	-	-	0,0390
11-15	11 (5,5)	3 (2,3)	-	-	-	0,2630
> 15	24 (12,1)	1 (0,8)	-	-	-	0,0001
Tratamento na coleta do soro	n = 186	n = 127				
Virgens de tratamento	43 (23,1) ^a	20 (15,8) ^b				

Sem tratamento com lesões ativas	34 (18,3) ^a	11 (8,7) ^b	-	-	-	
Em tratamento sem lesões ativas	16 (8,6) ^a	24 (18,8) ^b	-	-	-	^a < 0,0001
Em tratamento com lesões ativas	80 (43,0) ^a	65 (51,2) ^b	-	-	-	^b < 0,0001
Em remissão	13 (7,0) ^a	7 (5,5) ^b	-	-	-	
Forma clínica na coleta do soro (pacientes sem tratamento e virgens de tratamento)						
	n = 68	n = 28				
Mucosa exclusiva	-	8 (28,6) ^b	-	-	-	
Cutânea exclusiva *	-	2 (7,1) ^b	-	-	-	^a =0,9636
Muco-cutânea	-	18 (64,3) ^b	-	-	-	^b <0,1077
Localizada	34 (50,0) ^a	-	-	-	-	
Generalizada	34 (50,0) ^a	-	-	-	-	

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar; * um paciente sem tratamento há mais de 60 dias com lesões ativas e um paciente virgem de tratamento

5.2) Titulação dos anticorpos IgG anti-DSG 1, 2 e 3

Em relação aos resultados quantitativos dos autoanticorpos IgG anti-DSG2, os grupos PF e PV apresentaram títulos mais elevados em comparação aos controles (ambos $p<0,0001$). O grupo PF também apresentou títulos mais elevados em relação ao grupo FPF ($p=0,0046$), o grupo FPV apresentou títulos maiores que FPF e controles ($p=0,0004$ e $p<0,0001$, respectivamente). Não foi observada diferença significativa entre os grupos PF e PV ($p>0,9999$), e PV e FPV ($p>0,9999$) (Figura 17).

Figura 17. Títulos de anticorpos IgG contra DSG2 por ELISA *in house* nos grupos em estudo

Pacientes com PF e PV mostraram títulos de anti-DSG2 semelhantes, porém, maiores que os controles (ambos $p<0,0001$). Grupo PF apresentou maiores títulos em relação ao FPF ($p<0,0046$). Grupo FPV apresentou maiores títulos que o grupo FPF ($p=0,0004$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV

Em relação aos anticorpos anti-DSG1, o grupo PF apresentou níveis mais elevados comparados aos dos grupos PV, FPF, FPV e controle ($p<0,0001$ para todos); e o grupo PV, níveis mais elevados em comparação aos FPF, FPV e controle ($p<0,0001$). Já os anticorpos

anti-DSG3 foram maiores no grupo PV em comparação aos outros grupos ($P<0,0001$ para todos) (Figura 18).

A análise de variância ANOVA multifatorial foi feita com as variáveis preditoras - grupos de pacientes, familiares e controles, e títulos de anti-DSG2, anti-DSG1, anti-DSG3, gênero e idade na data da coleta do soro - as diferenças nos títulos de anti-DSG2 entre os grupos se mantiveram significantes ($p<0,001$).

Figura 18. Títulos de anticorpos IgG contra DSG 1 e 3 por ELISA nos grupos em estudo

A. Títulos de anticorpos IgG contra DSG1 (U/mL). Grupo PF apresentou títulos maiores de anti-DSG1 comparados aos demais grupos ($p<0,0001$); assim como o grupo PV, em comparação aos FPF, FPV e controle ($p<0,0001$). **B.** Títulos de anticorpos IgG contra DSG3 (U/mL). Grupo PV apresentou maiores níveis de anti-DSG3 em comparação aos demais grupos ($p<0,0001$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV

5.3) Soroprevalência dos anticorpos IgG contra DSG 1, 2 e 3

A Tabela 4 mostra a frequência de positividade para os autoanticorpos IgG anti-DSG 1, 2 e 3 nos grupos de estudo. Os grupos PF (63,9%), PV (66,4%) e FPV (73,7%) evidenciaram maior frequência de valores positivos anti-DSG2 quando comparados aos FPF (38%) e controle (27,2%) ($p<0,0001$ comparando PF, PV e FPV com controle; $p=0,0012$ comparando PF e FPF). Não houve diferença entre os grupos PF e PV ($p=0,7246$).

A soroprevalência de anti-DSG1 foi maior no grupo PF (88,2%) em relação a todos os demais ($p<0,0001$); maior no grupo PV (51,5%) em relação ao FPV (1,8%) e controle (3,5%) ($p<0,0001$ para ambos) e maior no grupo FPF (12,0%) em relação ao FPV (1,8%) ($p=0,0325$). Em relação à soroprevalência de anti-DSG3, foi maior no grupo PV (78,5%) em relação aos demais ($p<0,0001$); maior no FPF (8,0%) em relação ao FPV (0,0%) ($p=0,0446$); e não houve diferença comparando PF (4,5%), FPF (8,0%) ou FPV (0,0%) com controle (2,6%) ($p=0,5472$, $p=0,2016$, $p=0,5516$, respectivamente).

Tabela 4. Soroprevalência dos anticorpos anti-DSG 1, 2 e 3 nos grupos de estudo

	PF	PV	FPF	FPV	Controle	<i>p</i>
	n=202	n=131	n=50	n=57	n=114	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Anti-DSG2						
Positivo	129 (63,9) ^a	87 (66,4) ^b	19 (38,0) ^c	42 (73,7) ^d	31 (27,2) ^e	a,e <0,0001 b,e <0,0001
Negativo	73 (36,1)	44 (33,6)	31 (62,0)	15 (26,3)	83 (72,8)	a,c 0,0012 c,d <0,0001 d,e <0,0001
Anti-DSG1						
Positivo	179 (88,2) ^a	67 (51,5) ^b	6 (12,0) ^c	1 (1,8) ^d	4 (3,5) ^e	a,b <0,0001 a,e <0,0001 a,c <0,0001
Negativo	23 (11,8)	64 (48,5)	44 (88,0)	56 (98,2)	110 (96,5)	b,d <0,0001 b,e <0,0001 c,d 0,0325
Anti-DSG3						
Positivo	9 (4,5) ^a	102 (78,5) ^b	4 (8,0) ^c	0 (0,0) ^d	3 (2,6) ^e	a,b <0,0001 b,e <0,0001
Negativo	193(95,5)	29 (21,5)	46 (92,0)	57(100,0)	111(97,4)	b,d <0,0001 c,d 0,0446

Para os anticorpos anti-DSG1 e anti-DSG3, valores acima ou igual a 20 UR/mL foram considerados positivos, conforme o fabricante. Para os anticorpos anti-DSG2, valores de densidade óptica maiores ou iguais a 0,1365 (valor do *cut-off*) foram considerados positivos

5.4) Curvas ROC dos resultados anti-DSG 1, 2 e 3 nos grupos PF e PV, comparados ao controle

Considerando os resultados para DSG1, a AUC (área sob a curva) foi próxima de 1 (0,9425), com sensibilidade de 88,61% e especificidade de 96,49%, confirmando que o teste comercial ELISA anti-DSG1 é um bom teste diagnóstico para o PF (Figura 19D).

Em relação à DSG3, a AUC também foi próxima de 1 (0,8871), com sensibilidade de 97,37%, e especificidade de 81,68%, confirmando que o teste comercial ELISA anti-DSG3 é um bom teste diagnóstico para o PV (Figura 19H).

Em relação aos resultados de anti-DSG2, confirma-se não ser teste a ser utilizado no diagnóstico do PF e PV (verificar especificidade e sensibilidade na Figura 19A-C).

Figura 19. Curvas ROC dos resultados anti-DSG 1, 2 e 3 dos grupos PF, PV, e PF+PV, comparados ao grupo controle

A, B e C mostram as curvas ROC com resultados de anti-DSG2 (DO) nos grupos PF e PV, PF+PV, respectivamente. Observar que as especificidades e sensibilidades são baixas; D, E e F mostram curvas ROC com resultados de anti-DSG1 (UR/mL) nos grupos PF e PV, PF+PV, respectivamente. Observar alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de PF (D); G, H e I mostram curvas ROC com resultados de anti-DSG3 (UR/mL) nos grupos PF e PV, PF+PV, respectivamente. Observar alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de PV (H). PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV; AUC: área sob a curva

5.5) Correlação dos títulos de anti-DSG2 com anti-DSG 1 e 3 nos grupos PF, PV e controle

Houve correlação positiva entre os títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo PF ($r=0,1628$; $p=0,0206$) (Figura 20).

Figura 20. Correlação entre os títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo pênfigo foliáceo (PF)

Correlação positiva entre os títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo PF (teste de Spearman; $r=0,1628$; $p=0,0206$)

No grupo PV, não houve significância entre os títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 ($r=0,0732$, $p=0,4033$), mas tendência à correlação positiva entre anti-DSG3 e anti-DSG2 ($r=0,1675$, $p=0,0568$) (Figura 21).

Figura 21. Correlação dos títulos de anti-DSG1 e de anti-DSG3 com os títulos de anti-DSG2 no grupo pênfigo vulgar (PV)

Ausência de correlação (teste de Spearman) dos títulos de anti-DSG1 e anti-DSG2 ($r=0,0732$, $p=0,4033$), mas tendência à correlação positiva de anti-DSG3 e anti-DSG2 ($r=0,1675$, $p=0,0568$)

5.6) Correlação dos títulos de anti-DSG2 com as variáveis demográficas

No grupo PF, houve correlação positiva entre a idade na data da coleta do soro com os títulos de anti-DSG2 ($r=0,1457$, $p=0,0385$) (Figura 22). No grupo PV, a correlação não foi significativa ($r=0,098$, $p=0,263$) (dados não mostrados).

Em relação ao gênero, os títulos de anti-DSG2, no grupo PF, foram maiores nos pacientes do gênero masculino em relação ao feminino ($p=0,0092$) (Figura 23), confirmado pela análise de regressão logística multivariada ($p=0,015$). Nos demais grupos não houve correlação entre os títulos de anti-DSG2 e o gênero (dados não mostrados).

Quando avaliados os grupos PF e PV virgens de tratamento, não houve correlação entre idade e gênero com títulos de anti-DSG2 ($p=0,2102$ e $p=0,8305$; $p=0,9950$ e $p=0,0732$, respectivamente) (dados não mostrados).

Figura 22. Correlação dos títulos de anti-DSG2 com a idade dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF)

Há correlação positiva dos títulos de anti-DSG2 com a idade dos pacientes com PF (teste de Spearman; $r=0,1457$; $p=0,0385$)

Figura 23. Comparação dos títulos de anti-DSG2 com o gênero no grupo pênfigo foliáceo (PF)

Os títulos de anti-DSG2 foram maiores no gênero masculino em relação ao feminino (Teste de Mann-Whitney; $p=0,0092$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*

5.7) Correlação dos títulos de anti-DSG 1, 2 e 3 com a duração, tratamento e atividade dos pênfigos

A correlação dos títulos de anti-DSG2 com a duração da doença não foi significativa para os grupos PF ($r=0,0440$, $p=0,5364$) e PV ($r=-0,1629$, $p=0,0630$) (Figura 24).

Figura 24. Correlação da duração da doença com os títulos de anti-DSG2 nos grupos pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV)

Não houve correlação (teste de Spearman) significativa da duração da doença com os títulos de anti-DSG2 no grupo PF ($r=0,0440$; $p=0,5364$); houve tendência de correlação negativa no grupo PV ($r=-0,1629$; $p=0,0630$)

Para o grupo PF, não houve correlação entre os títulos de anti-DSG2 nos diferentes subgrupos de tratamento ($p>0,9999$ para todos) (dados não mostrados). Em relação ao grupo PV, os títulos de anti-DSG2 foram maiores no subgrupo sem tratamento (vírgens de tratamento somados àqueles sem tratamento há mais de 60 dias) em relação aos subgrupos em tratamento sem lesões e com lesões cutâneas ativas ($p=0,0110$ e $p=0,0311$, respectivamente), como mostrado na Figura 25. Não houve diferença estatística entre os títulos de anti-DSG2 no subgrupo em remissão comparado aos subgrupos em tratamento e sem tratamento ($p>0,9999$ para todos).

Figura 25. Títulos de anti-DSG2 em relação aos estádios de tratamento no grupo pênfigo vulgar

Os títulos de anti-DSG2 foram maiores no grupo sem tratamento comparados àqueles em tratamento sem e com lesões ativas ($p=0,0110$ e $p=0,0311$, respectivamente). Não houve diferença estatística entre os títulos de anti-DSG2 no subgrupo em remissão comparado aos subgrupos em tratamento e sem tratamento ($p>0,9999$ para todos). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn

Comparando os títulos de anti-DSG2 dos grupos PF ($n=78$) e PV ($n=31$) sem tratamento (virgens de tratamento somados àqueles sem tratamento há mais de 60 dias), aos grupos de familiares e controle, os grupos PF e PV apresentaram títulos maiores (ambos $p<0,0001$) (Figura 26). Não houve diferença dos títulos de anti-DSG2 nos subgrupos PF e PV sem tratamento ($p>0,9999$).

Figura 26. Títulos de anticorpos IgG contra DSG2 nos grupos PF e PV sem tratamento, comparados aos grupos FPF, FPV e controle

Pacientes com PF e PV sem tratamento apresentaram títulos de anti-DSG2 semelhantes, porém, títulos maiores quando comparados aos controles (ambos $p < 0,0001$). Grupo PF apresentou maiores títulos em relação ao grupo FPF ($p < 0,0031$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV

A Figura 27 mostra os resultados das análises da relação dos títulos de anti-DSG 1 e 3 nos subgrupos de tratamento.

Os títulos de anti-DSG1 (U/mL) para PF foram maiores nos subgrupos com a doença em atividade comparados àqueles sem lesões ativas ($p < 0,001$).

Nos pacientes com PV, os títulos de anti-DSG1 foram maiores nos subgrupos com a doença em atividade, comparados àquele com a doença em remissão ($p < 0,005$). Os títulos de anti-DSG3 foram maiores no subgrupo em tratamento com lesões ativas em relação àqueles em remissão ($p = 0,0250$) e em tratamento sem lesões ativas ($p = 0,0238$).

Figura 27. Títulos de anti-DSG 1 e 3 (U/mL) em relação ao tratamento e à atividade da doença nos grupos pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV)

No grupo PF, maiores títulos de anti-DSG1 foram observados nos subgrupos sem tratamento e em tratamento, com atividade da doença, comparados àqueles em remissão ($p < 0,0001$ para ambos) e àqueles em tratamento sem atividade da doença ($p = 0,0010$ e $p = 0,0004$, respectivamente). No PV, os títulos de anti-DSG1 foram maiores nos subgrupos sem tratamento e em tratamento com atividade da doença, comparados aos em remissão ($p = 0,020$ e $p = 0,0033$, respectivamente); e os títulos de anti-DSG3 foram maiores nos subgrupos em tratamento com lesões ativas em relação aos em remissão e em tratamento sem lesões ativas ($p = 0,0250$ e $p = 0,0238$, respectivamente). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn

A análise de variância ANOVA multifatorial, com as variáveis preditoras - grupos de tratamento, gênero e idade para os pacientes com PF, não mostrou diferença significativa nos títulos de anti-DSG2 entre os grupos de tratamento. Para os pacientes com PV, os títulos de anti-DSG2 foram superiores no subgrupo virgens de tratamento em relação ao subgrupo em tratamento ($p = 0,05$).

5.8) Correlação dos títulos de anti-DSG 1, 2, 3 com as formas clínicas do PF e PV no subgrupo sem tratamento (virgens de tratamento e sem tratamento há mais de 60 dias)

Comparando os pacientes com PF e PV, não houve correlação dos títulos de anti-DSG2 com as formas clínicas para os grupos PF ($p = 0,9636$) e PV ($p = 0,1077$) (Figura 28).

Em relação aos anticorpos anti-DSG1, no grupo PF, os títulos foram maiores na forma clínica generalizada em relação à localizada ($p = 0,0387$). No grupo PV, houve diferença entre

as formas clínicas ($p=0,0283$), porém comparando uma a uma, não houve diferença entre as formas cutânea exclusiva e muco-cutânea ($p>0,9999$), cutânea exclusiva e mucosa exclusiva ($p=0,1250$), com tendência à maior concentração na forma muco-cutânea, em relação à mucosa exclusiva ($p=0,0549$) (Figura 29).

Não houve diferença dos títulos de anti-DSG3 nas formas clínicas dos grupos PF e PV ($p=0,6279$ e $p=0,4166$, respectivamente) (Figura 30).

Figura 28. Comparação dos títulos de anti-DSG2 (DO) nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar sem tratamento

Não houve diferença significativa dos títulos de anti-DSG2 com as formas clínicas dos pacientes com PF e PV. Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Mann-Whitney para o grupo pênfigo foliáceo, e de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn para o grupo pênfigo vulgar

Figura 29. Comparação dos títulos de anti-DSG1 (U/mL) nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) sem tratamento

Os títulos de anti-DSG1 foram maiores na forma generalizada em relação à localizada no grupo pênfigo foliáceo ($p=0,0387$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Mann-Whitney para o grupo pênfigo foliáceo, e de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn para o grupo pênfigo vulgar

Figura 30. Comparação dos títulos de anti-DSG3 nas diferentes formas clínicas dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) sem tratamento

Ausência de associação entre os títulos de anti-DSG3 com as formas clínicas nos grupos PF e PV sem tratamento. Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*. Teste de Mann-Whitney para o grupo pênfigo foliáceo, e de Kruskal-Wallis seguido por comparação múltipla de Dunn para o grupo pênfigo vulgar

5.9) Teste de adsorção dos soros com o peptídeo DSG2

Houve diferença significativa dos títulos de anti-DSG2 pré e pós adsorção dos soros de pacientes com PF e PV com o peptídeo DSG2 ($p=0,0008$ e $p=0,0002$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5: Títulos de anticorpos anti-DSG2 (em densidade óptica) nas amostras de PF e PV após 4 ensaios seriados de adsorção com o peptídeo DSG2 por ELISA indireto

	Pré-adsorção	1ª adsorção	2ª adsorção	3ª adsorção	4ª adsorção	
PF						Valor de p
1	0,358	0,232	0,183	0,140	0,062	
2	0,573	0,391	0,241	0,156	0,081	
3	0,241	0,188	0,093	0,098	0,054	
4	0,322	0,220	0,052	0,136	0,063	0,0008
5	0,296	0,241	0,034	0,097	0,067	
6	0,186	0,188	0,029	0,082	0,057	
Mediana	0,3090	0,2260	0,0725	0,1170	0,0625	
PV						Valor de p
1	0,670	0,165	0,144	0,131	0,069	
2	0,386	0,238	0,155	0,170	0,073	
3	0,303	0,197	0,102	0,171	0,077	
4	0,416	0,249	0,032	0,149	0,082	0,0002
5	0,511	0,408	0,168	0,154	0,082	
6	0,194	0,168	0,090	0,081	0,044	
Mediana	0,4010	0,2175	0,1230	0,1515	0,0750	

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar

Após a adsorção dos soros de pacientes com PF e PV com o peptídeo DSG2, os valores de anti-DSG1 e de anti-DSG3 permaneceram positivos ($p>0,9999$ e $p=0,4063$,

respectivamente), confirmando a especificidade do teste ELISA *in house* na titulação de anticorpos anti-DSG2. A Tabela 6 mostra os valores de anti-DSG 1 e 3 pré e pós-adsorção.

Tabela 6: Títulos de anti-DSG 1 e 3 pré- e pós-adsorção dos soros de pacientes com PF e PV com o peptídeo DSG2

PF	Anti-DSG1 (U/mL)		
	Pré-adsorção	Pós-adsorção	Valor de <i>p</i>
1	161,7	146,4	>0,9999
2	150,7	225,8	
3	269,8	241,8	
4	121,7	112,8	
5	223,8	209,0	
6	186,6	219,3	
Mediana	174,2	214,2	
PV	Anti-DSG3 (U/mL)		
	Pré-adsorção	Pós-adsorção	Valor de <i>p</i>
1	185,9	185,2	0,4063
2	58,5	181,5	
3	50,5	175,4	
4	152,5	151,8	
5	169,9	155,7	
6	137,1	174,0	
Mediana	174,7	144,8	

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar

5.10) Detecção do peptídeo DSG2 por ELISA sanduíche nos grupos PF e PV sem tratamento e no grupo controle

A Tabela 7 mostra os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com PF e PV e dos controles selecionados para realização do ELISA sanduíche. Em relação à idade, foi

menor no grupo PF comparado aos grupos PV e controle ($p=0,0002$, para ambos) e não houve diferença do grupo PV comparado ao controle ($p=0,6378$). Não houve diferença entre os gêneros feminino e masculino nos grupos PF, PV e controle. Em relação à duração da doença, 22/25 pacientes com PF, e 17/17 pacientes com PV apresentaram < 5 anos de duração da doença. Quanto à forma clínica da doença, tanto no grupo PF como no grupo PV, não houve diferença estatística entre as formas clínicas. Em relação aos subgrupos virgem de tratamento e estar > 60 dias sem tratamento, também não houve diferença estatísticas nos grupos PF e PV ($p=0,2170$ e $p=0,3810$ respectivamente).

Tabela 7. Distribuição dos dados demográficos e clínicos dos grupos PF, PV e controle no ensaio de dosagem de DSG2

	PF n= 25	PV n= 17	Controles n=42	P
Média da idade (DP) (anos)	33,92 (15,68) ^a	53,53 (13,45) ^b	49,69 (14,28) ^c	^{ab} 0,0002 ^{a,c} 0,0002 ^{b,c} 0,6378
Gênero	n= 25 (%)	n= 17 (%)	n=39 (%)	^{a,b} 0,1023
Feminino	7 (28,00) ^a	9 (52,95) ^b	16 (41,02) ^c	^{a,c} 0,4237
Masculino	18 (72,00) ^a	8 (47,05) ^b	23 (58,97) ^c	^{b,c} 0,5599
Duração da doença (anos)	n= 25 (%)	n= 17 (%)		
< 1	12 (48,00) ^a	6 (35,30) ^b	-	^{a,b} 0,7734
1-5	10 (40,00) ^a	11 (64,70) ^b	-	^{a,b} 0,4269
6 -10	1 (4,00)	0 (0,00)	-	
11-15	1 (4,00)	0 (0,00)	-	
> 15	1 (4,00)	0 (0,00)	-	
Forma clínica	n= 24 (%)	n= 16 (%)		
Mucosa exclusiva	-	5 (31,25) ^b	-	
Cutânea exclusiva	-	2 (12,50) ^b	-	^a 0,4521
Muco-cutânea	-	9 (56,25) ^b	-	^b 0,1754
Localizada	15 (62,50) ^a	-	-	
Generalizada	9 (37,50) ^a	-	-	
Tratamento	n=25 (%)	n=17 (%)		
Virgens de tratamento	17 (68,00) ^a	11 (64,70) ^b	-	^a 0,2170
Sem tratamento há mais de 60 dias com lesões ativas	8 (32,00) ^a	6 (35,30) ^b	-	^b 0,3810
Anti-DSG2	n=25 (%)	n=17 (%)	n=42 (%)	^{b,c} 0,2141
Positivo	10 (40,0) ^a	7 (41,2) ^b	10 (23,8) ^c	^{a,b} 1,000
Negativo	15 (60,0)	10 (58,8)	32 (76,2)	^{a,c} 0,1792

PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar; DP: desvio padrão; *cut-off*: 0,5850 (baseado na curva ROC).

As concentrações do peptídeo DSG2 variaram de -1,57 a 2,84 ng/mL no grupo de pacientes, com mediana de 0,45 ng/mL, e de -0,10 a 5,72 ng/mL no grupo controle, com mediana de 0,33 ng/mL. Não houve diferença na concentração do peptídeo DSG2 comparando-se os grupos PF, PV e controle ($p=0,2286$) (Figura 31). Sobre a frequência de positividade do peptídeo DSG2 nos grupos de estudo (Tabela 7), não houve diferença entre os grupos PF (40%), PV (41,2%) e controle (23,8%) ($p=0,2617$).

Figura 31. Concentração do peptídeo DSG2 nos grupos pênfigo foliáceo (PF), pênfigo vulgar (PV) e controle

Os títulos do peptídeo DSG2 resultaram semelhantes entre os grupos PF, PV e controle (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,2286$). Linha horizontal em cada grupo indica a mediana; linha hachurada, o valor do *cut-off*

5.11) *Immunoblotting* com extrato de epiderme humana e soro de pacientes, familiares e controles

A Tabela 8 mostra os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com PF e PV, e dos grupos FPF, FPV e controle selecionados para realização do IB. Não houve diferença significativa na mediana de idade entre os grupos ($p=0,1168$). Não houve diferença significativa entre os gêneros ($p=0,0594$) nos grupos estudados.

Tabela 8: Dados demográficos e clínicos, resultados dos ensaios ELISA anti-DSG 1, 2 e 3, e do *immunoblotting* dos grupos PF e PV, FPF, FPV e controle

	Gênero	Idade (anos)	Duração da doença (meses)	Tratamento	Anti-DSG2 (DO)	Anti-DSG1 (U/mL)	Anti-DSG3 (U/L)	Fragmentos no IB (kDa)
C+PF	M	57	8	VT	0,150	341,131	0,245	160
PF1	M	23	48	Sem tratamento*	0,088	99,796	1,929	NV
PF2	M	18	6	VT	0,223	193,08	4,154	NV
PF3	M	25	36	VT	0,894	237,90	8,7	NV
PF4	F	33	12	VT	0,358	269,809	0,688	150/160
PF5	M	66	132	Em tratamento	0,612	179,149	0,000	NV
PF6	M	38	9	VT	0,410	186,63	0,32	150/ 160
PF7	M	14	84	Remissão	0,475	0,649	0,363	150
C+ PV	F	52	12	Em tratamento	0,375	11,649	185,884	130
PV1	F	70	12	Sem tratamento*	0,386	165, 585	48,034	NV
PV2	M	61	24	Em tratamento	0,211	3,865	172,784	130
PV3	M	50	24	VT	0,213	42,159	166,914	130
PV4	M	68	6	VT	0,311	167,617	163,798	150/160 e 130

PV5	M	60	12	VT	0,338	44,309	132,180	130
PV6	M	50	6	VT	0,348	146,205	103,604	130
PV7	M	31	6	VT	0,148	115, 615	1,920	130
FPF1	M	42	NA	NA	0,319	89,658	32,423	NV
FPF2	F	ND	NA	NA	0,571	1,629	2,077	130
FPF3	F	64	NA	NA	0,105	89,658	32,423	NV
FPF4	F	15	NA	NA	0,090	3,694	1,277	NV
FPF5	F	ND	NA	NA	0,076	1,661	0,010	NV
FPV1	F	17	NA	NA	0,363	2,959	0,979	150
FPV2	M	ND	NA	NA	0,450	0,934	1,224	150
FPV3	F	60	NA	NA	0,351	6,762	2,151	150
FPV4	F	18	NA	NA	0,404	1,222	1,780	NV
FPV5	F	36	NA	NA	0,229	3,348	0,897	150/ 160
CTL1	F	51	NA	NA	0,067	0,505	0,000	150/ 160
CTL2	M	51	NA	NA	0,067	3,462	2,226	150/ 160

CTL3	M	58	NA	NA	0,086	5,330	0,993	NV
CTL4	M	59	NA	NA	0,381	0,302	2,564	NV

*sem tratamento há mais de 60 dias; *Cut-off* DSG 1 e 3: 20 U/mL; *Cut-off* DSG2: 0,1365

PF: pênfigo foliáceo. PV: pênfigo vulgar. FPF: familiares de PF; FPV: familiares de PV; CTL: controle; F: feminino; M: masculino; C+: controle positivo; C-: controle negativo; NA: não se aplica; VT: virgem de tratamento; NV: não visto

No IB, um fragmento de 150 kDa (peptídeo DSG2) ou de 160 kDa (peptídeo DSG1), ou representando ambos, foi reconhecido por amostras de 3 pacientes com PF (PF4, PF6 e PF7) e um paciente com PV (PV4). Não houve reconhecimento do fragmento de 130 kDa (peptídeo DSG3) por pacientes com PF. As amostras de 6 pacientes com PV (PV2, PV3, PV4, PV5, PV6, PV7) reconheceram o fragmento de 130 kDa. Entre os familiares e controles, 4 amostras do grupo FPV (FPV1, FPV2, FPV3 e FPV5) e 2 dos controles (CTL1 e CTL2) reconheceram o peptídeo de 150 kDa ou de 160 kDa, ou ambos. Uma amostra do grupo FPF (FPF2) reconheceu a fração de 130 kDa. O experimento não diferenciou a marcação de 150 kDa e 160 kDa (Figuras 32 e 33).

Figura 32. *Immunoblotting* com amostras de soro de pacientes com PF e PV para detecção de DSGs em extrato de epiderme humana

Peptídeo de 160 kDa (correspondente à DSG1) ou de 150 kDa (correspondente à DSG2) (ou ambos) foi reconhecido por três amostras do grupo PF (PF4, PF6 e PF7) e uma do grupo PV (PV4). Seis de 7 amostras dos pacientes com PV reconheceram o peptídeo de 130 kDa (correspondente à DSG3). As amostras do grupo PF não reconheceram o peptídeo de 130 kDa. PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV

Figura 33. *Immunoblotting* com amostras do soro dos grupos FPF, FPV e controle para detecção de DSGs em extrato de epiderme humana

A amostra FPF2 reconheceu o peptídeo de 130 kDa, correspondente à DSG3. Peptídeo de 160 kDa ou de 150 kDa, ou de ambos, foi reconhecido pelas amostras FPV1, FPV2, FPV3, FPV5, CTL1 e CTL2. C+: controle positivo; CTL: controle; PF = pênfigo foliáceo; PV = pênfigo vulgar; FPF = familiares de PF; FPV = familiares de PV

5.12) Amostras de pele e mucosa utilizadas no ensaio RT-PCR e na IHQ coradas por hematoxilina-eosina

Os dados demográficos, sorológicos e clínicos dos pacientes submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa estão descritos na Tabela 9.

Os três pacientes com PF apresentavam mediana de idade de 23 anos, do gênero masculino, com duração da doença variando de 6 a 48 meses. Dois pacientes apresentavam a forma generalizada da doença e o outro, a forma localizada; dois eram virgens de tratamento e um havia começado o tratamento há 30 dias. Em relação aos títulos de anticorpos contra as DSGs, apresentaram positividade para anti-DSG1 e negatividade para anti-DSG3; e dois deles positividade para anti-DSG2. Em relação aos resultados de IB, não foram vistas bandas peptídicas utilizando-se soro dos três pacientes.

Os pacientes com PV apresentavam mediana de idade de 61 anos, do gênero masculino, com duração da doença variando de 4 a 24 meses. Todos apresentavam a forma clínica mucocutânea, dois eram virgens de tratamento e um deles estava sem tratamento há mais de 60 dias. Em relação aos títulos de anticorpos contra as DSGs, todos apresentaram positividade para anti-

DSG 2 e 3, e dois deles também para anti-DSG1. No IB, o soro de todos reconheceu a banda de 130 kDa, correspondente à DSG3.

Tabela 9: Dados demográficos e clínicos, e titulação de anticorpos contra DSG 1, 2 e 3 por ELISA dos pacientes com pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV) submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa

	Idade (anos)	Gênero	Tempo de doença (meses)	Forma clínica	Tratamento	Anti-Dsg1 (UR/mL)	Anti- Dsg2 (DO)	Anti-Dsg3 (UR/mL)	IB (kDa)
PF1	23	Masculino	48	Generalizada	Em tratamento há 30 dias	99,796	0,088	1,929	NV
PF2	18	Masculino	6	Generalizada	Virgem de tratamento	193,08	0,223	4,154	NV
PF3	25	Masculino	36	Localizada	Virgem de tratamento	237,90	0,894	8,7	NV
PV2	61	Masculino	24	Muco- cutânea	Em tratamento na coleta do soro – Sem tratamento na coleta da biópsia	3,865	0,211	172,784	130
PV3	50	Masculino	4	Muco- cutânea	Virgem de tratamento	42,159	0,213	166,914	130
PV4	68	Masculino	6	Muco- cutânea	Virgem de tratamento	167,617	0,311	163,798	130

NV: não visto no gel de poliacrilamida. *Cut-off* ELISA comercial anti-DSG1 e 3: >20 U/mL; *cut –off* ELISA anti-DSG2 *in house*: >0,1365.

As Figuras 34 e 35 mostram os cortes histológicos corados por H&E (hematoxilina e eosina) das amostras de pele e/ou mucosa dos 3 pacientes com PF e de 3 pacientes com PV, respectivamente. A Figura 36 mostra o corte histológico corado por H&E de uma amostra de pele normal de abdômen de indivíduo saudável usado como controle da IHQ. Todos os pacientes com PF têm amostras de pele íntegra com a epiderme dentro da normalidade, sem alterações histopatológicas relevantes; dois pacientes com PF têm amostras de pele lesional com acantólise subcórnea e células acantolíticas; um paciente com PF tem amostra da mucosa labial íntegra, hiperplásica. Todos os pacientes com PV têm amostras da mucosa lesional mostrando epiderme com acantólise suprabasal e células acantolíticas. Um destes pacientes com PV tem também pele íntegra com epiderme dentro da normalidade e pele lesional com acantólise suprabasal e células acantolíticas.

Figura 34. Histologia dos cortes congelados de pele e mucosa, corados por H&E (hematoxilina-eosina), de pacientes com PF

As amostras exibem artefatos pré-analíticos decorrentes do congelamento do material. O corte de pele íntegra do paciente com PF1 apresenta epiderme discretamente hiperplásica, exibindo paraceratose e retificação das cristas epidérmicas, sem outras alterações histopatológicas. O corte de pele íntegra do paciente com PF2 apresenta paraceratose, espongiose leve e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, perivascular, na porção superficial da derme. O corte de pele lesional exibe epiderme com leve espongiose, formação de bolha subcórnea acelular e presença de raras células acantolíticas no assoalho da lesão. Na porção superficial da derme, há discreto infiltrado inflamatório misto perivascular. O corte da mucosa labial íntegra mostra mucosa

escamosa hiperplásica, exibindo paraceratose e leve espongiose. O corte de pele íntegra do paciente com PF3 apresenta epiderme com paraceratose e retificação das cristas epidérmicas, sem outras alterações histopatológicas; o corte de pele lesional apresenta epiderme hiperplásica, exibindo espongiose acentuada e formação de bolha, diretamente abaixo do estrato córneo, preenchida por fibrina e neutrófilos. Na camada superior da epiderme, nota-se a formação de vacúolos nos espaços intercelulares. Há infiltrado inflamatório misto perivascular na porção superficial da derme (amplificação original de 40x).

Figura 35. Histologia dos cortes congelados de pele e mucosa, corados por H&E (hematoxilina-eosina), de pacientes com PV

As amostras exibem artefatos pré-analíticos decorrentes do congelamento do material. Os cortes da mucosa lesional dos pacientes com PV2, PV3 e PV4 apresentam mucosa escamosa exibindo formação de bolha suprabasal acelular, com presença de raras células acantolíticas. O corte de pele íntegra do paciente com PV3 mostra epiderme com paraceratose, sem outras alterações histopatológicas; o corte de pele lesional mostra epiderme com formação de bolha suprabasal

acelular, com presença de raras células acantolíticas e com desprendimento de parte do teto da lesão (amplificação original de 40x).

Figura 36. Histologia de corte congelado de pele corado por H&E (hematoxilina-eosina), de controle saudável

Corte de pele de indivíduo saudável controle com epiderme exibindo ortoceratose, sem outras alterações histopatológicas.

5.13) Expressão proteica das DSG 1, 2 e 3 na pele e/ou mucosa de pacientes com pênfigo, por imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) mostrou, nos pacientes com PF, distribuição da DSG1 predominante nas camadas superiores da epiderme, da DSG2 difusa na epiderme em 2 (PF2 e PF3) dos 3 pacientes, mais proeminente nas porções inferiores, e da DSG3 presente principalmente nas camadas inferiores da epiderme (Figuras 37, 38 e 41). Houve presença da expressão de DSG1 em grânulos intercelulares e/ou intracitoplasmáticos na pele lesional dos dois pacientes com PF (PF2 e PF3) (Figuras 39 e 42). Não houve alteração no padrão e na localização da DSG2 nos queratinócitos comparando as amostras de pele íntegra e pele lesional (Figuras 40 e 43).

Nos pacientes com PV, as IHQs das amostras de mucosa lesional mostraram expressão proteica das DSGs 1 e 2 menos intensas em relação à DSG3 (Figuras 44, 45 e 48). Houve presença de grânulos intercelulares de DSG3 esparsos nas peles íntegra e lesional do paciente com PV3 (Figura 47) e grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos de DSG3 nas amostras da mucosa lesional de 2 pacientes com PV (PV3 e PV4) (Figuras 48 e 49). Não houve alteração no padrão e na localização da DSG2 nos queratinócitos comparando a amostra de pele íntegra e pele lesional do paciente com PV3 (Figura 46) e nem comparando a amostra da mucosa íntegra do paciente com PF2 com as mucosas lesionais dos pacientes com PV2, PV3 e PV4 (Figura 50).

A pele normal saudável de abdominoplastia (Figura 52) apresentou distribuição epidérmica clássica das DSGs: DSG1 predominou nas camadas superiores, enquanto DSG2 e DSG3 predominaram nas camadas inferiores. Diferentemente, a expressão de DSG2 se estendeu a toda a epiderme nas amostras de pele íntegra da maioria dos pacientes com PF e PV, e esteve presente no assoalho e no teto da bolha das amostras de pele lesional de PF e PV.

Figura 37. Imuno-histoquímica da biópsia de pele íntegra do paciente com PF1

Os cortes de pele íntegra do paciente com PF1 mostram expressão de DSG1 na membrana dos queratinócitos (KCs) em todas as camadas da epiderme, poupando a camada basal; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs com maior intensidade nas camadas inferiores e com destaque para as células basais; expressão de DSG3 na membrana dos KCs, poupando o terço superior da epiderme (ampliação original de 40x).

ELISA anti-DSG1: 99,796 U/ml; anti-DSG2: 0,088 DO 405nm; anti-DSG3: 1,929 U/ml (vide Tabela 9)

Figura 38. Imuno-histoquímica das biópsias de pele e da mucosa do paciente com PF2

Os cortes de pele íntegra do paciente com PF2 mostram expressão da DSG1 na membrana dos KCs em todas as camadas da epiderme, poupando a camada basal; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs, em todas as camadas da epiderme; expressão de DSG3 na membrana dos KCs, em todas as camadas da epiderme, com maior intensidade nas células basais (amplificação original de 40x).

Os cortes de pele lesional mostram epiderme com formação de bolha subcórnea, presença de células acantolíticas e desprendimento do teto da lesão. A expressão das DSGs é menos intensa que na pele íntegra na epiderme como um todo (amplificação original 40x). Há expressão fragmentada na membrana e presença de grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos de DSG1, melhores demonstrados na Figura 39 (amplificação original de 100x).

Os cortes da mucosa íntegra exibem expressão fraca da DSG1 na membrana dos KCs, em todas as camadas da epiderme; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs com destaque para as camadas espinhosa e basal; expressão da DSG3 na membrana dos KCs, em todas as camadas da epiderme, com maior intensidade na camada basal (amplificação original de 40x).

ELISA anti-DSG1: 193,08 U/ml; anti-DSG2: 0,223 DO 405nm; anti-DSG3: 4,154 U/ml (vide Tabela 9).

Figura 39. Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias de pele do paciente com PF2

Em destaque a expressão da DSG1 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PF2 mostrando a presença de grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos, amplamente distribuídos na pele lesional (amplificação original de 100x).

Figura 40. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biopsias de pele do paciente com PF2

Comparação da expressão da DSG2 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PF2, mostrando expressão um pouco diminuída na pele lesional e ausência de alteração no padrão de expressão ou na localização da DSG2 nos queratinócitos (amplificação original de 100x).

Figura 41. Imuno-histoquímica das biópsias de pele do paciente com PF3

Os cortes de pele íntegra do paciente com PF3 mostram expressão da DSG1 na membrana nos KCs em todas as camadas da epiderme, poupando a camada basal; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs, em todas as camadas da epiderme; expressão da DSG3 na membrana nos KCs das camadas inferiores, com maior intensidade nas células basais (amplificação original de 40x). Os cortes de pele lesional apresentam epiderme com formação de bolha subcórnea. A expressão das DSGs é menos intensa na epiderme como um todo para DSG1 e DSG2 e mantém padrão semelhante para DSG3 (amplificação original de 40x). Há expressão fragmentada da DSG1 na membrana dos KCs e grânulos intercelulares melhor demonstrados na Figura 42 (amplificação original de 100x).

ELISA anti-DSG1: 237,90 U/ml; anti-DSG2: 0,894 DO 405 nm; anti-DSG3: 8,7 UI/ml (vide Tabela 9)

Figura 42. Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias de pele do paciente com PF3

Comparação da expressão da DSG1 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PF3, mostrando expressão diminuída na pele lesional e mais fragmentada na membrana principalmente na pele lesional, com raros grânulos intercelulares (amplificação original de 100x).

Figura 43. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias de pele do paciente com PF3

Comparação da expressão da DSG2 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PF3, mostrando expressão diminuída na pele lesional e ausência de alteração no padrão de expressão ou na localização da DSG2 nos queratinócitos (amplificação original de 100x).

Figura 44. Imuno-histoquímica da biópsia da mucosa do paciente com PV2

Os cortes da mucosa lesional do paciente com PV2 apresentam epiderme com formação de bolha suprabasal e presença de células acantolíticas. Há expressão rara de DSG1, principalmente nas células acantolíticas; a expressão de DSG2 é fraca e citoplasmática; a expressão de DSG3 é mais intensa que as demais, na membrana dos KCs, em toda a região da acantólise suprabasal (amplificação original de 100X).

ELISA anti-DSG1: 3,865 UI/ml; anti-DSG2: 0,211 DO 405 nm; anti-DSG3: 172,784 UI/ml (vide Tabela 9). Data da coleta do soro não coincidente com a data da biópsia

Figura 45. Imuno-histoquímica das biópsias de pele e mucosa do paciente com PV3

Os cortes de pele íntegra do paciente com PV3 mostram expressão da DSG1 na membrana dos KCs em todas as camadas da epiderme, poupando a camada basal; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs, em todas as camadas da epiderme; expressão da DSG3 na membrana dos KCs e em todas as camadas da epiderme, com a presença de raros grânulos intercelulares. (amplificação original de 40x). Os grânulos intercelulares da DSG3 são melhor vistos na Figura 47 (amplificação original de 100x).

Os cortes de pele lesional mostram epiderme com formação de bolha suprabasal. Há expressão da DSG1 em todas as camadas da epiderme. A expressão de DSG2 mantém o mesmo padrão citoplasmático, em todas as camadas da epiderme. A DSG3 é expressa intercelular nos queratinócitos, com presença de raros grânulos intercelulares e com maior intensidade de expressão nas células basais e acantóticas (amplificação original de 40x). Os grânulos intercelulares da DSG3 são melhor vistos na Figura 47 (amplificação original de 100x).

Os cortes da mucosa lesional mostram região de acantólise suprabasal com células acantolíticas, sem demonstração do teto da lesão. A DSG1 é expressa em algumas células acantolíticas; há expressão fraca de DSG2 em raras células acantolíticas; a expressão da DSG3 é mais intensa que as demais DSGs, fragmentada na membrana, e com presença de grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos, tanto na camada basal quanto nas células acantolíticas (amplificação original de 40x). Os grânulos intracitoplasmáticos da DSG3 são melhor vistos na Figura 51 (amplificação original de 100x).

ELISA anti-DSG1: 42,159 UI/ml; anti-DSG2: 0,213 DO 405 nm; anti-DSG3: 166,914 UI/ml (vide Tabela 9)

Figura 46. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias de pele do paciente com PV3

Comparação da expressão da DSG2 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PV3, mostrando intensidade um pouco maior nas células da camada basal da pele lesional e ausência de alteração no padrão de expressão ou na localização da DSG2 nos queratinócitos. (amplificação original de 100x)

Figura 47. Imuno-histoquímica da DSG3 nas biópsias de pele do paciente com PV3

Comparação da expressão da DSG3 nos cortes de pele íntegra e de pele lesional do paciente com PV3, mostrando a presença de raros grânulos intercelulares nas peles íntegra e lesional (assoalho da bolha acantolítica) (amplificação original de 100x)

Figura 48. Imuno-histoquímica da biópsia da mucosa do paciente com PV4

Cortes da mucosa lesional do paciente com PV4 mostrando região de acantólise suprabasal, contendo a porção superior (amplificação original de 40x) e inferior da epiderme (amplificação original de 100X). Expressão fraca e fragmentada da DSG1 nas células basais; expressão citoplasmática da DSG2 em todas as camadas da epiderme, principalmente nas camadas espinhosa e basal; a expressão da DSG3 é mais intensa que as demais DSGs, em todas as camadas da epiderme. Nas células basais, nota-se discreta fragmentação na membrana e raros grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos.

ELISA anti-DSG1: 167,617 UI/ml; anti-DSG2: 0,311 DO 405 nm; anti-DSG3: 163,798 UI/ml (vide Tabela 9)

Figura 49. Imuno-histoquímica da DSG1 nas biópsias da mucosa

Comparação da expressão da DSG1 nos cortes da mucosa íntegra do paciente com PF2 e da mucosa lesional dos pacientes com PV2, PV3 e PV4, mostrando que a expressão é fraca e não é possível ver grânulos (amplificação original de 100x)

Figura 50. Imuno-histoquímica da DSG2 nas biópsias da mucosa

Comparação da expressão da DSG2 nos cortes da mucosa íntegra do paciente com PF2 e da mucosa lesional dos pacientes com PV2, PV3 e PV4, mostrando manutenção da expressão intracitoplasmática, sem formação de grânulos (amplificação original de 100x).

Figura 51. Imuno-histoquímica da DSG3 nas biópsias da mucosa

Comparação da expressão da DSG3 nos cortes da mucosa íntegra do paciente com PF2 e mucosas lesionais dos pacientes com PV2, PV3 e PV4, mostrando a presença de grânulos intercelulares e intracitoplasmáticos, presentes no paciente com PV3 e raros no paciente com PV4 (amplificação original de 100X).

Figura 52. Imuno-histoquímica de pele normal de controle saudável

Cortes de pele normal mostram expressão da DSG1 na membrana dos KCs em todas as camadas da epiderme, poupando a camada basal; expressão citoplasmática de DSG2 nos KCs das camadas inferiores, com destaque para as células basais; expressão da DSG3 na membrana dos KCs das camadas inferiores, com maior intensidade nas células basais (amplificação original de 40x).

5.14) Expressão gênica das DSG 1, 2 e 3 por RT-PCR nas amostras de pele e mucosa de pacientes com PF e PV

As curvas de amplificação das amostras de cDNA estão apresentadas nas Figuras 53 a 55. A Tabela 10 mostra a média dos valores de *cycle Threshold* (cT) de cada amostra e permite melhor compreensão destes resultados. O cT representa o ciclo no qual a fluorescência gerada pela reação de RT-PCR ultrapassa o limite da fluorescência de fundo

e, portanto, uma quantidade detectável de produto foi amplificada. O valor do cT é inversamente proporcional ao valor da expressão relativa do gene de interesse.

Na Figura 53 estão apresentadas as curvas de amplificação do cDNA das amostras dos pacientes com PF, PV e *lifting* para a DSG1. As amostras que amplificaram primeiro são as da duplicata da mucosa lesional do paciente com PV2.

Na Figura 54 estão apresentadas as curvas de amplificação do cDNA das amostras dos pacientes com PF, PV e *lifting* para a DSG2. As amostras que amplificaram primeiro são as da duplicata da mucosa lesional e da duplicata da mucosa íntegra dos pacientes com PV2 e PF2 respectivamente..

Na Figura 55 estão apresentadas as curvas de amplificação do cDNA das amostras dos pacientes com PF, PV e *lifting* para a DSG3. As amostras que amplificam primeiro são as da duplicata da mucosa lesional da paciente com PV2.

PV2 trata-se de paciente do gênero masculino, com resultados negativos no ELISA anti-DSG 1, e positivo para anti-DSG 2 e 3. No IB marcou apenas a banda de 130 kDa (vide Tabela 9).

Figura 53. Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG1

A ordenada mostra a fluorescência emitida e a abscissa, o número de ciclos da reação de PCR. A linha vermelha horizontal contínua mostra o *Threshold* da reação. Observar que as sequências da DSG1 das amostras foram amplificadas entre 20 e 30 ciclos. As duas curvas que antecedem as demais correspondem às amostras da duplicata da mucosa lesional do paciente com PV2

Figura 54. Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG2

A ordenada mostra a fluorescência emitida e a abscissa os ciclos da reação de PCR. A linha vermelha horizontal contínua mostra o *Threshold* da reação. Observar que as sequências da DSG2 das amostras foram amplificadas entre 23 e 33 ciclos. As quatro curvas que antecedem as demais correspondem às amostras da duplicata da mucosa lesional do paciente com PV2 e da mucosa íntegra do paciente com PF2

Figura 55. Curvas de amplificação do cDNA das amostras de pele e/ou mucosa dos pacientes com PF e PV para a sequência da DSG3

A ordenada mostra a fluorescência emitida e a abscissa os ciclos da reação de PCR. A linha vermelha horizontal contínua mostra o *Threshold* da reação. Observar que as sequências da DSG3 das amostras foram amplificadas entre 18 e 32 ciclos. As duas curvas que antecedem as demais correspondem às amostras da duplicata da mucosa lesional do paciente com PV2

Os produtos das amplificações das amostras demonstradas nas figuras acima estão apresentados no gel de agarose a 1,5% nas Figuras 56 a 58.

A Figura 56 mostra os amplicons de 411pb correspondentes à sequência da DSG1. As amostras de 11 a 16 foram excluídas das análises, pois não apresentavam histologia adequada do tecido.

A Figura 57 mostra os amplicons de 793 pb correspondentes à sequência da DSG2. As amostras com numeração 4, 5, 34 a 37 foram excluídas das análises, pois não apresentavam histologia adequada do tecido. As amostras de pele íntegra do paciente com PF1 (numeração 32 e 33 no gel) e mucosa lesional do paciente com PV3 (numeração 30 e 31 no gel) não mostram amplificação no gel e possuem resultado do cT elevado e expressão gênica quase nula (Tabelas 10 e 11).

A Figura 58 mostra os amplicons de 107 pb correspondentes à sequência da DSG3.

As amostras com numeração 11 a 16 foram excluídas das análises, pois não apresentavam histologia adequada do tecido.

Figura 56. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 441 pb correspondentes à sequência da DSG1

PV: pênfigo vulgar; PF: pênfigo foliáceo. Os números que antecederem as amostras correspondem à numeração dos poços no gel. Os números associados a PF ou PV correspondem à identificação destes pacientes

Figura 57. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 793 pb correspondentes à sequência da DSG2

PV: pênfigo vulgar; PF: pênfigo foliáceo. Os números que antecedem as amostras correspondem à numeração dos poços no gel. Os números associados a PF ou PV correspondem à identificação destes pacientes. As amostras de pele íntegra do paciente com PF1 e mucosa lesional de PV3 não mostraram amplificação no gel

Figura 58. Gel de agarose 1,5% com os produtos da RT-PCR mostrando amplicons de 107 pb correspondentes à sequência da DSG3

PV: pênfigo vulgar; PF: pênfigo foliáceo. Os números que antecedem as amostras correspondem à numeração dos poços no gel. Os números associados a PF ou PV correspondem à identificação destes pacientes

A Tabela 10 mostra a média dos valores do cT das amostras de pacientes com PF, PV e *lifting* e a Tabela 11 mostra a expressão relativa das DSGs 1, 2 e 3 nestas amostras em relação ao gene endógeno 18S.

As avaliações dos resultados de expressão gênica são qualitativas, já que o tamanho amostral é pequeno para fazer análise estatística.

Tabela 10. Cycle threshold (cT) do gene endógeno 18S e das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele e/ou mucosa de cada paciente com PF e PV

Amostras	PF1		PF2		PF3		PV2	PV3			PV4	LF
	PI	PI	PL	MI	PI	PL	ML	PI	PL	ML	ML	
18S (cT)	15,30	16,53	13,79	13,61	14,12	14,52	14,53	15,46	14,42	14,31	14,78	13,39
DSG1 (cT)	27,31	29,59	24,40	25,93	24,22	25,31	21,60	27,17	27,05	29,49	25,74	24,89
DSG2 (cT)	32,05	33,17	29,17	24,74	28,75	30,39	24,35	31,82	30,33	32,07	29,80	27,91
DSG3 (cT)	26,90	32,18	21,81	21,29	22,43	22,64	19,44	26,22	23,89	23,40	21,10	21,88

Legenda: PI: pele íntegra; PL: pele lesional; ML: mucosa lesional; MI: mucosa íntegra; LF: pele de *lifting* facial; PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar. Os experimentos foram feitos 2 vezes, com as amostras em duplicata e a tabela mostra a média de todos os valores de *cT* de cada amostra. Os resultados do LF apresentados são a média dos valores de *cT* de 2 amostras

Tabela 11. Expressão gênica relativa de cDNA ($\times 10^{-4}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele e/ou mucosa de cada paciente com PF e PV

Amostras	PF1		PF2		PF3		PV2	PV3			PV4	LF
	PI	PI	PL	MI	PI	PL	ML	PI	PL	ML	ML	
DSG1 ($2^{\Delta ct}$)	2,42	1,17	6,41	1,96	9,11	5,65	74,42	2,98	1,57	0,27	5,00	7,21
DSG2 ($2^{\Delta ct}$)	0,09	0,10	0,23	4,47	0,40	0,17	11,04	0,12	0,16	0,04	0,30	0,72
DSG3 ($2^{\Delta ct}$)	3,22	0,19	38,59	48,85	31,62	35,88	330,89	5,75	14,13	18,35	124,52	56,84

Legenda: PI: pele íntegra; PL: pele lesional; ML: mucosa lesional; MI: mucosa íntegra; LF: pele de *lifting*; PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar

Δct : calculado subtraindo o valor de cycle Threshold (cT) do gene alvo (desmogleínas 1, 2 e 3) do valor do cT do gene referência (18S)

Os experimentos foram feitos 2 vezes, com as amostras em duplicata e o cálculo do Δct foi feito usando a média de todos os valores de cT de cada amostra. Os resultados do LF apresentados são a média da expressão gênica de 2 amostras

Comparando-se as expressões gênicas relativas das DSGs 1, 2 e 3 nas duas amostras de pele normal de *lifting*, houve predomínio da expressão gênica da DSG3, seguida pela expressão das DSG 1 e 2 (Figura 59).

Figura 59. Expressão gênica relativa das DSG 1, 2 e 3 na pele de *lifting*

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta\text{CT}}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele normal de *lifting*. Os boxes nos gráficos mostram a mediana e a linha vertical, as variações dos valores individuais

Comparando-se as expressões gênicas relativas das DSGs 1, 2 e 3 nas 3 amostras de pele íntegra e nas 2 amostras de pele lesional para os pacientes com PF, houve predomínio da expressão gênica da DSG3, seguida pela expressão das DSG 1 e 2, tanto nas amostras de pele íntegra quanto de pele lesional (Figura 60).

Figura 60. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele íntegra e lesional dos pacientes com PF

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta\text{Ct}}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele íntegra e nas amostras de pele lesional dos pacientes com PF. Os boxes nos gráficos mostram a mediana e a linha vertical, as variações dos valores individuais

Considerando-se as 3 amostras da mucosa lesional dos pacientes com PV, houve predomínio da expressão gênica da DSG3, seguida pela expressão das DSG 1 e 2 (Figura 61). Na mucosa íntegra do paciente com PF, a expressão da DSG3 foi maior (0,004885) que a das DSGs 1 e 2 (0,000196 e 0,000447, respectivamente), e a expressão da DSG2 foi maior que a da DSG1.

Figura 61. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras da mucosa lesional dos pacientes com PV

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta CT}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras da mucosa lesional dos pacientes com PV. Os boxes nos gráficos mostram a mediana e a linha vertical, as variações dos valores individuais

Em relação à expressão gênica relativa, comparando-se as amostras de pele íntegra de 3 pacientes com PF e de um com PV, houve predomínio da expressão das DSGs 1, 2 e 3 em um dos pacientes com PF e nos demais a expressão foi maior no paciente com PV (Figura 62).

Figura 62. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 na pele íntegra dos pacientes com PF e PV

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta CT}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele íntegra dos pacientes com PF comparadas à de paciente com PV. Os boxes nos gráficos mostram a mediana e a linha vertical, as variações dos valores individuais

Da mesma forma, em relação às amostras de pele lesional de 3 pacientes com PF e de um com PV, a expressão das DSGs 1 e 3 se apresentaram menos acentuadas, e a expressão da DSG2 foi semelhante na amostra de PV (Figura 63).

Figura 63. Expressão gênica relativa das DSGs 1, 2 e 3 na pele lesional dos pacientes com PF e PV

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta C_T}$) das DSGs 1, 2 e 3 nas amostras de pele lesional dos pacientes com PF em relação à do PV. Os boxes nos gráficos mostram a mediana e a linha vertical, as variações dos valores individuais

Avaliando a expressão da Dsg2 em todas as amostras de PI e PL, MI e ML dos pacientes com PF e PV, nota-se que as amostras de mucosa em geral têm maior expressão de Dsg2 que as amostras de pele. E a amostra de pele normal de FL tem maior expressão que as demais amostras de pele (Figura 64).

Figura 64. Expressão gênica relativa da DSG 2 em todas as amostras de pele e mucosa dos pacientes com PF e PV

Comparação da expressão gênica relativa ($2^{\Delta C_T}$) da DSG 2 em todas as amostras de PI e PL, MI e ML dos pacientes com PF e PV

Relação da expressão gênica e da expressão proteica nas amostras de pele e de mucosa no PF e PV

Considerando-se ambos os resultados da expressão proteica à IHQ e da expressão gênica à RT-PCR para as amostras de PF e de PV, demonstrou-se expressão proteica e gênica das DSGs 1, 2 e 3 tanto na pele e/ou mucosa íntegra quanto na pele e/ou mucosa lesional. Nas amostras de mucosa íntegra do paciente com PF, assim como nas mucosas lesionais dos pacientes com PV, a expressão proteica e a expressão gênica da DSG3 foram mais pronunciadas comparadas às das DSGs 1 e 2.

Na IHQ, os cortes de pele dos Pacientes com PF2 e PF3 apresentaram grânulos intercelulares e/ou intracitoplasmáticos de DSG1 na pele lesional e, observando os resultados de expressão gênica, houve maior expressão da DSG1 na pele lesional em relação à pele íntegra no paciente com PF2 e o contrário no paciente com PF3.

Nos cortes de pele do paciente com PV3, a IHQ mostrou grânulos esparsos intercelulares de DSG3 tanto na pele íntegra quanto na pele lesional e a expressão gênica da DSG3 foi maior na pele lesional em relação à pele íntegra. Os cortes de mucosa lesional dos pacientes com PV3 e PV4 apresentaram grânulos intracitoplasmáticos de DSG3 e a expressão gênica da DSG3 foi menor no paciente com PV3 e maior no paciente com PV4 comparadas à amostra da mucosa íntegra do paciente com PF2.

6. DISCUSSÃO

As DSGs 1 e 3 são os principais alvos antigênicos nos pênfigos autoimunes. A DSG2 também é uma molécula de adesão desmossomal cuja participação na patogênese dos pênfigos não foi muito estudada. Neste trabalho evidenciamos a presença de anticorpos anti-DSG2 em amostras do soro de pacientes com PF e PV, seus familiares e controles saudáveis de área endêmica. A presença de autoanticorpos circulantes anti-DSG2 em pacientes com pênfigo abre uma discussão sobre o desencadeamento da sua produção. Houve diferenças significantes entre os títulos de anticorpos em pacientes com PF e PV, quando comparados aos controles saudáveis, e entre PF e FPF, mas não entre PV e FPV.

A ligação dos anticorpos é dirigida contra epítomos antigênicos específicos, e eventualmente, em moléculas com epítomos semelhantes, pode haver reação cruzada. Pensando em excluir uma provável reação cruzada antigênica (possível devido à similaridade gênica e proteica entre os peptídeos DSG 1, 2 e 3) resultando na produção de anti-DSG2, testes de adsorção foram necessários para descartar esta hipótese. Após sucessivas etapas de ELISA *in house* para adsorção das amostras do soro com peptídeo DSG2, foram repetidos os ensaios ELISA anti-DSG1 / DSG3 com os soros de 12 pacientes, que não apresentaram variações nos níveis de anti-DSG1 ou anti-DSG3 antes e após a adsorção do soro com DSG2. Estes resultados descartaram possível reatividade cruzada e confirmaram a produção específica de anticorpos contra o peptídeo DSG2 por pacientes e controles.

A presença de títulos mais elevados de anti-DSG2 nos pênfigos em comparação aos controles é favorável à hipóteses de que a DSG2 pode ter alguma participação na patogênese dos pênfigos, no entanto, sua presença em familiares (especialmente em FPV)

e controles, leva a pensar que o papel de anti-DSG2 provavelmente não é patogênico, ou pelo menos não isolado.

Curva ROC foi realizada para padronizar o teste ELISA anti-DSG2 *in house* e para definição do valor de *cut-off*. Comparando com as curvas ROC dos ELISAs anti DSG 1 e 3, considerados testes diagnósticos para os pacientes com PF e PV, o ELISA anti-DSG2 não foi considerado um bom teste diagnóstico para PF e nem para PV. Este fato corrobora a hipótese de que os anticorpos anti-DSG2 provavelmente não são patogênicos nos pênfigos.

Houve correlação positiva entre autoanticorpos anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo PF e tendência para correlação positiva entre anti-DSG3 e anti-DSG2 no grupo PV, favorecendo a possibilidade de que os anticorpos anti-DSG2 teriam algum envolvimento na patogênese dos pênfigos. Porém, a correlação entre os títulos dos anticorpos anti-DSG2 e anti-DSG1 no PF foi fraca, o que reduz sua importância clínica; além disso, quando utilizados apenas os pacientes virgens de tratamento, não houve correlação entre os títulos dos autoanticorpos.

A correlação positiva entre os títulos de anti-DSG2 e a idade no grupo PF poderia ser explicada pelo aumento da produção de autoanticorpos nos idosos (VADASZ et al., 2013). Apesar do PF acometer adultos jovens, trata-se de uma doença crônica e a coleta de soro neste trabalho foi realizada em diferentes estágios da doença, por isso alguns pacientes com tempo de doença longo tiveram a coleta de soro feita com idades mais elevadas. No entanto, foi uma correlação fraca e encontrada apenas no grupo PF, e não no PV, familiares e controles saudáveis.

Os níveis mais elevados de anti-DSG2 no gênero masculino do grupo PF poderiam estar associados a outro fator, como o tabagismo. No Brasil, o tabagismo é mais

prevalente no gênero masculino (MIRRA; ANTUNES, 2010), e tem sido associado à piora de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, doença de Graves e doença de Crohn (CARVALHO, JOZELIO FREIRE; PEREIRA, ROSA MARIA RODRIGUES; SHOENFELD, 2009). Entretanto, fumar tem sido associado com proteção contra pênfigo (KRIDIN, 2018; LAI et al., 2018) e portanto não justifica os níveis mais elevados de anti-DSG2 e gênero masculino.

A tendência à correlação negativa entre os títulos de anti-DSG2 e a duração da doença nos pacientes com PV também nos leva a pensar que a produção destes anticorpos não ocorre pelo mecanismo de *epitope-spreading*, já que com o decorrer da doença mais antígenos DSG2 seriam expostos na vigência do processo inflamatório, e esperaríamos maiores títulos de anti-DSG2 (DIDONA; DI ZENZO, 2018).

Os valores de anti-DSG2 foram menores no grupo Tratamento em comparação com o Sem tratamento (em atividade) no PV. Este dado indica que o tratamento imunossupressor pode interferir na produção dos autoanticorpos anti-DSG2, e isso pode ter ocorrido apenas nos pacientes com PV, pois a DSG2 está localizada nas camadas inferiores da epiderme, guardando relação com a DSG3 (CIRILLO, 2014).

Pensando na atividade da doença, não houve diferença entre os títulos de anticorpos anti-DSG2 nos subgrupos com a doença em atividade e nos subgrupos sem atividade da doença, para os pacientes com PF e PV; ao contrário dos títulos de anti-DSG1 e anti-DSG3, que foram maiores nos subgrupos com a doença ativa em relação aos subgrupos sem atividade da doença no PF e PV, respectivamente. Mais uma vez este fato reforça a não patogenicidade dos anticorpos anti-DSG2 isoladamente nos pênfigos e corrobora com os dados da literatura que mostram associação dos títulos de anti-DSG1 e 3 com a gravidade nos pênfigos (BELLONI-FORTINA et al., 2009; HARMAN et al., 2001).

Os valores de anti-DSG2 não mostraram correlação com a forma clínica da doença nos pacientes com PF e PV sem tratamento. Para os anticorpos anti-DSG1, no grupo PF, os títulos foram maiores nos pacientes com a forma generalizada da doença em relação à localizada, e no grupo PV houve tendência a maiores títulos nos pacientes com a forma muco-cutânea em relação àqueles com a forma mucosa exclusiva, conforme descrito na literatura. Não mostramos diferença nos títulos de anti-DSG3, nos pacientes com PV, entre as formas clínicas mucosa exclusiva, cutânea exclusiva e muco-cutânea, porém o tamanho amostral do subgrupo com a forma cutânea exclusiva é pequeno, o que pode ter prejudicado a análise estatística (HAMMERS; STANLEY, 2016; KASPERKIEWICZ et al., 2017; POLLMANN et al., 2018). Mais uma vez esta diferença no comportamento dos anticorpos anti-DSG2 em relação aos anticorpos anti-DSG 1 e 3 nos leva a concluir que provavelmente os autoanticorpos anti-DSG2 isolados não são patogênicos.

Nossos resultados concordam com os de Flores et al. (FLORES et al., 2012), que também demonstraram valores maiores de anti-DSG2 (resultados mostrados em index) em pacientes brasileiros com PF quando comparados aos controles saudáveis de área endêmica. Os anticorpos anti-DSG2 estiveram presentes acima do valor de *cut-off* em 40% de 106 pacientes com PF, em 20% dos 106 controles saudáveis de área endêmica e em 5% dos 106 controles saudáveis de área não endêmica. Nosso estudo mostrou valores de anti-DSG2 acima do *cut-off* em 63,9% dos pacientes com PF e em 27,2% nos controles de área endêmica, porém nosso estudo determinou o *cut-off* baseado no melhor ponto de especificidade e sensibilidade da curva ROC e no trabalho do grupo de Flores et al o *cut-off* foi determinado considerando especificidade de 95% na curva ROC. Além disso, esses autores também evidenciaram correlação de Spearman positiva significativa ($r=0,63$, $p<0,01$) entre os valores de anti-DSG1 e anti-DSG2 no grupo PF brasileiro, o que

concorda com nossos resultados ($r=0,163$, $p=0,02$), com força de associação maior. Diferente do nosso estudo, no qual usamos anticorpo monoclonal anti-DSG2, eles usaram subclone de um ectodomínio de DSG2 em um vetor de expressão de baculovírus para revestir as placas de ELISA.

Nosso estudo, assim como o de Flores et al.(FLORES et al., 2012), foi realizado em área endêmica para pênfigo foliáceo, o qual tem o fator ambiental bem documentado em sua patogênese (TAVAKOLPOUR, 2017; VERNAL et al., 2017). Então seria a produção dos anticorpos anti-DSG2 induzidos por um gatilho ambiental? Os indivíduos que tiveram anti-Dsg2 aumentada poderiam ter tido a picada de um inseto como gatilho para a produção dos anticorpos. Porém, por que isso ocorreu de forma tão mais intensa nos pacientes com PF e PV e nos familiares de PV e não nos demais grupos que também habitam esta região? Poderia haver nestes grupos algum alelo HLA de susceptibilidade, entretanto, isto não explica o fato dos familiares de PV, que não desenvolveram a doença, também terem os títulos de anti-Dsg2 tão elevados. É conhecida a expressão da DSG2 em outros tecidos além da pele (AMAGAI; STANLEY, 2012; HARTLIEB et al., 2013; SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994) e os auto-anticorpos anti-DSG2 poderiam estar circulantes provenientes de outros tecidos, o que ajudaria a explicar seus altos títulos nos FPV, porém, o fato de seus valores estarem maiores nos pacientes com pênfigo em relação ao grupo CTL leva a pensar que há alguma associação destes anticorpos com a doença. Ainda, corroborando para que os anticorpos anti-DSG2 não sejam patogênicos, excetuando-se o esôfago no PV (COELHO et al., 1997), não se evidencia comprometimento de órgãos internos nos pênfigos.

Além disso, nossos resultados mostraram, no grupo controle, 3,5% de soropositividade para anti-DSG1 e 2,6% de soropositividade para anti-DSG3 no ELISA.

Nos pacientes com pênfigos em remissão, no grupo PF houve 50% de positividade para anti-DSG1 e 8,3% de positividade para anti-DSG3 e no grupo PV houve 0% de positividade para anti-DSG1 e 57,14% de positividade para anti-DSG3. Há também descrição na literatura de produção de anti-DSG 1 e 3 na população normal e em pacientes com pênfigos há anos em remissão (HILARIO-VARGAS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2016; SIMON J.P. WARREN et al., 2000), o que nos faz pensar que a presença de anticorpos anti-DSG2 em familiares e controles também não exclui a possibilidade desses anticorpos participarem da patogênese dos pênfigos. Porém nos chama a atenção o fato da soropositividade de anti-DSG2 no grupo controle (27,2%) ser bastante superior às DSGs 1 e 3, sendo um indicativo contra a patogenicidade destes anticorpos nos pênfigos. Portanto, não afastamos a possibilidade dos anticorpos anti-DSG2 terem baixa patogenicidade isoladamente, mas associados a outros anticorpos com maior patogenicidade, participarem da patogênese dos pênfigos de acordo com a hipótese da “Supercompensação”(SINHA; SAJDA, 2018); isto poderia não ter ocorrido nos grupos de familiares e controles saudáveis com anti-DSG2 presentes no soro pois eles não têm outros auto-anticorpos atuando sinergicamente.

Nas dermatoses bolhosas autoimunes, a resposta inflamatória, desencadeada pelo dano cutâneo, pode expor moléculas de coesão entre os KC, anteriormente não apresentadas ao sistema imune próprio (como proteínas transmembrana ou intracelulares) (CORNABY et al., 2015). No PV, a produção posterior de anti-DSG1, a partir do reconhecimento inicial da DSG3 (RUOCCO et al., 2013), sugere o fenômeno de *epitope-spreading* (ES). Do mesmo modo, o reconhecimento imune inicial do domínio EC5 da DSG1, em indivíduos saudáveis da área endêmica para PF, representa o epítipo inicial para produzir anticorpos patogênicos contra o domínio EC1/EC2 em indivíduos

geneticamente predispostos (LI et al., 2003). Assim, anticorpos contra a DSG2 poderiam ser produzidos secundariamente, por fenômeno de *epitope-spreading*. Esta hipótese seria possível pela homologia genética entre as DSGs (FRANK et al., 2001) e seria mais plausível no PV, visto que a DSG2 e a DSG3 são mais expressas nas camadas inferiores da epiderme. Ainda, pacientes com PV apresentaram títulos de anti-DSG2 mais elevados antecedendo o início do tratamento imunossupressor. No entanto, pacientes com PF e PV apresentaram títulos semelhantes de anti-DSG2, assim como o grupo FPV. Retornaremos a essa discussão após considerarmos os resultados de IHQ.

O peptídeo DSG2 foi proposto como um potencial marcador de tumores epiteliais cutâneos, a partir de estudo com Imunofluorescência comparando a expressão da DSG2 na epiderme normal bem diferenciada, na camada basal e no folículo piloso (tecidos normais), com a expressão em tecidos com tumores cutâneos: carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinomas glandulares (sebáceo e sudoríparo), fibrossarcoma e melanoma. Houve expressão intensa da DSG2 nos tumores cutâneos epiteliais, assim como no folículo piloso e não houve fluorescência emitida no epitélio normal diferenciado, no fibrossarcoma e no melanoma (BRENNAN; MAHONEY, 2009; SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994). Além disso, a DSG2 atua na ativação de vias de sinalização celular em linhagens de células cancerígenas, como mostrado em estudo com ratos transgênicos com overexpressão de DSG2 nas camadas diferenciadas da epiderme, sob controle do gene promotor involucrina (Inv-DSG2). Este estudo descreveu que o rato transgênico com Inv-DSG2 exibiu hiperplasia epitelial, aumento da proliferação celular e resistência a apoptose, associada à ativação de diversas vias de sinalização celular (BRENNAN et al., 2007). Wang et al. descreveram a liberação de peptídeo DSG2 (concentração inicial menor que 5 ng/mL) no sobrenadante de cultura de células de

tumores epiteliais e em soro de ratos com tumores de xenoinxerto humano (concentração inicial variou de 10 a 20 ng/mL), potencializado por alguns adenovírus humanos, provavelmente pela ativação de sinalização intracelular (WANG et al., 2011, 2015). No presente trabalho, procuramos pelo peptídeo DSG2 no soro de pacientes com pênfigo (mediana da concentração de 0,45 ng/mL) e controles saudáveis (mediana da concentração de 0,33 ng/mL), sem diferença estatística entre os pacientes com PF, PV ou controles. Consultando a literatura, este é o primeiro estudo que mostra o peptídeo DSG2 circulante em pacientes com pênfigo. Mais estudos serão necessários para garantir conclusões confiáveis, porém o fato de não haver diferenças entre os grupos de pacientes e controles é mais um indício de que a DSG2 não tem participação na patogênese dos pênfigos. Ainda, por se tratar de proteína presente em inúmeros tecidos do organismo, não é possível afirmar que o peptídeo DSG2 encontrado seja proveniente da pele. Isso pode ser reforçado por trabalho que mostrou a presença de DSG2 circulante em pacientes com cisto pancreático benigno (concentração média próxima de 0,5 ng/mL) e em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (concentração média de 1 ng/mL) (KOSANAM et al., 2013).

A precisão do IB e do ELISA pode variar devido às técnicas em si, e também por variações nos alvos (como interações conformacionais e antígenos-anticorpos). Assim, o IB foi realizado para avaliação adicional da presença sérica de anti-DSG2. Em relação às amostras de soro de pacientes com pênfigo com títulos acima do *cut-off* de anti-DSG1 (160 kDa) e anti-DSG2 (150 kDa) no ELISA, não foi possível distinguir duas bandas independentes no ensaio de IB, o que poderia ser explicado pelo peso molecular muito próximo entre os dois peptídeos (10 kDa). No IB, a banda de 150kDa (DSG2) foi reconhecida presumivelmente, quando não sabemos se foi reconhecida a banda de 150 ou

160 kDa, por 42,8% das amostras de pacientes com PF. Neste grupo de pacientes o ELISA anti-DSG2 foi positivo em 85,7% das amostras. No grupo PV, o reconhecimento da DSG2 ocorreu presumivelmente por 14,3%, sendo o ELISA anti-DSG2 positivo em 100% das amostras. No grupo FPF, houve reconhecimento presumido da DSG2 por 0% das amostras e no grupo FPV por 80% das amostras. Nestes grupos o ELISA anti-DSG2 foi positivo em 40% das amostras de FPF e 100% das amostras de FPV. No grupo controle houve reconhecimento presumido da DSG2 por 50% das amostras no IB e o ELISA anti-DSG2 foi positivo em 25%. Isso mostra que o IB e ELISA são técnicas diferentes e podem apresentar resultados distintos. Condições mais apropriadas para separação de proteínas com diferença de peso molecular menor que 10 kDa serão necessários para melhor avaliação.

Uma vez que os pacientes com PF e PV produziram anti-DSG2, realizamos IHQ e RT-PCR buscando avaliar, respectivamente, a expressão proteica e gênica da DSG2 comparada às das DSGs 1 e 3 na pele íntegra e lesional, e também na mucosa dos pacientes com pênfigo. Esta avaliação foi demonstrativa já que o espaço amostral de pacientes biopsiados foi pequeno e, portanto, não foi possível realizar análise estatística dos resultados. Comparamos PI e PL de PF e PV com pele de abdominoplastia e LF. A ML de PV foi comparada à MI de PF.

A localização e a intensidade da expressão das desmogleínas na pele normal foram condizentes com a literatura, sendo a DSG1 expressa intercelular predominantemente nas camadas superiores da epiderme, a DSG2 presente nas porções inferiores da epiderme e a DSG3 presente intercelular principalmente nas camadas inferiores da epiderme. Nas mucosas a expressão da DSG3 foi maior que das DSGs 1 e 2 (CIRILLO, 2014). Na descrição dos fornecedores, nota-se que o anticorpo comercial anti-DSG2 utilizado se liga

na porção citoplasmática da molécula, assim como o anticorpo anti-DSG1. Já o anticorpo anti-DSG3 se liga na porção transmembrana extracelular. Por isso observaram-se diferenças na marcação destas desmogleínas na IHQ. A DSG1 é expressa intercelular na epiderme, provavelmente porque a porção intracitoplasmática à qual o anticorpo se liga provavelmente é justaposta à membrana celular. Já a DSG2 é expressa intracitoplasmática provavelmente porque a porção à qual o anticorpo se liga é mais citoplasmática, porém esta informação não foi descrita pelo fabricante. A DSG3 é expressa intercelular na epiderme, compatível com a informação de que este anticorpo se liga na porção transmembrana extracelular da molécula. As técnicas foram padronizadas no laboratório e podem ser utilizadas com número maior de pacientes em trabalhos futuros.

Está bem descrito que mutações no gene DSG2 estão associadas à cardiomiopatia dilatada arritmogênica ventricular direita, provavelmente por causarem perda da função de adesão celular (KANT et al., 2015). Além disso, existem inúmeros relatos da associação entre a expressão da DSG2 e alguns tipos de neoplasias em seres humanos, mas o papel da DSG2 no desenvolvimento ou proteção desses tumores não é claro. Como exemplo, segundo alguns estudos, a expressão da DSG2 é reduzida em cânceres gástricos tipo difuso (por IHQ) (YASHIRO; NISHIOKA; HIRAKAWA, 2006), próstata (por imunofluorescência e RT-PCR) (BARBER et al., 2014) e câncer de pâncreas (cultura celular, *immunoblotting*, *arrays*) (HÜTZ et al., 2017). Em contraste, é relatado aumento da expressão da DSG2 em câncer de pulmão não pequenas células (por RT-PCR, *immunoblotting*, IHQ e cultura de células) (CAI et al., 2017), bem como em carcinomas escamosos e basocelulares cutâneos (por IHQ) (BRENNAN; MAHONEY, 2009). Neste trabalho com tumores epiteliais cutâneos os tecidos normais perilesionais mostraram expressão proteica da DSG2 na camada basal, assim como nosso trabalho.

No pêfingo, o papel da DSG2 é pouco discutido na literatura. Iwatsuki et al., compararam o padrão de expressão das diferentes isoformas de desmogleína na pele lesional e perilesional de pacientes com pêfingo foliáceo, pêfingo vulgar e pêfingo vegetante. Observou-se por imunofluorescência e microscopia eletrônica, a internalização das DSGs 1 e 3 (presença de grânulos intracitoplasmáticos na camada basal e espinhosa no PV, e na camada basal até camadas superiores no PF) nos diferentes tipos de pêfingo, o que foi demonstrado também *in vitro* em cultura celular com linhagens de queratinócitos humanos normais e soro de pacientes com pêfingo. A presença dos grânulos não foi demonstrada nas biopsias de epiderme normal. Demonstraram também indução da expressão da DSG2 (sem a descrição da formação de grânulos) nas camadas inferiores da epiderme nos pacientes com PF e PV para compensar a depleção das DSGs 1 e 3 (IWATSUKI et al., 1999). Além disso, Moll et al. demonstraram forte expressão de DSG2 em um modelo de cultura de órgãos de pele criada para estudar a cicatrização epitelial (MOLL et al., 1999). Usando camundongos transgênicos com superexpressão de DSG2, Brennan et al. demonstraram que a superexpressão de DSG2 restringiu a formação de bolhas epidérmicas induzidas por anticorpos anti-DSG1 do grupo PF nesses animais, comparados a ratos neonatos com expressão normal de desmogleínas (BRENNAN et al., 2007, 2010). Hartlieb et al. demonstraram que a DSG2 contribui menos do que a DSG3 para a coesão dos queratinócitos e que a DSG2 compensou a perda de função da DSG3 (HARTLIEB et al., 2013, 2014). Também foi demonstrado, através de estudo com camundongos transgênicos, que a DSG2 participa da ativação de vias de sinalização intracelular pró-crescimento e divisão celular, após trauma, que podem potencializar o reparo tecidual (COOPER et al., 2019). Mais recentemente, Sigmund et al. demonstraram que a DSG2 faz ligação heterofílica com a DSG3 e pode minimizar a perda de adesão

entre os queratinócitos no processo de acantólise (SIGMUND et al., 2020). Nosso estudo também mostrou expressão proteica da DSG2, por IHQ, maior na PI e PL e na ML da maioria dos pacientes com PF e PV em relação à pele normal de abdominoplastia e mucosa normal de PF. Isto nos leva a pensar que a DSG2 poderia estar mais expressa para compensar a perda das DSGs 1 e 3 nos pacientes com pênfigos e ter papel na reparação dos tecidos lesados destes pacientes. Comparando as peles íntegras com as lesionais dos pacientes com PF e PV, a expressão da DSG2 foi maior nos tecidos íntegros e, portanto, o processo de reparação tecidual deve ter início no tecido íntegro perilesional. A expressão aumentada da DSG2 em todas as camadas da epiderme nestes pacientes poderia levar à produção de auto-anticorpos anti-DSG2 por *epitope-spreading*.

Outros estudos anteriores e subsequentes ao de Iwatsuki et al. demonstraram a presença de grânulos contendo DSG 1 e 3 na epiderme lesional e perilesional de pacientes com pênfigos foliáceo e vulgar, levando à constatação de que um dos mecanismos de acantólise nos pênfigos é através da internalização das desmogleínas da região não desmossomal, provavelmente por endocitose, podendo levar à depleção destas moléculas da região desmossomal (CALKINS et al., 2006; JENNINGS et al., 2011; OKTARINA et al., 2011, 2019). Nosso trabalho mostrou a presença de grânulos de DSG1 intercelulares e/ou intracitoplasmáticos na pele lesional dos pacientes com PF, e não presentes na pele normal, compatível com a literatura (BURGE et al., 1993; CARLOTTI et al., 1993; STEEVES et al., 2002). Na mucosa lesional de dois dos três pacientes com PV também foi observada a presença de grânulos intracitoplasmáticos de DSG3, condizente com a literatura porém menos evidentes (DELVA et al., 2008; HEUPEL et al., 2008; JOLLY et al., 2010; SCHLÖGL et al., 2018). A detecção destes grânulos, nos pacientes com PV, foi mais difícil e mais discreta, provavelmente porque a região na qual os grânulos estão

mais presentes é a porção inferior da epiderme, no local da acantólise, portanto um tecido com a histologia mais danificada.

Não encontramos nenhum estudo na literatura que mostrasse a presença de grânulos de DSG2 nas amostras histológicas de pacientes com pênfigo. Ainda, para justificar a ausência de grânulos, um estudo mostrou que na estrutura da DSG2, na região C-terminal, a chamada *Desmoglein Unique Region* (DUR) é mais longa que a das demais desmogleínas, e é capaz de aumentar a força de adesão celular e estabilizar a DSG2 na superfície da célula, inibindo sua internalização. Na cardiomiopatia ventricular direita arritmogênica mostrou-se haver uma mutação na DUR da DSG2, levando à perda da interação e endocitose desta desmogleína nas células musculares cardíacas (CHEN et al., 2012). Nosso estudo não demonstrou a presença de grânulos como sinal da internalização da DSG2 nas biópsias de pele normal, e de pele íntegra e lesional de pacientes com pênfigo foliáceo e vulgar, o que condiz com a literatura e indica que a DSG2 provavelmente não tem papel patogênico nos pênfigos.

A expressão gênica da DSG2, em nosso estudo, também foi menor em relação às DSGs 1 e 3 tanto na pele normal de LF quanto na PI e PL dos pacientes com PF e PV e na ML dos pacientes com PV.

Avaliando a expressão gênica da DSG2, nas amostras de MI e ML, em geral a expressão foi maior que nas amostras de pele de LF e nas amostras de PI e PL dos pacientes com PF e PV, provavelmente porque as mucosas estão mais expostas a traumas e a DSG2 pode atuar na reparação tecidual (COOPER et al., 2019; MOLL et al., 1999). Também na pele normal de *lifting* houve expressão da DSG2 maior que nos pacientes, e isso pode ter ocorrido pois a pele é de couro cabeludo, a qual contém mais folículos

pilosos que sabidamente expressam mais a DSG2 (HARTLIEB et al., 2014; SCHÄFER; KOCH; FRANKE, 1994).

A expressão gênica da DSG3 foi maior que das demais, seguida pela expressão das DSGs 1 e 2, tanto na pele de LF quanto na maioria das amostras de PI e PL dos pacientes com PF e PV, e nas amostras da ML dos pacientes com PV.

Houve maior expressão gênica da DSG3 nos tecidos lesionais em relação aos íntegros. Isso poderia ser explicado pela maior necessidade de produção de DSG3 no tecido afetado, devido às perdas pela própria doença. Para a DSG1 não foi observado este achado de aumento nos tecidos lesionais para todas as amostras. A DSG1 está presente principalmente nas camadas superiores da epiderme, diferente da DSG3 que está presente na camada basal, na qual a renovação celular se inicia. Talvez esta diferença na localização das DSGs e na função de cada camada da epiderme explique o fato da expressão gênica da DSG3 já estar aumentada nos tecidos lesionais e a expressão da DSG1 ainda não estar aumentada em todas as amostras. Estudo com maior N será necessário para melhor compreensão e comprovação deste achado.

A DSG3 teve maior expressão gênica em todas as amostras de mucosa em relação às amostras de pele, o que corrobora o fato desta desmogleína ter maior expressão proteica nas mucosas, mostrado pelo nosso trabalho e compatível com a literatura (CIRILLO, 2014; SCHMIDT; KASPERKIEWICZ; JOLY, 2019).

Interessante notar também que, comparando as amostras de pele lesional dos pacientes com PF com uma amostra lesional de paciente com PV, a expressão de todas as DSGs foi menor na amostra lesional de PV, o que pode ser explicado pelo fato da acantólise ser mais inferior no PV e, portanto, pela presença de menor quantidade de epiderme nas amostras deste paciente.

Relacionando os resultados de expressão proteica com os de expressão gênica das DSGs, foi possível observar que não há associação direta entre o aumento da expressão proteica com aumento ou diminuição da expressão gênica da DSG2, já que os resultados foram variáveis para cada paciente.

A presença dos grânulos de DSG1 e/ou DSG3 nas amostras de pele e mucosa lesionais dos pacientes com PF e PV (descritas acima) não foi acompanhada por alteração semelhante da expressão gênica destas moléculas. Conforme descrito acima, de acordo com a literatura, a internalização das DSGs 1 e 3 acaba levando à depleção destas moléculas na região desmossomal (CALKINS et al., 2006; JENNINGS et al., 2011; OKTARINA et al., 2011, 2019), porém, no presente estudo, houve discordância, em algumas amostras, a expressão gênica das DSGs 1 e 3 foi aumentada no tecido lesional em relação ao íntegro, e em outros, diminuída. Estudos com mais amostras serão necessários para melhor avaliação deste achado.

Por fim, temos três fatos que afastam a patogenicidade isolada da DSG2 nos pênfigos:

1. anti-DSG2 estão presentes nos controles e familiares saudáveis;
2. anti-DSG2 não mostrou associação com atividade da doença nem com a forma clínica da doença para pacientes com PF e PV;
3. a falta de internalização da DSG2 pode ser indício de não participação na acantólise.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, de acordo com os objetivos:

- (i) Autoanticorpos contra DSG2 estão presentes em amostras do soro de pacientes com PF e PV, seus familiares e controles saudáveis. Nossos dados sustentam que estes anticorpos anti-DSG2 não são patogênicos isoladamente, uma vez que o grupo FPV apresentou títulos de anti-DSG2 semelhantes em comparação aos pacientes com PF e PV; e não houve associação entre os títulos de anti-DSG2 e a atividade dos pênfigos ou a forma clínica da doença. O papel específico desses autoanticorpos necessita de maior esclarecimento, o que contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos de acantólise.
- (ii) Os níveis mais elevados de anti-DSG2 encontrados no gênero masculino do grupo PF, bem como a correlação positiva entre os títulos de anti-DSG2 e a idade no grupo PF devem ser justificados por outros fatores que não o pênfigo, e mais estudos serão necessários para melhor esclarecimento destes achados. O tratamento imunossupressor diminuiu a produção dos autoanticorpos anti-DSG2, e isso pode ter ocorrido apenas nos pacientes com PV e não com PF pois a DSG2 está localizada na epiderme na mesma região (camadas inferiores) que a DSG3.
- (iii) *Immunoblotting* e ELISA são técnicas diferentes usadas para detecção da ligação antígeno-anticorpo, e que podem ter resultados distintos.
- (iv) Peptídeo DSG2 está presente no soro tanto de pacientes com pênfigos como no de controles e, portanto, sua presença não tem associação com os pênfigos e necessita de mais estudos para ser explicada.
- (v) A expressão proteica aumentada da DSG2 nos tecidos dos pacientes com PF e PV em relação à pele normal pode ter ocorrido para auxiliar na reparação tecidual. Não foram demonstrados sinais da internalização da DSG2 nas biópsias de pele íntegra e lesional de

pacientes com PF e PV comparadas a pele normal controle, o que indica que a DSG2 não participa da acantólise e não tem papel patogênico nos pênfigos.

(vi) A expressão gênica da DSG2 foi menor que a das demais desmogleínas nas amostras de pele íntegra e lesional dos pacientes com PF e PV e nas amostras da mucosa lesional dos pacientes com PV, condizente com a menor participação da DSG2 na manutenção da integridade da epiderme. A DSG3 foi mais expressa nas mucosas em relação às demais desmogleínas, justificando sua maior expressão proteica neste tecido; e mais expressa em todas as peles lesadas em relação às íntegras, provavelmente pela maior necessidade de produção desta proteína no local de atividade da doença.

Como conclusão final, os autoanticorpos anti-DSG2 isolados não são patogênicos nos pênfigos.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Devido ao modelo retrospectivo do estudo realizado, alguns dados demográficos e clínicos não puderam ser obtidos, por falta de anotação nos prontuários médicos. Para alguns pacientes com pênfigo, foi difícil definir a duração exata da doença no momento da coleta do soro, seja por falta de registros no prontuário, seja pelo esquecimento dos pacientes devido à cronicidade da doença. Além disso, os pacientes foram testados em diferentes estágios da doença (em tratamento, sem tratamento, nunca tratados e em remissão), dificultando a homogeneização dos achados. Porém, esses grupos foram analisados separadamente.

Não há ELISA anti-DSG2 comercial e, conseqüentemente, não existe um *cut-off* pré-definido. Curvas ROC foram realizadas utilizando amostras do soro de controles e soro dos pacientes, separando ou não os pacientes com PF e PV. Como o valor de anti-DSG2 não é patognomônico de nenhuma doença ou diagnóstico em pênfigo, não haviam verdadeiros negativos ou positivos, e portanto, a definição do melhor *cut-off* não foi baseada em curva ROC com alto valor de área sob a curva e conseqüentemente com altos valores de sensibilidade e especificidade.

A diferença muito pequena (10 kDa) entre a banda de detecção da DSG1 e da DSG2 no ensaio IB não nos permitiu diferenciar estes dois anticorpos circulantes ao mesmo tempo usando esta técnica.

No presente estudo, as biópsias foram realizadas em regiões diferentes da pele dos pacientes, de acordo com os locais das lesões ativas de pênfigo, e isso dificultou a comparação dos resultados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÉU-VÉLEZ, A. M. et al. Endemic pemphigus over a century: Part II. **North American journal of medical sciences**, v. 2, n. 3, p. 114–25, mar. 2010.
- AHMED, A. R. et al. Monopathogenic vs multipathogenic explanations of pemphigus pathophysiology. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 11, p. 839–846, nov. 2016.
- 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. 291–298, 15 maio 2015.
- AMAGAI, M.; STANLEY, J. R. Desmoglein as a Target in Skin Disease and Beyond. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 776–784, mar. 2012.
- AMBER, K. T.; VALDEBRAN, M.; GRANDO, S. A. Non-Desmoglein Antibodies in Patients With Pemphigus Vulgaris. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. June, p. 1190, 2018.
- ANDREASSON, U. et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. **Frontiers in Neurology**, v. 6, n. Aug, p. 1–8, 19 ago. 2015.
- BARBER, A. G. et al. Characterization of Desmoglein Expression in the Normal Prostatic Gland. Desmoglein 2 Is an Independent Prognostic Factor for Aggressive Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98786, 4 jun. 2014.
- BELLONI-FORTINA, A. et al. Detection of Autoantibodies against Recombinant Desmoglein 1 and 3 Molecules in Patients with Pemphigus vulgaris: Correlation with Disease Extent at the Time of Diagnosis and during Follow-Up. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2009, p. 1–6, 2009.
- BRENNAN, D. et al. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 5, p. 758–771, 2007.

BRENNAN, D. et al. Superficial Dsg2 Expression Limits Epidermal Blister Formation Mediated by Pemphigus Foliaceus Antibodies and Exfoliative Toxins. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, n. 1, p. 1–10, 2010.

BRENNAN, D.; MAHONEY, M. G. Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas. **Cell Adhesion & Migration**, v. 3, n. 2, p. 148–154, 27 abr. 2009.

BRENNER, S.; GOLDBERG, I. Drug-induced pemphigus. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 455–457, jul. 2011.

BROCHADO, M. J. F. et al. Differential HLA class I and class II associations in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris patients from a prevalent Southeastern Brazilian region. **Journal of Autoimmunity**, v. 72, p. 19–24, 2016.

BURGE, S. M. et al. An immunohistological study of desmosomal components in pemphigus. **British Journal of Dermatology**, v. 7, n. 128, p. 363–370, 1993.

CAI, F. et al. Desmoglein-2 is overexpressed in non-small cell lung cancer tissues and its knockdown suppresses NSCLC growth by regulation of p27 and CDK2. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 1, p. 59–69, 14 jan. 2017.

CALKINS, C. C. et al. Desmoglein Endocytosis and Desmosome Disassembly Are Coordinated Responses to Pemphigus Autoantibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7623–7634, 17 mar. 2006.

CARLOTTI, A. et al. Autoimmune Pemphigus. A Distinct Staining Pattern With an Anti-Desmoglein Antibody. **Arch Dermatol**, n. 129, p. 596–599, 1993.

CARVALHO, JOZELIO FREIRE; PEREIRA, ROSA MARIA RODRIGUES; SHOENFELD, Y. . The mosaic of autoimmunity: the role of environmental factors. **Annals of Neurology**, p. 501–509, 2009.

CELENTANO, A.; CIRILLO, N. Desmosomes in disease: a guide for clinicians. **Oral**

Diseases, v. 23, n. 2, p. 157–167, mar. 2017.

CELERE, B. S. et al. Geographical foci and epidemiological changes of pemphigus vulgaris in four decades in Southeastern Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 12, p. 1494–1496, dez. 2017a.

CELERE, B. S. et al. Spatial Distribution of Pemphigus Occurrence over Five Decades in Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1737–1745, 6 dez. 2017b.

CHEN, J. et al. The C-terminal unique region of desmoglein 2 inhibits its internalization via tail–tail interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 4, p. 699–711, 12 nov. 2012.

CHEN, J.; DEN, Z.; KOCH, P. J. Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 17, p. 2844–2849, 1 set. 2008.

CHEN, Y. et al. Critical Role of the Neonatal Fc Receptor (FcRn) in the Pathogenic Action of Antimitochondrial Autoantibodies Synergizing with Anti-desmoglein Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 39, p. 23826–23837, 25 set. 2015.

CIRILLO, N. 150th anniversary series: Desmosomes in physiology and disease. **Cell Communication & Adhesion**, v. 21, n. 2, p. 85–88, 7 abr. 2014.

COELHO, L. K. et al. Esophageal Nikolsky's Sign in Pemphigus Vulgaris. **Endoscopy**, v. 29, n. 7, p. S 35-S 35, 17 set. 1997.

COOPER, F. et al. Enhancement of cutaneous wound healing by Dsg2 augmentation of uPAR secretion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 11, p. 2470–2479, 9 maio 2019.

CORNABY, C. et al. B cell epitope spreading: Mechanisms and contribution to

autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 56–68, jan. 2015.

DELVA, E. et al. Pemphigus Vulgaris IgG-induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-independent Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18303–18313, 2008.

DENNING, M. F. et al. The Expression of Desmoglein Isoforms in Cultured Human Keratinocytes Is Regulated by Calcium, Serum, and Protein Kinase C. **Experimental Cell Research**, v. 239, n. 1, p. 50–59, fev. 1998.

DI ZENZO, G.; BORRADORI, L.; MULLER, E. J. The pathogenesis of pemphigus: Controversy vs complexity. **Experimental Dermatology**, fev. 2017.

DIDONA, D.; DI ZENZO, G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. April, p. 1–27, 17 abr. 2018.

DOWNIE, J. B.; DICOSTANZO, D. P.; COHEN, S. R. Pemphigus vegetans-Neumann variant associated with intranasal heroin abuse. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 5 Pt 2, p. 872–875, 1998.

EBERT, L. M. et al. A non-canonical role for desmoglein-2 in endothelial cells: implications for neoangiogenesis. **Angiogenesis**, v. 19, n. 4, p. 463–486, 23 out. 2016.

EGAMI, S.; YAMAGAMI, J.; AMAGAI, M. Autoimmune bullous skin diseases , pemphigus and pemphigoid. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 4, p. 1031–1047, 2020.

EGU, D. T. et al. Inhibition of p38MAPK signalling prevents epidermal blistering and alterations of desmosome structure induced by pemphigus autoantibodies in human epidermis. p. 1612–1618, 2017.

FLORES, G. et al. IgG Autoantibody Response against Keratinocyte Cadherins in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **Journal of Investigative**

Dermatology, v. 132, n. 11, p. 2573–2580, nov. 2012.

FRANCO BROCHADO, M. J. et al. Data on HLA class I/II profile in Brazilian pemphigus patients. **Data in Brief**, v. 8, p. 364–374, set. 2016.

FRANK, J. et al. Characterization of the desmosomal cadherin gene family: genomic organization of two desmoglein genes on human chromosome 18q12. **Experimental dermatology**, v. 10, n. 2, p. 90–4, abr. 2001.

GONÇALVES, G. A. P. et al. Incidência do pênfigo vulgar ultrapassa a do pênfigo foliáceo em região endêmica para pênfigo foliáceo: análise de série histórica de 21 anos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1109–1112, dez. 2011.

GRANDO, S. A. Autoimmunity to Keratinocyte Acetylcholine Receptors in Pemphigus. **Dermatology**, v. 201, n. 4, p. 290–295, 2000.

GRANDO, S. A. et al. Pemphigus : An Unfolding Story. **The Journal of investigative dermatology**, v. 117, p. 990–995, 2001.

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, 23 maio 2016.

HARMAN, K. E. et al. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. **The British journal of dermatology**, v. 144, n. 4, p. 775–80, abr. 2001.

HARTLIEB, E. et al. Desmoglein 2 Is Less Important than Desmoglein 3 for Keratinocyte Cohesion. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53739, 11 jan. 2013.

HARTLIEB, E. et al. Desmoglein 2 Compensates for Desmoglein 3 but Does Not Control Cell Adhesion via Regulation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 17043–17053, 13 jun. 2014.

HASHIMOTO T, OGAWA MM, KONOYAMA A, N. T. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigens by immunoblot analysis using different antigen sources. **The Journal of investigative dermatology**, v. 94, p. 327–331, 1990.

HEUPEL, W.-M. et al. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 3, p. 1825–34, 1 ago. 2008.

HILARIO-VARGAS, J. et al. Prevalence of Anti-Desmoglein-3 Antibodies in Endemic Regions of Fogo Selvagem in Brazil. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 9, p. 2044–2048, set. 2006.

HÜTZ, K. et al. Loss of desmoglein 2 promotes tumorigenic behavior in pancreatic cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 8, p. 1884–1895, ago. 2017.

ISHII, K. et al. Pemphigus vulgaris and foliaceus IgG autoantibodies directly block heterophilic trans-interaction between desmoglein and desmocollin. **Journal of Investigative Dermatology**, 3 mar. 2020.

ISHII, N. et al. Anti-desmocollin autoantibodies in nonclassical pemphigus. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 1, p. 59–68, jul. 2015.

IWATSUKI, K. et al. Internalization of constitutive desmogleins with the subsequent induction of desmoglein 2 in pemphigus lesions. **The British journal of dermatology**, v. 140, n. 1, p. 35–43, jan. 1999.

JENNINGS, J. M. et al. Desmosome disassembly in response to pemphigus vulgaris IgG occurs in distinct phases and can be reversed by expression of exogenous Dsg3. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 3, p. 706–718, 2011.

JOLLY, P. S. et al. p38MAPK Signaling and Desmoglein-3 Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p.

8936–8941, 2010.

KANT, S. et al. Desmoglein 2–Dependent Arrhythmogenic Cardiomyopathy Is Caused by a Loss of Adhesive Function. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, n. 4, p. 553–563, ago. 2015.

KASPERKIEWICZ, M. et al. Pemphigus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17026, 11 maio 2017.

KITAJIMA, Y. 150 th Anniversary Series: Desmosomes and Autoimmune Disease, Perspective of Dynamic Desmosome Remodeling and Its Impairments in Pemphigus. **Cell Communication & Adhesion**, v. 21, n. 6, p. 269–280, 31 dez. 2014.

KOSANAM, H. et al. LAMC2: A promising new pancreatic cancer biomarker identified by proteomic analysis of pancreatic adenocarcinoma tissues. **Molecular & Cellular Proteomics**, n. 416, 2013.

KRIDIN, K. Cigarette smoking associates inversely with a cluster of two autoimmune diseases : ulcerative colitis and pemphigus. 2018.

KRIDIN, K. et al. Autoimmune Thyroid Diseases and Thyroid Cancer in Pemphigus: A Big Data Analysis. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 159, 30 maio 2018.

KRIDIN, K.; ZELBER-SAGI, S.; BERGMAN, R. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: Differences in epidemiology and mortality. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 97, n. 9, p. 1095–1099, 2017.

LA SERRA, L. et al. Trace element profile in pemphigus foliaceus and in pemphigus vulgaris patients from Southeastern Brazil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 51, n. September 2018, p. 31–35, jan. 2019.

LAI, O. et al. Influence of cigarette smoking on pemphigus - a systematic review and pooled analysis of the literature. **Journal of the European Academy of Dermatology**

and Venereology : JEADV, 25 fev. 2018.

LESHEM, Y. A. et al. Autoimmune diseases in patients with pemphigus and their first-degree relatives. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 7, p. 827–831, jul. 2011.

LI, N. et al. The Role of Intramolecular Epitope Spreading in the Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1501–1510, 2 jun. 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. **Methods**, v. 408, p. 402–408, 2001.

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**, v. 26, n. 10, p. 966–968, out. 2017.

MAHONEY, M. G. et al. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 4, p. 461–468, 15 fev. 1999.

MARTINELLI, A. et al. Family study of monozygotic twins affected by pemphigus vulgaris. **Human Immunology**, v. 77, n. 7, p. 600–604, 2016.

MATIAS, A. B.; FERREIRA ROSELINO, A. M. Pemphigus: a disease stamped in the skin. **Our Dermatology Online**, v. 4, n. Suppl.3, p. 601–605, 12 nov. 2013.

MIRRA, A. P.; ANTUNES, L. F. Tobacco smoking and cancer in Brazil : evidence and prospects. v. 13, n. 2, p. 175–187, 2010.

MOLL, I. et al. Diversity of desmosomal proteins in regenerating epidermis: Immunohistochemical study using a human skin organ culture model. **Archives of Dermatological Research**, v. 291, n. 7–8, p. 437–446, 1999.

OHYAMA, B. et al. Epitope Spreading Is Rarely Found in Pemphigus Vulgaris by Large-Scale Longitudinal Study Using Desmoglein 2–Based Swapped Molecules. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 1158–1168, abr. 2012.

OKTARINA, D. A. M. et al. IgG-induced clustering of desmogleins 1 and 3 in skin of patients with pemphigus fits with the desmoglein nonassembly depletion hypothesis. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 3, p. 552–562, 2011.

OKTARINA, D. A. M. et al. Endocytosis of IgG, Desmoglein 1, and Plakoglobin in Pemphigus Foliaceus Patient Skin. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. November, p. 1–12, 2019.

OLIVEIRA, L. et al. Anti-Desmoglein 1 and 3 Autoantibody Levels in Endemic Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris from Brazil. **Clinical Laboratory**, v. 62, n. 07/2016, 2016.

OTA, T. et al. No involvement of IgG autoantibodies against extracellular domains of desmoglein 2 in paraneoplastic pemphigus or inflammatory bowel diseases. **Journal of dermatological science**, v. 32, n. 2, p. 137–41, ago. 2003.

PEREIRA, R. L. G. **Comparação de técnicas de ensaio de absorção imunoenzimático (ELISA) para avaliação da reatividade de anticorpos anticocaína tipo IgG em camundongos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2019.

POLLMANN, R. et al. Pemphigus: a Comprehensive Review on Pathogenesis, Clinical Presentation and Novel Therapeutic Approaches. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 1, p. 1–25, 8 fev. 2018.

RUOCCO, V. et al. Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 4, p. 374–381, jul. 2013.

RUOCCO, V.; BRENNER, S.; RUOCCO, E. Pemphigus and diet: does a link exist? **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 161–163, mar. 2001.

SAJDA, T.; SINHA, A. A. Autoantibody Signaling in Pemphigus Vulgaris: Development of an Integrated Model. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. April, p. 1–11, 19 abr. 2018.

SARDANA, K.; GARG, V. K.; AGARWAL, P. **Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms?** **British Journal of Dermatology**, 2013.

SAVCI-HEIJINK, C. D. et al. The Role of Desmoglein-3 in the Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1629–1637, 2009.

SCHÄFER, S.; KOCH, P. J.; FRANKE, W. W. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalogue of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. **Experimental Cell Research**, v. 211, n. 2, p. 391–399, abr. 1994.

SCHLÖGL, E. et al. Keratin retraction and Desmoglein3 internalization independently contribute to Dissociation in Pemphigus Vulgaris. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. April, p. 1–16, 2018.

SCHMIDT, E.; KASPERKIEWICZ, M.; JOLY, P. Pemphigus. **The Lancet**, v. 394, n. 10201, p. 882–894, set. 2019.

SHARMA, P.; MAO, X.; PAYNE, A. S. Beyond steric hindrance: The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. **Journal of Dermatological**

Science, v. 48, n. 1, p. 1–14, 1 out. 2007.

SHIRAKATA, Y. et al. Lack of Mucosal Involvement in Pemphigus Foliaceus May be Due to Low Expression of Desmoglein 1. **The Journal of investigative dermatology**, v. 110, p. 76–78, 1998.

SIGMUND, A. M. et al. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. October, p. 581370, 28 out. 2020.

SIMON J.P. WARREN et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pmphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 23–30, 2000.

SINHA, A. A.; SAJDA, T. The Evolving Story of Autoantibodies in Pemphigus Vulgaris: Development of the “Super Compensation Hypothesis”. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 218, 14 ago. 2018.

SPINDLER, V. et al. Desmosomal Cadherins and Signaling : Lessons from Autoimmune Disease Desmosomal Cadherins and Signaling : Lessons from. v. 9061, 2014.

SPINDLER, V. et al. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, 13 out. 2017.

SPINDLER, V.; WASCHKE, J. Pemphigus—A Disease of Desmosome Dysfunction Caused by Multiple Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–8, 1 fev. 2018.

STEEVES, E. et al. Altered immunohistochemical staining for desmoglein in skin biopsies in canine pemphigus foliaceus. **J Vet Diagn Invest**, v. 14, p. 53–56, 2002.

TAVAKOLPOUR, S. Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Archives of Dermatological Research**, p. 1–12, 6 nov. 2017.

VADASZ, Z. et al. Age-related autoimmunity. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

VANDERLUGT, C. J.; MILLER, S. D. Epitope spreading. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 6, p. 831–836, dez. 1996.

VERNAL, S. et al. Insights into the epidemiological link between biting flies and pemphigus foliaceus in southeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 176, n. April, p. 455–462, dez. 2017.

VODO, D.; SARIG, O.; SPRECHER, E. The genetics of Pemphigus vulgaris. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. AUG, p. 1–7, 2018.

WANG, H. et al. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. **Nature Medicine**, v. 17, n. 1, p. 96–104, 12 jan. 2011.

WANG, H. et al. Intracellular Signaling and Desmoglein 2 Shedding Triggered by Human Adenoviruses Ad3, Ad14, and Ad14P1. **Journal of Virology**, v. 89, n. 21, p. 10841–10859, 1 nov. 2015.

WILGRAM, G. F.; CAULFIELD, J. B.; LEVER, W. F. An Electron Microscopic Study of Acantholysis in Pemphigus Vulgaris*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 36, n. 5, p. 373–382, maio 1961.

YASHIRO, M.; NISHIOKA, N.; HIRAKAWA, K. Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 14, p. 2397–2403, set. 2006.

YULIS, M.; KUSTERS, D. H. M.; NUSRAT, A. Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. **The Journal of Physiology**, 2 jul. 2018.

10. ANEXOS

10.1) Parecer de aprovação do comitê de ética humano (em anexo 2 páginas)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONTRIBUIÇÃO PARA O PAPEL DA DESMOGLEÍNA 2 NA PATOGÊNESE DOS PÊNFIGOS.

Pesquisador: Marcela Calixto Brandão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56944116.1.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.639.187

Apresentação do Projeto:

Resumo: Introdução: Pênfigos são doenças bolhosas autoimunes, geneticamente determinadas, que afetam a pele e as mucosas. Enquanto o pênfigo vulgar (PV) pode acometer pele e mucosas, o pênfigo foliáceo (PF) afeta exclusivamente a pele. Pacientes com pênfigo desenvolvem anticorpos IgG contra desmogleínas (Dsg), moléculas da família das caderinas, componentes dos desmossomos, responsáveis pela adesão dos queratinócitos, com consequente formação de acantólise. Há quatro isoformas de Dsg: 1, 2, 3 e 4. As Dsg1 e 3 são exclusivas do epitélio escamoso estratificado. Pacientes com PF produzem IgG contra Dsg1, e pacientes com a forma mucosa do PV apresentam IgG anti-Dsg3, e, na forma mucocutânea, há produção de IgG anti-Dsg 1 e 3. A Dsg2 é a isoforma mais disseminada no organismo, está presente nas camadas inferiores da epiderme, porém, sua função na manutenção da integridade deste tecido ainda não foi elucidada. Temos por hipóteses: (i) Pela reação inflamatória, desencadeada pela acantólise, haveria exposição da Dsg2 pelo fenômeno de epitope spreading, acarretando a produção de anticorpos contra Dsg2; (ii) Como a acantólise no PV é suprabasal – coincidente com a região de maior expressão da Dsg2 – espera-se que esse fenômeno de possível exposição antigênica seja mais pronunciado no PV, em relação ao PF; (iii) Ainda, indaga-se se a expressão da Dsg2 é semelhante na pele, e na mucosa

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.639.187

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o Projeto de pesquisa Versão 2 – 04/07/2016 e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2-04/07/2016 podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_691746.pdf	05/07/2016 07:39:03		Aceito
Cronograma	Cronograma_das_atividades_04_07_2016.pdf	04/07/2016 23:11:20	Marcela Calixto Brandão	Aceito
Outros	Resposta_Parecer.pdf	04/07/2016 23:08:10	Marcela Calixto Brandão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Marcela_04_07_16.pdf	04/07/2016 23:07:05	Marcela Calixto Brandão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_04_07_2016.pdf	04/07/2016 23:06:42	Marcela Calixto Brandão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCLE_Marcela.pdf	08/06/2016 16:31:32	Marcela Calixto Brandão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_PARA_BIORREPOSITORIO.pdf	08/06/2016 09:36:04	Marcela Calixto Brandão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Solicitacao_criacao_Biorrepositorio_pag 2.pdf	08/06/2016 09:34:27	Marcela Calixto Brandão	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

10.2) Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

SETOR DE DERMATOLOGIA HCFMRP-USP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

PROJETO: Contribuição para o Papel da Desmogleína 2 na Patogênese dos Pênfigos

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino e doutoranda Marcela Calixto Brandão.

A equipe de profissionais e pesquisadores 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 aos Pênfigos, doenças geneticamente determinadas, auto-imunes, não transmissível entre pessoas. É conhecido que o organismo do doente forma anticorpos (que normalmente fazem a defesa do nosso organismo contra vírus e bactérias) que passam a atacar a pele e/ou mucosas. Fatores ambientais tem participação no surgimento da doença, mas ainda há muito que se conhecer sobre esta doença.

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 Pênfigo Foliáceo e Pênfigo Vulgar. Desta forma, estamos iniciando uma pesquisa para investigar a participação da desmogleína 2 no desenvolvimento da doença.

As pessoas que participarem deste estudo responderão a um questionário, serão submetidas à coleta de aproximadamente 20 mL de sangue para dosagem de anticorpos e/ou moléculas de DNA, e se estiverem sem tratamento, serão submetidas a biópsia de pele e/ou mucosa. Os indivíduos saudáveis que forem participar da pesquisa como grupo controle serão submetidas à coleta de aproximadamente 20 mL de sangue para dosagem de anticorpos e/ou moléculas de DNA. A criação de um grupo controle é importante em pesquisa, para haver comparação dos resultados em indivíduos com e sem a doença. A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e/ou a biópsia de pele poderá causar dor e pequena reação no local. Este material será guardado em um freezer no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, identificado por um número, de forma a garantir o sigilo de sua identidade. Os resultados serão confidenciais e não terão influência sobre sua medicação ou modificação de seu tratamento. Conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa, o senhor(a) terá direito a indenização. A coleta irá ocorrer na data e horário que vier para a consulta, para que não tenha nenhum gasto extra com transporte ou alimentação.

A participação nesta pesquisa é voluntária, e você participa somente se quiser. Sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo pelos contatos abaixo. A qualquer momento, você poderá desistir da participação na pesquisa e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo a você. 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 e fotos clínicas ficam a 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.

Nome do participante: _____ assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador: _____ assinatura: _____ data: _____

Pesquisadores responsáveis: Marcela Calixto Brandão / Dra Ana Maria Ferreira Roselino

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

Telefone do pesquisador responsável: (016) 3602-2894

E-mail: marcela-calixtobrandao@usp.br

Versão 2 – 04/07/2016

10.3) Manuscrito submetido a publicação

Artigo de Investigação - Anais Brasileiros de Dermatologia

Título:

Autoanticorpos contra desmogleína 2 não são patogênicos nos pênfigos

Marcela Calixto Brandão Miguel, MD¹; Tamiris Amanda Julio, PhD²; Sebastian Vernal, MD, PhD²; Natália Aparecida de Paula, PhD²; Aline Turatti, PhD²; Andre Lieber, MD, PhD²; Ana Maria Roselino, MD, PhD^{1*}

¹Divisão de Dermatologia, Departamento de Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

²Division of Medical Genetics, Department of Pathology, University of Washington, 1705 NE Pacific Street, Seattle, WA 98195, USA.

Autor correspondente. Ana Maria Roselino, MD. Divisão de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900. Monte Alegre. 14049-900 - Ribeirão Preto, SP - Brasil. Fax: +55 16 36021522. E-mail: amfrosel@fmrp.usp.br

Financiamento: O estudo foi parcialmente financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (# 2010 / 51729-2) e FAEPA (Fundação de

Apoio ao Ensino, Assistência e Pesquisa). TJ recebeu bolsa de doutorado da FAPESP (# 2016 / 09011-3) e SV recebeu bolsa de doutorado da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Conflitos de interesse: Todos os autores declararam não haver nenhum conflito de interesse.

Resumo 246 palavras (250)

Texto 3790 words (5000)

Tabelas: 2

Figuras: 5

Tabelas suplementares: 3

Figuras suplementares: 3

RESUMO

Introdução: Autoanticorpos anti-desmogleínas 1 e 3 justificam a acantólise nos pênfigos, porém, a patogênese da desmogleína 2 é hipotética.

Objetivo: Comparar a participação das desmogleínas 1, 2 e 3 pela produção de autoanticorpos séricos, e expressões proteica e gênica na pele/mucosa de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar.

Métodos: Autoanticorpos foram titulados por ELISA em 202 amostras de pênfigo foliáceo, 131 de pênfigo vulgar, 50 e 57 familiares de pênfigo foliáceo e de pênfigo vulgar, respectivamente, e 114 controles. Expressões proteica e gênica foram

determinadas por imuno-histoquímica e qPCR na pele/mucosa de 3 pacientes com pênfigo foliáceo e 3 com pênfigo vulgar.

Resultados: Títulos (densidade óptica) maiores de anti-desmogleína 2 resultaram no pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, comparados aos controles (0,166; 0,180; 0,102; respectivamente; $P < 0,0001$). Houve correlação entre títulos de anti-desmogleína 2 e anti-desmogleína 1 no pênfigo foliáceo ($r = 0,1680$; $P = 0,0206$). Autoanticorpos anti-desmogleína 2 não apresentaram reação cruzada com as desmogleínas 1 e 3. Houve hiperexpressão proteica da desmogleína 2 na pele íntegra e lesional dos pênfigos, comparada à pele controle. Grânulos de internalização das desmogleínas 1 e 3, mas não da desmogleína 2, foram observados na lesão do pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar, respectivamente. Houve hiperexpressão gênica da desmogleína 2 nas mucosas. Limitações do estudo: Tamanho amostral pequeno para análise estatística das expressões proteica e gênica.

Conclusão: Autoanticorpos contra desmogleína 2 não são patogênicos nos pênfigos; a superexpressão proteica e gênica da desmogleína 2 na pele e mucosas pode estar envolvida na reparação da acantólise.

Palavras-chave: Acantólise; desmogleína; desmogleína 2; *epitope-spreading*; pênfigo.

Introdução

Os pênfigos são doenças bolhosas autoimunes, caracterizados pela produção de autoanticorpos IgG contra as desmogleínas (Dsg) 1 e 3, os quais rompem a adesão dos queratinócitos causando acantólise. No pênfigo foliáceo (PF), a produção de anti-Dsg1 é responsável pelo acometimento exclusivo da pele; no pênfigo vulgar (PV), a produção de anti-Dsg3 afeta as mucosas, e, quando a pele está envolvida, são detectados anti-Dsg1 e anti-Dsg3.^{1,2} Tanto o PF quanto o PV são prevalentes no sudeste do Brasil, e a determinação do perfil HLA dos pacientes com PF e PV confirmou tratar-se de doenças bolhosas distintas.^{3,4}

A participação da Dsg2 é pouco estudada na patogênese dos pênfigos. Em contraste com as expressões das Dsg1 e Dsg3, que são restritas a epitélios estratificados, a Dsg2 é amplamente expressa em todos os epitélios que contêm desmossomos, incluindo tecidos pulmonar, gastrointestinal, renal e o miocárdio, e em tumores da pele, ovário, pulmão e estômago.⁵⁻¹¹ Na pele humana, a Dsg2 é pouco expressa, restringindo-se à camada basal da epiderme, enquanto sua expressão se assemelha às expressões da Dsg1 e Dsg3 em linhagens de células imortalizadas de carcinoma de células escamosas.¹²

Para contribuir com a participação da Dsg2 na patogênese dos pênfigos, comparou-se a produção de autoanticorpos contra as Dsg 1, 2 e 3 em ampla amostragem de pacientes com PF e PV, seus familiares e controles saudáveis, residentes na região nordeste do estado de São Paulo, Brasil, onde ambos PF e PV são prevalentes. Ainda, as expressões proteica e gênica das Dsg 1, 2 e 3 em amostras de pele e mucosa, obtidas de pacientes com PF e PV, foram determinadas.

Materiais e métodos

Ética. O Comitê de Ética Humana (CAAE: 56944116.1.0000.5440) aprovou este estudo de acordo com os padrões éticos da Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

População do estudo. Amostras de soro de pacientes com PF e PV, diagnosticados por exame clínico, histopatológico, e exames de imunofluorescência direta e/ou indireta; de familiares de primeiro e segundo graus e de controles (CTL), que acompanharam os pacientes durante a consulta ambulatorial, foram obtidas de 1997 a 2016. Cinco grupos foram analisados: 202 pacientes com PF e 131 com PV, 50 familiares do PF (FPF) e 57 FPV, e 114 CTL. Os pacientes virgens de tratamento foram classificados de acordo com a forma clínica, isto é, PF localizado ou generalizado, e PV forma mucosa exclusiva ou mucocutânea. Os pacientes com PF e PV foram divididos em cinco subgrupos, de acordo com a atividade da doença e vigência ou não de tratamento no momento da coleta do soro: virgens de tratamento; com lesões ativas e sem tratamento há mais de 60 dias; em tratamento com lesões ativas; em tratamento sem lesões ativas; e em remissão (pacientes sem lesões ativas e sem tratamento imunossupressor há pelo menos 60 dias) (Tabela 1).

Detecção de autoanticorpos IgG contra Dsg1 e Dsg3 por ELISA. As amostras foram testadas com ELISA comercial (MBL, Nagoya, Japão), segundo as recomendações do fabricante (*cut-off*=20 U/mL).

Detecção de autoanticorpos IgG contra Dsg2 por ELISA in house. Resumidamente, 5 ng/ μ L da Dsg2 (Leinco, Fenton, EUA) diluídos em solução de carbonato-bicarbonato (pH

7,4) foram incubados (50 µL/poço) em microplaca de 96 poços (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 4 °C durante a noite. Após quatro lavagens com 0,05% de PBS/Tween e incubação com solução de bloqueio (PBS / Tween 0,05% / leite desnatado 5%) por uma hora (h), 50 µL de amostras de soro (diluídas a 1:100 em solução de bloqueio), em duplicata, foram adicionadas e incubadas à temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Após quatro lavagens, 50 µL (diluído a 1: 5000 em solução de bloqueio) de anticorpo HRP conjugado com IgG anti-humano (Abcam, Cambridge, EUA) foram incubados em TA por 2 h. Após quatro novas lavagens, 50 µL de substrato de peroxidase ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram adicionados e mantidos em TA por 15 minutos (min) no escuro, e a reação foi finalmente interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M. Os títulos em densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas ELISA (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, Cambourne, UK) a 405 nm. Anticorpo comercial anti-Dsg2 (Abcam, Cambridge, EUA) foi empregado como controle positivo. O valor do *cut-off* de 0,1365 DO foi estabelecido por curva ROC (Figura 1 suplementar). Títulos maiores que 0,400 DO foram obtidos em quatro amostras do grupo CTL e foram excluídos do cálculo porque excederam a curva de normalidade.

ELISA de adsorção para especificidade de anti-Dsg2. Para excluir reação cruzada dos anticorpos anti-Dsg2 com as proteínas Dsg1 e Dsg3, seis amostras de soro do PF e seis do PV, com títulos elevados de anti-Dsg 1, 2 e 3 foram selecionadas. Realizou-se ensaios ELISA para adsorção sérica em série com Dsg2 (Leinco, Fenton, EUA) até que o nível de anti-Dsg2 ficasse abaixo do valor *cut-off*. Posteriormente, o soro remanescente foi colocado em placa de ELISA comercial anti-Dsg1 e anti-Dsg3 (MBL, Nagoya, Japão) para comparar os títulos pré- e pós-adsorção.

Amostras de biópsia. As biópsias de pele e/ou mucosa foram realizadas em três pacientes com PF e três com PV, virgens de tratamento ou com lesões ativas e sem tratamento por mais de 60 dias. As biópsias foram feitas de pele íntegra (PI) perilesional e de lesões bolhosas, assim denominadas: pele lesional (PL) ou mucosa lesional (ML). Como controle, coletou-se biópsia de mucosa íntegra (MI) de um paciente com PF. Uma amostra de pele de abdominoplastia e a amostra de MI do PF foram usadas como controles na IHQ, e duas amostras de pele de cirurgia de *lifting* facial (LF) foram usadas como controles no ensaio de qPCR. Biópsias com *punch* 4 mm foram seccionadas em dois fragmentos: um deles foi armazenado em meio Tissue-Tek (Sakura finetek, Torrance, EUA) para coloração com hematoxilina-eosina e imuno-histoquímica (IHQ), e o outro foi armazenado em RNAlater® (Life Technologies, Carlsbad, EUA) a -80 °C para extração de RNA e subsequente ensaio de qPCR.

Imuno-histoquímica (IHQ). O sistema de detecção HRP-Polymer MACH 1 (Biocare Medical, Concord, EUA) foi usado de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos congelados foram fixados em acetona (Merck, Darmstadt, Germany) a 4 °C por 10 min e lavados em PBS pH 7,4; a peroxidase endógena foi inibida pela incubação com H₂O₂ 0,3% (Labsynth, Diadema, Brasil) por 10 min. Em seguida, os fragmentos foram incubados com solução de bloqueio Sniper em TA por 10 min, seguido pela adição de 5 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-Dsg1, anti-Dsg2 e anti-Dsg3 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 2 h. Os cortes foram lavados com PBS por 3 min, duas vezes. Em seguida, a sonda foi adicionada por 15 min. Os cortes foram lavados em PBS novamente e incubados com o polímero HRP por 30 min. Após a lavagem, a reação foi

completada com a adição do substrato cromogênico diaminobenzidina por 2 min, preparado de acordo com as instruções do fabricante (Biocare Medical, Concord, EUA). A seguir, os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris (Merck Millipore, Burlington, EUA) por 40 segundos e lavados em água corrente. Para a montagem das lâminas, os cortes foram desidratados em banhos crescentes de etanol e diafanizados em banhos de xilol e, a seguir, montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e os cortes cobertos com lamínula para observação em microscópio óptico (Imager-A1, Zeiss, Alemanha).

Extração de RNA e síntese de cDNA. RNA total foi extraído de biópsias de pele ou mucosa usando o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Após a extração, as amostras foram incubadas com DNase (Promega, Madison, EUA) e quantificadas em espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, EUA). 40 ng de RNA foram transcritos reversamente com o kit de síntese de cDNA (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e sequenciamento das Dsg1, Dsg2 e Dsg3. SYBR Green qPCR foi realizada em volume final de 22,5 µL, com 12,5 µL de MIX SYBR Green PCR (Promega, Madison, EUA), 0,5 µL de cada primer [10 µM], 6,5 µL de água ultrapura e 2,5 µL de cDNA [1:4], no termociclador Rotor Gene-Q® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Foram utilizadas as sequências de primers que amplificam fragmentos dos genes Dsg1, Dsg2 e Dsg3 e do gene ribossomal humano (18S) como gene endógeno.¹³⁻¹⁵ As sequências dos primers, o produto amplificado resultante (amplicon) e os parâmetros dos ciclos de amplificação são detalhados na Tabela 1

suplementar. As expressões gênicas relativas de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 foram calculadas usando a equação $2^{-\Delta\text{CT}}$, tendo o 18S rRNA como gene de referência; ΔCT foi calculado subtraindo o valor do cycle Threshold (cT) do gene alvo (Dsg1, Dsg2 ou Dsg3) do valor de cT do gene de referência (18S).¹⁶ Para verificar a especificidade de cada sequência, o amplicon obtido foi purificado (ExoSAP-IT®), sequenciado (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, EUA) e analisado no NCBI BLAST.

Análise estatística. As variáveis categóricas foram analisadas por teste Qui-quadrado (x²) ou teste exato de Fisher quando os dados eram escassos. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi empregado para comparar os títulos de ELISA entre os grupos. O teste de Spearman foi usado para correlacionar os títulos de anticorpos contra as Dsgs, bem como com a duração da doença e a idade dos pacientes. O teste de Friedman foi usado para comparar os títulos de anti-Dsg2 pré- e pós-adsorção sérica em série. O teste de Wilcoxon foi aplicado para comparar os títulos de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 pré- e pós-adsorção com Dsg2. A análise de regressão logística multivariada com o SPSS Statistics 17.0 (software IBM SPSS®, EUA) foi utilizada para confirmar os resultados significantes obtidos na análise univariada. A significância foi fixada em $\alpha=5\%$. O *software* GraphPad Prism 8.1 foi utilizado para as análises estatísticas e para a construção dos gráficos (GraphPad software Inc., La Jolla, EUA).

Resultados

A Tabela 1 resume os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos grupos estudados. Os grupos PF e PV apresentaram títulos (DO) semelhantes e maiores de anti-Dsg2 comparados ao grupo CTL (0,166; 0,180; 0,102, respectivamente) ($P<0,0001$)

(Figura 1A). Ainda, o grupo PF apresentou maiores títulos de anti-Dsg2 comparado aos grupos FPF ($P=0,0046$) e FPV ($P=0,0004$). Esses resultados permaneceram estatisticamente significantes após análise multivariada, corrigida por idade, sexo e títulos de anticorpos contra Dsg1 e Dsg3. Nos grupos de familiares e CTL, observou-se produção de autoanticorpos contra Dsg1 e/ou Dsg3 (Figura 1B,C). Títulos de anti-Dsg2 foram mais elevados nos grupos PF e PV virgens de tratamento, comparados ao grupo CTL ($P<0,0001$), e no grupo PV sem tratamento comparado ao PV em tratamento ($P=0,0311$) (Figura 2 suplementar), permanecendo significativo após análise multivariada ($P=0,0500$). Os subgrupos PF não diferiram quanto aos títulos de anti-Dsg2 (dados não mostrados).

A soroprevalência de anti-Dsg2 nos grupos PF, PV e FPV resultou semelhante (63,9%; 66,4%; 73,7%, respectivamente), e maior que nos grupos FPF e CTL (38%; 27,2%, respectivamente) ($P<0,0001$) (Tabela 1).

Não houve correlação significativa dos títulos de anti-Dsg2 com a duração da doença no PF ($P=0,5365$) e no PV ($r=-0,1629$; $P=0,0630$) (dados não mostrados), assim como com a forma clínica do PF ($P=0,9636$) e do PV ($P=0,3909$) (Tabela 1). Não houve diferença significativa dos títulos de anti-Dsg2 nos subgrupos PF e PV com lesões cutâneas ativas e sem lesões cutâneas ($P=0,3790$ e $P=0,1312$, respectivamente) (dados não mostrados).

Houve correlação positiva dos títulos de anti-Dsg2 com os títulos de anti-Dsg1 no grupo PF ($r=0,1628$; $P=0,0206$), com tendência à correlação positiva com os títulos de anti-Dsg3 no PV ($r=0,1675$, $P=0,0568$) (Figura 1 D, E). Considerando os subgrupos virgem de tratamento, e sem tratamento há mais de 60 dias e com lesões em atividade, não houve correlação dos títulos de anti-Dsg2 com os de anti-Dsg1 no PF ($r=0,2100$,

$P=0,0650$), assim como com os de anti-Dsg3 no PV ($r=0,1481$, $P=0,4264$) (dados não mostrados).

Após a adsorção dos soros de pacientes com PF e PV com o peptídeo Dsg2, os títulos de anti-Dsg1 e de anti-Dsg3 permaneceram semelhantes à pré-adsorção ($P>0,9999$ e $P=0,4063$, respectivamente), confirmando a especificidade dos anticorpos anti-Dsg2 (Tabelas 2 e 3 suplementares).

Expressão proteica das desmogleínas por IHQ

A Tabela 2 mostra os dados demográficos e sorológicos dos pacientes com PF e PV submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa para IHQ.

Na amostra de pele controle de abdominoplastia, confirmou-se a distribuição epidérmica clássica das Dsgs: a Dsg1 esteve expressa em toda a epiderme, com predomínio nas camadas superiores, enquanto as Dsg2 e Dsg3 predominaram nas camadas inferiores. A expressão da Dsg2 foi menos intensa do que a das Dsg1 e Dsg3 (Figura 2A). Diferentemente da amostra de pele controle, a expressão da Dsg2 foi mais intensa em todas as camadas da epiderme nas amostras de PI do PF e PV (Figura 2B,C). Na PL do PF, houve expressão intensa da Dsg2 no assoalho da bolha e, no PV, no teto e no assoalho da bolha, incluindo sua expressão nas células acantolíticas (Figura 2B,C).

À semelhança da amostra de pele controle, a expressão da Dsg2 na MI do PF foi mais intensa nas camadas inferiores. Ainda, houve predomínio da expressão da Dsg3 em todas as camadas da epiderme, comparada às da Dsg1 e Dsg2 (Figura 3A). Na ML do PV, houve predomínio da expressão da Dsg3 no teto e no assoalho da bolha (Figura 3B,C).

Na PL do PF, grânulos conspícuos intercelulares e intracitoplasmáticos, correspondentes à internalização da Dsg1, foram observados em toda a extensão do

assoalho da bolha, da camada basal à camada Malpighiana (Figura 4A). Na PL e na ML do PV, grânulos intercelulares finos e esparsos de Dsg3 foram demonstrados (Figura 4C). Grânulos intracitoplasmáticos, que poderiam representar a internalização da Dsg2, não foram observados nas amostras lesionais do PF e PV (Figura 4B).

Expressão gênica das desmogleínas por qPCR

A Tabela 2 detalha os dados demográficos e sorológicos dos pacientes com PF e PV submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa para os ensaios de qPCR.

As curvas de amplificação das amostras de cDNA são mostradas na Figura 3 suplementar. Os resultados das expressões gênicas relativas de Dsg 1, 2 e 3 são apresentados na Figura 5.

Considerando a amostra de pele controle de LF, houve predomínio da expressão gênica relativa da Dsg3, seguido pelas expressões das Dsg1 e Dsg2 (Figura 5A,B). As expressões das Dsg1 e Dsg3 foram menores no PV, seguido pelo PF, com distribuição semelhante das Dsgs à amostra de LF (Figura 5A,B).

As expressões de Dsg 1, 2 e 3 apresentaram resultados distintos nas amostras de MI do PF e ML do PV, com predomínio da expressão da Dsg3 (Figura 5C). Já a expressão da Dsg2 mostrou-se maior na MI do PF e ML do PV, comparada às das amostras de PI e de PL do PF e PV (Figura 5D).

Discussão

Neste estudo demonstramos a produção de autoanticorpos IgG séricos contra Dsg2 em grande amostragem de pacientes com PF e PV, comparados aos grupos FPF, FPV e CTL, todos habitantes de região prevalente em PF e PV no Sudeste do Brasil.³ A

soroprevalência de anti-Dsg2 no grupo PF (63% de 202 PF) foi maior quando comparada ao estudo de Flores et al. (40% de 106 PF), o qual foi realizado em região endêmica para PF no Brasil.¹⁷ Já, a soroprevalência no grupo CTL foi semelhante em ambos (20% e 27%, respectivamente).

Devido à similaridade proteica das Dsg1, Dsg2 e Dsg3, aventou-se possível reação cruzada dos anticorpos anti-Dsg2 com as proteínas Dsg1 e Dsg3.⁵ No entanto, testes de adsorção não mostraram diferenças nos títulos de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 quando comparados os resultados pré- e pós-adsorção com a Dsg2, confirmando a produção específica de autoanticorpos contra a Dsg2.

Considerando a especificidade da produção de autoanticorpos contra a Dsg2, alguns questionamentos devem ser considerados: (a) seriam patogênicos? e (b) seriam produzidos pelo fenômeno de *epitope-spreading*?¹⁸

Quanto à primeira questão, a discussão dos resultados aponta pela não patogenicidade dos anticorpos anti-Dsg2 nos pênfigos. Títulos maiores de anti-Dsg2 foram detectados nos grupos PF, PV e FPV, quando comparados aos grupos FPF e CTL. A produção de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 por indivíduos saudáveis é conhecida, portanto, a presença de anti-Dsg2 nos grupos FPF, FPV e CTL não excluiria sua participação na patogênese do PF e PV.¹⁹⁻²¹ Ainda, os títulos de anti-Dsg2 não se correlacionaram com a forma clínica ou com a atividade da doença nos grupos PF e PV, em contraste com os títulos séricos de anti-Dsg1 e anti-Dsg3 que estão associados à gravidade do PF e PV.^{22,23} Ainda, títulos mais elevados de anti-Dsg2 nos grupos PF e PV sem tratamento em comparação ao CTL, e nos grupos PV não tratado em comparação com PV em tratamento foram encontrados. Assim, a diminuição de anti-Dsg2 após o tratamento imunossupressor poderia favorecer a patogenicidade de anti-Dsg2 no PV, porém, esse resultado não foi

confirmado no grupo PF. Ainda, títulos de anti-Dsg2 se correlacionaram com os de anti-Dsg1 no PF ($r=0,1628$, $P=0,0206$), também relatado por Flores et al.¹⁷ Finalizando essa discussão, é conhecida a expressão da Dsg2 em outros tecidos além da pele, como pulmonar, gastrointestinal, renal e no miocárdio.^{5,8} Assim, corroborando para que os anticorpos anti-Dsg2 não sejam patogênicos, excetuando-se o esôfago no PV, não se evidencia comprometimento de órgãos internos nos pênfigos.²⁴

Quanto à segunda questão, seria mais plausível considerar que anticorpos anti-Dsg2 fossem produzidos por fenômeno de *epitope-spreading* no PV, visto que as Dsg2 e Dsg3 são mais expressas nas camadas inferiores da epiderme. Ainda, pacientes com PV apresentaram títulos de anti-Dsg2 mais elevados antecedendo o início do tratamento imunossupressor. Assim, poderíamos supor que a Dsg2 seja exposta no início do processo acantolítico, produzido por autoanticorpos contra Dsg3, com consequente produção de anti-Dsg2 por fenômeno de *epitope-spreading*.¹⁸ No entanto, títulos semelhantes de anti-Dsg2 foram observados no PF e PV. Assim, o fenômeno de *epitope-spreading* estaria ocorrendo em ambos processos patogênicos do PF e PV. Retornaremos a essa discussão após considerarmos os resultados de IHQ.

Uma vez que os pacientes com PF e PV produziram anti-Dsg2, decidimos verificar as expressões proteica e gênica da Dsg2 in situ por IHQ e qPCR, e comparar os resultados com as expressões das Dsg1 e Dsg3. Comparamos PI e PL do PF e PV com pele de abdominoplastia e LF. A ML do PV foi comparada à MI do PF.

Na amostra controle de abdominoplastia, a expressão proteica das Dsgs confirmou o padrão de distribuição clássico nas camadas da epiderme, sendo a expressão da Dsg2 mais intensa nas camadas inferiores. Ainda, as Dsg1 e Dsg3 foram predominantemente expressas nas membranas dos queratinócitos.^{5,12} Curiosamente, as expressões da Dsg2 e

Dsg3 nas amostras de PI do PF e PV foram mais intensas do que na amostra de abdominoplastia, e se estenderam a todas as camadas da epiderme. Na PL do PF e PV, a expressão da Dsg2 foi intensa no teto e no assoalho das bolhas e nas células acantolíticas. Além disso, nas amostras de PL do PF e PV, observamos a presença de grânulos de Dsg1 e de Dsg3 intra- e intercelulares nos queratinócitos, respectivamente. Os grânulos de Dsg1 estenderam-se por toda a camada Malpighiana no assoalho da bolha acantolítica do PF, confirmando a internalização da Dsg1, descrita há trinta anos.²⁵⁻²⁸ A internalização da Dsg3 na PL do PV foi menos evidente, mas é comumente descrita.²⁹⁻³² Enquanto a Dsg2 esteve hiperexpressa na PI, sua internalização esteve ausente na PL do PF e PV, representando mais uma evidência de que anticorpos anti-Dsg2 não tenham papel patogênico no processo da acantólise do pênfigo.

Na amostra de LF, a expressão gênica relativa da Dsg2 foi menor do que a das Dsg1 e Dsg3, condizente com a expressão proteica avaliada por IHQ. Com surpresa, a expressão gênica relativa da Dsg2 esteve aumentada na MI do PF e na ML do PV.

O papel da superexpressão proteica e gênica da Dsg2 nas amostras de pele/mucosa de pacientes com PF e PV merece atenção. Iwatsuki et al. (1999) mostraram que a internalização das Dsg1 e Dsg3 antecedia a acantólise em amostras de pele do PF e PV, e esteve associada à indução da expressão da Dsg2 para compensar a depleção das Dsg1 e Dsg3.¹³ Ainda, Moll et al. (1999) demonstraram forte expressão da Dsg2 em modelo de cultura de pele criado para estudar a cicatrização epitelial.³³ Em camundongos transgênicos com superexpressão da Dsg2, Brennan et al. (2010) demonstraram hiperproliferação de queratinócitos epidérmicos e diminuição da apoptose, e mostraram que a superexpressão da Dsg2 restringiu a formação de bolhas epidérmicas por IgPF.^{34,35} Depois, Hartlieb et al. (2014) demonstraram que, embora a Dsg2 contribua menos do que

a Dsg3 para a coesão dos queratinócitos, a Dsg2 compensou a perda de função da Dsg3.^{6,36} Mais recentemente, Sigmund et al. (2020) demonstraram que a Dsg2 faz ligação heterofílica com a Dsg3 e pode minimizar a perda de adesão entre os queratinócitos no processo da acantólise.³⁷

Somando os nossos resultados aos relatos da literatura, a superexpressão da Dsg2 na PI e em amostras de mucosa do PF e PV parece estar em consonância com todos os relatos mencionados: a superexpressão da Dsg2, para compensar a perda de função das Dsg1 e Dsg3, poderia proteger o processo da acantólise e estar envolvida na reparação tecidual. Ainda, a hiperexpressão da Dsg2 em todas as camadas da epiderme na PI e PL do PF e PV poderia justificar a produção de autoanticorpos contra a Dsg2 pelo fenômeno de *epitope-spreading*.

Por fim, embora autoanticorpos anti-Dsg1 e anti-Dsg3 sejam relatados em populações normais, os resultados de títulos aumentados de anti-Dsg2 no grupo FPV deverão ser mais bem avaliados.¹⁹⁻²¹

Limitações do estudo: Tamanho amostral pequeno para análise estatística das expressões proteica e gênica da Dsg2 nos tecidos.

Conclusão

Nossos resultados permitem concluir que autoanticorpos contra Dsg2 não são patogênicos nos pênfigos, e que a superexpressão proteica e gênica da Dsg2 em amostras de pele e mucosas de pacientes com PF e PV pode estar envolvida na proteção contra a acantólise e no mecanismo de reparo tecidual.

Declaração de submissão e verificação

Este manuscrito não está sendo considerado para publicação em nenhum periódico, e sua publicação foi aprovada por todos os autores. Os resultados parciais do teste ELISA foram apresentados como pôster "Anticorpos contra desmogleína 2 estão presentes em amostras de pacientes com pênfigo foliáceo e pênfigo vulgar e em familiares e controles de região endêmica" no XXXIV Encontro Anual de Dermatologistas da América Latina, 2016, São Paulo, tendo sido contemplado em terceiro lugar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao corpo clínico do ambulatório de dermatoses autoimunes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil. Agradecemos também a Aline Rafaela Silva Rodrigues pelas contribuições nos experimentos piloto de ELISA anti-DSG2 *in house* e nos experimentos de ELISA comercial anti-DSG 1 e 3.

Contribuições dos autores

MCBM contribuiu com a coleta de dados, experimentos laboratoriais, análise estatística, pesquisa bibliográfica e redação; **TAJ** contribuiu com os experimentos de ELISA, análise de dados e revisão do manuscrito; **SV** contribuiu com a análise dos dados, redação e revisão do manuscrito; **NP** contribuiu com experimentos de qPCR, análise de dados e revisão do manuscrito; **AT** contribuiu com experimentos de IHQ, análise de dados e revisão do manuscrito; **AL** contribuiu com o desenho do estudo, experimentos pilotos de ELISA e de IHQ, e revisão do manuscrito; **AMR** contribuiu com o desenho do estudo, análise de dados, revisão da literatura e redação do manuscrito.

Referências

1. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet*. 2019;394(10201):882-94. doi:10.1016/S0140-6736(19)31778-7
2. Egami S, Yamagami J, Amagai M. Autoimmune bullous skin diseases , pemphigus and pemphigoid. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(4):1031-47. doi:10.1016/j.jaci.2020.02.013
3. Celere BS, Vernal S, La Serra L, et al. Spatial Distribution of Pemphigus Occurrence over Five Decades in Southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(6):1737-45. doi:10.4269/ajtmh.17-0100
4. Brochado MJF, Nascimento DF, Campos W, Deghaide NHS, Donadi EA, Roselino AM. Differential HLA class I and class II associations in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris patients from a prevalent Southeastern Brazilian region. *J Autoimmun*. 2016;72:19-24. doi:10.1016/j.jaut.2016.04.007
5. Schäfer S, Koch PJ, Franke WW. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalogue of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Exp Cell Res*. 1994;211(2):391-99. doi:10.1006/excr.1994.1103
6. Hartlieb E, Kempf B, Partilla M, Vigh B, Spindler V, Waschke J. Desmoglein 2 Is Less Important than Desmoglein 3 for Keratinocyte Cohesion. Gottardi C, ed. *PLoS One*. 2013;8(1):e53739. doi:10.1371/journal.pone.0053739
7. Wang H, Ducournau C, Saydaminova K, et al. Intracellular Signaling and Desmoglein 2 Shedding Triggered by Human Adenoviruses Ad3, Ad14, and Ad14P1. Ross SR, ed. *J Virol*. 2015;89(21):10841-59. doi:10.1128/JVI.01425-15
8. Amagai M, Stanley JR. Desmoglein as a Target in Skin Disease and Beyond. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3):776-84. doi:10.1038/jid.2011.390
9. Cai F, Zhu Q, Miao Y, Shen S, Su X, Shi Y. Desmoglein-2 is overexpressed in non-small cell lung cancer tissues and its knockdown suppresses NSCLC growth by regulation of p27 and CDK2. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(1):59-69. doi:10.1007/s00432-016-2250-0
10. Kim J, Beidler P, Wang H, et al. Desmoglein-2 as a prognostic and biomarker in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2020;21(12):1154-62.

doi:10.1080/15384047.2020.1843323

11. Brennan D, Mahoney MG. Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas. *Cell Adh Migr.* 2009;3(2):148-54. doi:10.4161/cam.3.2.7539
12. Denning MF, Guy SG, Ellerbroek SM, Norvell SM, Kowalczyk AP, Green KJ. The Expression of Desmoglein Isoforms in Cultured Human Keratinocytes Is Regulated by Calcium, Serum, and Protein Kinase C. *Exp Cell Res.* 1998;239(1):50-59. doi:10.1006/excr.1997.3890
13. Iwatsuki K, Han GW, Fukuti R, et al. Internalization of constitutive desmogleins with the subsequent induction of desmoglein 2 in pemphigus lesions. *Br J Dermatol.* 1999;140(1):35-43.
14. Savci-heijink CD, Kosari F, Aubry M, Caron BL. The Role of Desmoglein-3 in the Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1629-37. doi:10.2353/ajpath.2009.080778
15. Rho H, Lee B, Choi E, Choi I, Lee Y, Goh S. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer.* 2010;10:1-13.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* 2001;408:402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262
17. Flores G, Culton DA, Prisayanh P, et al. IgG Autoantibody Response against Keratinocyte Cadherins in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem). *J Invest Dermatol.* 2012;132(11):2573-80. doi:10.1038/jid.2012.232
18. Didona D, Di Zenzo G. Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. *Front Immunol.* 2018;9(April):1-27. doi:10.3389/fimmu.2018.00779
19. Oliveira L, Marquart-Filho A, Trevilato G, et al. Anti-Desmoglein 1 and 3 Autoantibody Levels in Endemic Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris from Brazil. *Clin Lab.* 2016;62. doi:10.7754/Clin.Lab.2015.150628
20. Simon J.P. Warren, Lin M-S, Giudice G, et al. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pmphigus foliaceus in Brazil. *N Engl J Med.* 2000;343(1):23-30.
21. Hilario-Vargas J, Dasher DA, Li N, et al. Prevalence of Anti-Desmoglein-3 Antibodies in Endemic Regions of Fogo Selvagem in Brazil. *J Invest Dermatol.*

- 2006;126(9):2044-48. doi:10.1038/sj.jid.5700388
22. Harman KE, Seed PT, Gratian MJ, Bhogal BS, Challacombe SJ, Black MM. The severity of cutaneous and oral pemphigus is related to desmoglein 1 and 3 antibody levels. *Br J Dermatol.* 2001;144(4):775-80. Accessed June 7, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298536>
 23. Belloni-Fortina A, Faggion D, Pigozzi B, et al. Detection of Autoantibodies against Recombinant Desmoglein 1 and 3 Molecules in Patients with Pemphigus vulgaris: Correlation with Disease Extent at the Time of Diagnosis and during Follow-Up. *Clin Dev Immunol.* 2009;2009:1-6. doi:10.1155/2009/187864
 24. Coelho LK, Troncon LEA, Roselino AMF, Campos MS, Módena JLP. Esophageal Nikolsky's Sign in Pemphigus Vulgaris. *Endoscopy.* 1997;29(07):S 35-S 35. doi:10.1055/s-2007-1004283
 25. Burge SM, Wilson CL, Dean D, Wojnarowska F. An immunohistological study of desmosomal components in pemphigus. *Br J Dermatol.* 1993;7(128):363-70.
 26. Carlotti A, Balaton AJ, Muret A, Vaillant L, Weehsler J, Villela M. Autoimmune Pemphigus. A Distinct Staining Pattern With an Anti-Desmoglein Antibody. *Arch Dermatol.* 1993;(129):596-99.
 27. Steeves E, Chelack B, Clark E, Haines D. Altered immunohistochemical staining for desmoglein in skin biopsies in canine pemphigus foliaceus. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:53-56.
 28. Oktarina DAM, Sokol E, Kramer D, Jonkman MF, Pas HH. Endocytosis of IgG, Desmoglein 1, and Plakoglobin in Pemphigus Foliaceus Patient Skin. *Front Immunol.* 2019;10(November):1-12. doi:10.3389/fimmu.2019.02635
 29. Calkins CC, Setzer S V., Jennings JM, et al. Desmoglein Endocytosis and Desmosome Disassembly Are Coordinated Responses to Pemphigus Autoantibodies. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7623-34. doi:10.1074/jbc.M512447200
 30. Delva E, Jennings JM, Calkins C, Kottke MD, Faundez V, Kowalczyk AP. Pemphigus Vulgaris IgG-induced Desmoglein-3 Endocytosis and Desmosomal Disassembly Are Mediated by a Clathrin- and Dynamin-independent Mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(26):18303-13. doi:10.1074/jbc.M710046200
 31. Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, et al. p38MAPK Signaling and Desmoglein-3

- Internalization Are Linked Events in Pemphigus Acantholysis *. *J Biol Chem.* 2010;285(12):8936-41. doi:10.1074/jbc.M109.087999
32. Schlögl E, Radeva MY, Vielmuth F, Schinner C, Fletcher A. Keratin retraction and Desmoglein3 internalization independently contribute to Dissociation in Pemphigus Vulgaris. *Front Immunol.* 2018;9:1-16. doi:10.3389/fimmu.2018.00858
 33. Moll I, Houdek P, Schäfer S, Nuber U, Moll R. Diversity of desmosomal proteins in regenerating epidermis: Immunohistochemical study using a human skin organ culture model. *Arch Dermatol Res.* 1999;291(7-8):437-46. doi:10.1007/s004030050435
 34. Brennan D, Hu Y, Joubeh S, et al. Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *J Cell Sci.* 2007;120(5):758-71. doi:10.1242/jcs.03392
 35. Brennan D, Hu Y, Medhat W, Dowling A, Mahoney MG. Superficial Dsg2 Expression Limits Epidermal Blister Formation Mediated by Pemphigus Foliaceus Antibodies and Exfoliative Toxins. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010(1):1-10. doi:10.1155/2010/410278
 36. Hartlieb E, Rötzer V, Radeva M, Spindler V, Waschke J. Desmoglein 2 Compensates for Desmoglein 3 but Does Not Control Cell Adhesion via Regulation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Keratinocytes. *J Biol Chem.* 2014;289(24):17043-53. doi:10.1074/jbc.M113.489336
 37. Sigmund AM, Steinert LS, Egu DT, Bayerbach FC, Waschke J, Vielmuth F. Dsg2 Upregulation as a Rescue Mechanism in Pemphigus. *Front Immunol.* 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.581370

Legendas

Tabelas

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos e resultados de ELISA anti-desmogleínas (Dsg) comparando pacientes com PF e PV, familiares de PF e PV (FPF e FPV) e controles (CTL)

PF	PV	FPF	FPV	Controles	<i>P</i>
----	----	-----	-----	-----------	----------

	N = 202	N = 131	N = 50	N = 57	N = 114	
Mediana de idade em anos (quartis 25/75)	35 (21/54) ^a	48 (35/62) ^b	40 (29/49) ^c	30 (19/45) ^d	59 (45/71) ^e	^{a,b} 0,0001 ^{a,c} >0,9999 ^{a,e} <0,0001 ^{b,d} 0,0001 ^{b,e} 0,0068
	N (%) 202	N (%) 131	N (%) 50	N (%) 57	N (%) 114	
Gênero						^{a,b} 0,0033 ^{b,c} 0,0027
Feminino	102 (50,2) ^a	88 (67,7) ^b	36 (72,0) ^c	40 (70,2) ^d	55 (48,2) ^e	^{a,e} 0,8150 ^{c,d} 1,0000
Masculino	101 (49,8)	42 (32,3)	14 (28,0)	17 (29,8)	59 (51,8)	^{c,e} 0,0022 ^{d,e} 0,0088
Duração da doença (anos)*	N = 199	N = 130				
< 1	45 (22,6)	31 (23,8)	NA	NA	NA	0,8967
1 to -5	87 (43,7)	86 (66,2)	NA	NA	NA	0,0296
6 to -10	32 (16,1)	9 (6,9)	NA	NA	NA	0,0390
11 to 15	11 (5,5)	3 (2,3)	NA	NA	NA	0,2630
>15	24 (12,1)	1 (0,8)	NA	NA	NA	0,0001
Forma clínica (pacientes virgens de tratamento) *	n=68	n=26				
Mucosa exclusiva	NA	8 (30,8) ^b	NA	NA	NA	^a =0,9636 ^b =0,3909
Muco-cutânea	NA	18 (69,2) ^b	NA	NA	NA	
Localizada	34 (50,0) ^a	NA	NA	NA	NA	
Generalizada	34 (50,0) ^a	NA	NA	NA	NA	

Tratamento na data da coleta de soro*		n=186	n=127			
Virgens de tratamento		43 (23,1) ^a	20 (15,8) ^b	NA	NA	NA
Sem tratamento com lesões ativas		34 (18,3) ^a	11 (8,7) ^b	NA	NA	NA
Em tratamento sem lesões ativas		16 (8,6) ^a	24 (18,8) ^b	NA	NA	NA
Em tratamento com lesões ativas		80 (43,0) ^a	65 (51,2) ^b	NA	NA	NA
Em remissão		13 (7,0) ^a	7 (5,5) ^b	NA	NA	NA
Anti-Dsg2		n = 202	n = 131	n = 50	n = 57	n = 114
Acima do <i>cut-off</i>		129 (63,9) ^a	87 (66,4) ^b	19 (38,0) ^c	42 (73,7) ^d	31 (27,2) ^e
Abaixo do <i>cut-off</i>		73 (36,1)	44 (33,6)	31 (62,0)	15 (26,3)	83 (72,8)
Anti-Dsg1						
Acima do <i>cut-off</i>		179 (88,2) ^a	67 (51,5) ^b	6 (12,0) ^c	1 (1,8) ^d	4 (3,5) ^e
Abaixo do <i>cut-off</i>		23 (11,8)	64 (48,5)	44 (88,0)	56 (98,2)	110 (96,5)
Anti-Dsg3						
Acima do <i>cut-off</i>		9 (4,5) ^a	102 (78,5) ^b	4 (8,0) ^c	0 (0,0) ^d	3 (2,6) ^e
Abaixo do <i>cut-off</i>		193 (95,5)	29 (21,5)	46 (92,0)	57 (100,0)	111 (97,4)

^a<0,0001;
^b<0,0001

^{a,e}<0,0001
^{b,e}<0,0001
^{a,c} 0,0012
^{c,d}<0,0001
^{d,e}<0,0001

^{a,b}<0,0001
^{a,e}<0,0001
^{a,c}<0,0001
^{b,d}<0,0001
^{b,e}<0,0001
^{c,d} 0,0325

^{a,b}<0,0001
^{b,e}<0,0001
^{b,d}<0,0001
^{c,d} 0,0446

Legenda: NA = não se aplica. Anti-Dsg1 e anti-Dsg3 = *cut-off* < 20 U/mL (ELISA, MBL, Japan).
Anti-Dsg2 = *cut-off* = 0,1365 DO (ELISA *in house*). *Alguns dados não compilados

Tabela 2. Dados demográficos, clínicos e títulos de anticorpos anti-Dsg1, 2 e 3 por ELISA dos pacientes com PF e PV submetidos à biópsia de pele e/ou mucosa

	Idade	Gênero	Duração da doença (meses)	Forma clínica	Tratamento na data da biópsia	Anti-Dsg1 (U/mL) *	Anti-Dsg2 (DO) ‡	Anti-Dsg3 (U/mL) *
PF1	23	Masculino	48	Generalizada	Em tratamento há 30 dias	99,80	0,088	1,93
PF2	18	Masculino	6	Generalizada	Virgem de tratamento	193,08	0,223	4,15
PF3	25	Masculino	36	Localizada	Virgem de tratamento	237,90	0,894	8,70
PV1	61	Masculino	24	Muco-cutânea	Sem tratamento há mais de 60 dias	3,87	0,211	172,78
PV2	50	Masculino	4	Muco-cutânea	Virgem de tratamento	42,16	0,213	166,91
PV3	68	Masculino	6	Muco-cutânea	Virgem de tratamento	167,62	0,311	163,80

Legenda: *Anti-Dsg1 e 3 *cut-off* = < 20 U/mL (ELISA, MBL, Japão); ‡Anti-Dsg2 *cut-off* = 0,1365 DO (ELISA *in house*).

Figuras

Figura 1. Anticorpos IgG contra Dsg1, Dsg2 e Dsg3 nos grupos estudados. **A.** ELISA anti-Dsg2. Grupos PF, PV e FPV apresentaram títulos maiores de anti-Dsg2 comparados ao grupo CTL ($p < 0,0001$); Grupos PF e FPV apresentaram títulos mais elevados de anti-Dsg2 do que FPF ($p = 0,0046$ e $p = 0,0004$, respectivamente). **B.** ELISA anti-Dsg1. Grupo PF apresentou títulos mais elevados de anti-Dsg1 comparado a todos os grupos ($p < 0,0001$ todos); PV apresentou títulos mais elevados de anti-Dsg1 do que FPF, FPV e CTL ($p < 0,0001$). **C.** ELISA anti-Dsg3. PV apresentou títulos mais elevados de anti-Dsg3 do que todos os grupos ($p < 0,0001$). A linha horizontal em cada coluna significa a mediana; a linha pontilhada significa o valor de *cut-off*. PF: pênfigo foliáceo; PV: pênfigo vulgar; FPF: familiares de PF; FPV: familiares de PV. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. **D.** Correlação de Spearman entre títulos de anti-Dsg2 e anti-Dsg1 em PF. **E.** Correlação de Spearman entre títulos de anti-Dsg2 e anti-Dsg3 em PV

Figura 2. Painel de imunohistoquímica com expressões de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 em amostras de pele (amplificação original de 40x). **A.** Amostra de pele controle de abdominoplastia mostrando a distribuição típica de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 na epiderme. **B.** PF-pele íntegra mostrando expressões aumentadas de Dsg2 e Dsg3 em toda a epiderme e PF-pele lesional mostrando expressões aumentadas de Dsg2 e Dsg3 no teto e no assoalho da bolha acantolítica. **C.** PV-Pele íntegra mostrando expressões aumentadas de Dsg2 e de Dsg3 em toda a epiderme e PV-pele lesional mostrando expressões aumentadas de Dsg2 e Dsg3 no teto e no assoalho da bolha e nas células acantolíticas

Figura 3. Painel de imunohistoquímica com expressões de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 em amostras de mucosa. **A.** PF-mucosa íntegra mostrando a distribuição típica de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 na epiderme (amplificação original de 63x). **B.** PV-mucosa lesional mostrando expressão de Dsg2 e Dsg3 circundando a bolha acantolítica (amplificação original de 100x e 40x)

Figura 4. Painel de imunohistoquímica com expressões de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 em amostras de pele e mucosa de pacientes com PF e PV. **A.** Imunohistoquímica de Dsg1 em amostras de pele íntegra e lesional do paciente PF2 mostrando grânulos conspícuos intercelulares e intracitoplasmáticos, amplamente distribuídos na pele lesional (internalização da Dsg1) (amplificação original de 100x). **B.** Imunohistoquímica de Dsg2 comparando amostra de pele íntegra e lesional do paciente PF2, confirmando a ausência de grânulos (amplificação original de 100x). **C.** Imunohistoquímica de Dsg3 comparando amostra de mucosa íntegra do paciente PF2 e mucosa lesional do paciente PV3, mostrando grânulos finos intercelulares e intracitoplasmáticos na mucosa lesional (internalização da Dsg3) (amplificação original de 100x)

Figura 5. Expressões gênicas relativas (x 10⁻⁴) de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 em amostras de pele e mucosas. **A.** Pele íntegra e lesional (PI e PL) de PF em comparação ao controle de *lifting* (LF) mostrando predominância da expressão de Dsg3 em comparação às Dsg1 e Dsg2. **B.** PI e PL de PV e LF. As expressões de Dsg1, Dsg2 e Dsg3 foram menores do que em LF. **C.** Mucosa

lesional (ML) obtida de pacientes com PV em comparação com mucosa íntegra (MI) obtida de um paciente com PF mostrando predominância da expressão de Dsg3 comparada às Dsg1 e Dsg2. A expressão de Dsg2 está aumentada em amostras de mucosa. **D.** Comparação da expressão de Dsg2 em todas as amostras PF e PV. As expressões gênicas relativas de Dsg1, Dsg2, Dsg3 foram calculadas usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ e 18S rRNA como gene de referência **Tabela 1.** Dados demográficos, clínicos e resultados de ELISA anti-desmogleínas (Dsg) comparando pacientes com PF e PV, familiares de PF e PV (FPF e FPV) e controles (CTL)